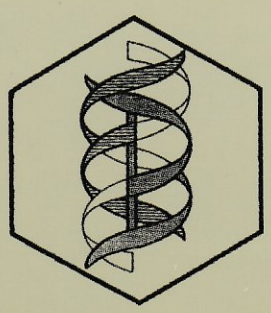
REB 2002

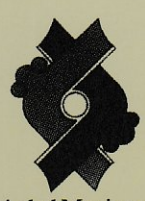
REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
UNAM

Facultad de Medicina,
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, AC

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Vol. 21 No. 1 MARZO 2002

REB 2002 Vol 21 Núm 1 Marzo de 2002

CONTENIDO

EDITORIAL

LA IMPORTANCIA DE ESCRIBIR UN ARTÍCULO DE REVISIÓN EN LA FORMACIÓN DE LOS ALUMNOS DE POSGRADO
Rosario A. Muñoz Clares 1

ARTÍCULOS

REFLEXIONES ACERCA DE LA ESTEQUIOMETRÍA H^+/e^- y H^+/ATP DE LA CADENA RESPIRATORIA Y DE LA ATP SINTETASA
Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Guadalupe Guerra 3

BACTERIOCINAS DE BACTERIAS LÁCTICAS: BIOSÍNTESIS Y TRANSPORTE
Blanca I. Escudero Abarca y Sergio Sánchez Esquivel 12

CARACTERÍSTICAS Y FORMACIÓN DE UN DOMINIO TRANSCRIPCIONALMENTE ACTIVO EN EUCARIOTES
Viviana Valadez Graham y Félix Recillas Targa 21

CITOCINAS Y ACTIVACIÓN ENDOTELIAL
Adriana Estrada Bernal 41

TELÓMEROS Y TELOMERASA ¿LLAVES DE LA INMORTALIDAD CELULAR?
Mina Konigsberg Fainstein 50

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. INHIBIDORES FUERTEMENTE UNIDOS (PSEUDO-IRREVERSIBLES)
Raúl Covián 58

CRUCIBIOQ. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO
Yolanda Saldaña Balmori 59

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Raúl Covián 61

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 63

INFORME DE LA SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2001 (XXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA Y IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.) 64

PREMIO DE LA UNESCO PARA LA DOCTORA ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ
Leonor Fernández Rivera-Río y Yolanda Saldaña Balmori 69

PRESENTACIÓN DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA
José Víctor Calderón Salinas 70

BOLETÍN Y REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (BEB-REB)
Yolanda Saldaña Balmori 70

CONVOCATORIAS

REGISTRO DE CANDIDATOS PARA OCUPAR LA PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C. DURANTE EL BIENIO 2002-2004 72

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2002. XXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA Y X CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C. 73

PROGRAMA DE ACTIVIDADES 74

ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C. X CONGRESO 75

INVITACIÓN 77

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 79

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 80

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

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

GRACIELA MEZA RUIZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"

ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

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

ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Instituto de Fisiología Celular
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

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

MARINA GAVILANES RUIZ
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL 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

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO
Instituto de Ciencias Básicas "Victoria de Girón"
Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba

JESÚS RUBÉN GARCILASO PÉREZ
Facultad de Química
Universidad de Sonora

GUADALUPE OLIVA
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Tamps.

KATERINA LIRA RUÁN
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.

MARÍA DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires, Argentina

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).

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), 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/En trámite; Licitud de Contenido/En trámite; Reserva al título en derecho de autor No. 04-2002-030616225500-102. **Diseño:** Efrén Huerta Balderas. Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,500 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP09-0403; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente la del Comité Editorial.

EDITORIAL

LA IMPORTANCIA DE ESCRIBIR UN ARTÍCULO DE REVISIÓN EN LA FORMACIÓN DE LOS ALUMNOS DE POSGRADO

Durante los últimos 20 años el Boletín de Educación Bioquímica (BEB) ha cumplido fielmente con una de sus misiones originales de ofrecer a sus lectores, profesores y estudiantes, revisiones en español de temas de actualidad en bioquímica y áreas afines. Para ello ha contado con la participación de numerosos profesores e investigadores en el área, en su mayoría nacionales y algunos españoles y latinoamericanos. Recientemente, se ha observado un incremento en las contribuciones al BEB de estudiantes de posgrado, fundamentalmente de doctorado. Este auge se debe en gran parte a que los curricula de los nuevos programas de doctorado de la UNAM en las áreas relacionadas con la bioquímica, como, por ejemplo, los posgrados en Ciencias Bioquímicas y en Ciencias Biomédicas, contemplan como una actividad académica el que el estudiante escriba un artículo de revisión. El BEB, con su amplia difusión en la comunidad bioquímica del país, surge como una opción a tener en cuenta para la publicación de estos artículos.

La importancia de la comunicación escrita debe enfatizarse a todos los niveles de la enseñanza superior, tanto en la licenciatura como en los estudios de posgrado, ya sean estos de maestría o de doctorado. La capacidad de expresarse correctamente por escrito cada vez se aprecia más como un elemento crucial en el proceso de avance profesional. En el caso concreto de un doctor en ciencias, uno de los aspectos principales en su formación es su entrenamiento en la comunicación efectiva, tanto oral como escrita. Ello implica que el futuro doctor deberá contar con las herramientas lógicas e idiomáticas para transmitir los resultados de su propia investigación, o de otros, en forma clara, lógica y precisa. Por ello, en los estudios de doctorado es fundamental que se fomenten las actividades que lleven a la adquisición de estas herramientas, lo que en la mayor parte de los programas se hace a través de los requerimientos de presentar por escrito un proyecto de la investigación que constituirá la tesis doctoral y posteriormente reportes periódicos de los avances del proyecto para su evaluación por el Comité Tutoral, de presentar los resultados de su investigación en congresos y en revistas científicas y, finalmente, de elaborar el documento que constituye la tesis. Además, como ya se mencionó, cada vez son más los estudiantes que optan por escribir un artículo de revisión como parte de sus actividades académicas.

El Comité de Educación de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, en su reciente publicación sobre los estándares que deben regir en los estudios de doctorado[1], reconoce la necesidad de que el estudiante esté familiarizado con la literatura de su campo y de que posea habilidades de comunicación. Ambos objetivos se cumplen en gran medida con el ejercicio de escribir un buen artículo de revisión. La escritura de este tipo de artículos entraña un número importante de habilidades por parte del autor cuyo desarrollo son de gran valor para el futuro doctor. En primer lugar, debe tener la habilidad de adquirir la información necesaria mediante una búsqueda exhaustiva de la literatura científica en el tópico que se va a revisar. En segundo, de realizar una evaluación crítica de lo publicado en esa área, de manera que seleccione lo verdaderamente relevante. En tercer lugar, de llevar a

[1] Vella F, De Meis L, Mehler A H, Rombauts W, White H B y Woods E J. Standards for the Ph. D. Degree in the Molecular Biosciences (2000).

cabo una síntesis integrada de los aspectos que se quieran destacar en la revisión. Y finalmente, de identificar y poner de relieve aquellos aspectos o tendencias que aún no se hayan explorado y merezcan atención futura. La mayor parte de estas habilidades están estrechamente relacionadas con las actividades que el estudiante de doctorado debe realizar de forma cotidiana durante sus estudios. Así, el estudiante debe conocer a fondo y en extenso la literatura relevante para su proyecto de investigación, debe identificar preguntas, aún no contestadas en ese campo, y analizar sus resultados y discutir su relevancia dentro del marco de conocimiento en el área específica de su investigación. Todo ello supone un ejercicio continuo para el estudiante de doctorado, que va desde la concepción del proyecto, con la formulación de su pregunta original, hipótesis, hasta el análisis final de sus resultados y escritura de la tesis doctoral. Pero además de ello, el escribir un artículo implica seguir lineamientos editoriales a los que hay que ceñirse: número de páginas, número de figuras, forma de citar la bibliografía, entre otros; indicaciones a las que el futuro investigador estará sujeto siempre que quiera publicar en cualquier revista y que le obligan a hacer una importante labor de selección y de síntesis.

Claramente la capacidad de comunicarse efectivamente por escrito le será de enorme utilidad al estudiante de doctorado para cualquier desempeño profesional futuro, ya sea en la investigación, la docencia o industria. Sin embargo, la experiencia de la mayor parte de los tutores en el área demuestra que los estudiantes llegan a su doctorado con deficiencias de expresión, en mayor o menor grado, incluso en su propio idioma, sobre todo por escrito. Esto es una realidad no sólo en México, sino en otros países, de manera que para solucionarlo muchos posgrados cuentan con talleres de redacción. Enfrentar al estudiante al reto que supone la escritura de un artículo de revisión en su campo es una forma muy efectiva de superar estas deficiencias, con los beneficios adicionales de que este artículo puede constituir el núcleo de uno de los capítulos de su futura tesis y ayudarle a adquirir y procesar la información importante para el desarrollo de su proyecto.

El equipo editorial del BEB está consciente del valor que este tipo de publicaciones tiene para la formación del estudiante de doctorado y por ello, sin perder de vista su objetivo primordial de la actualización bioquímica de su lectores, le ofrece su apoyo para guiarlo en la publicación de sus trabajos de revisión. Con este compromiso, el BEB, ahora como Revista de Educación Bioquímica (REB), abre sus páginas a los estudiantes de doctorado del país para que en ellas publiquen artículos de revisión de interés para nuestra comunidad bioquímica.

Dra. Rosario A. Muñoz Clares,
Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México

Reflexiones Acerca de la Estequiometría H^+/e^- y H^+/ATP de la Cadena Respiratoria y de la ATP Sintetasa*

Juan Pablo Pardo[1], Federico Martínez[1] y Guadalupe Guerra[2]

RESUMEN

Para calcular el número de moléculas de ATP que se sintetizan durante la fosforilación oxidativa se necesita conocer la estequiometría H^+/e^- de los complejos respiratorios mitocondriales. A pesar de lo importante que es esta información, en la mayoría de los libros de texto de Bioquímica el tratamiento del tema deja mucho que desear, y lo único que se menciona es el concepto general de que los complejos respiratorios catalizan el bombeo de protones a través de la membrana (1-5). Sin embargo, en las ediciones más recientes de dos libros, "Lehninger Principles of Biochemistry" de Nelson y Cox (6) y "Fundamentals of Biochemistry" de Voet, Voet y Pratt (7), se reporta una estequiometría $H^+/2e^-$ de 4, 4 y 2 para los complejos I, III y IV, respectivamente. Contrario a esta información, se ha propuesto que la estequiometría del bombeo de protones es de 4, 2 y 4 (8). En este trabajo se examinan las reacciones en las que participan los complejos respiratorios y se proporcionan datos termodinámicos que sugieren que la estequiometría $H^+/2e^-$ de la cadena respiratoria mitocondrial que se debe considerar es la de 4, 2 y 4.

PALABRAS CLAVE: Cadena de transporte de electrones, bombeo de protones, síntesis de ATP, estequiometría H^+/e^-.

ABSTRACT

Knowledge about the H^+/e^- stoichiometry of the respiratory complexes is essential for the correct calculation of the number of ATP molecules synthesized during the oxidative phosphorylation. However, in most of the Biochemistry textbooks this topic is treated poorly. For example, in several books it is mentioned that the respiratory complexes pump protons across the membrane, without any reference to the number of protons translocated per electrons (1-5). In the most recent edition of "Lehninger Principles of Biochemistry" by Nelson and Cox (6) and in "Fundamentals of Biochemistry" by Voet, Voet and Pratt (7) a stoichiometry of 4, 4 and 2 for complex I, III and IV is found. On the other hand, several years ago Hinkle and coworkers proposed a 4, 2, 4 stoichiometry for the pumping of protons across the mitochondrial membrane (8). In the present work we analyze both the fate of the protons in the redox reactions catalyzed by the respiratory complexes and thermodynamic data that, all together, suggest an effective stoichiometry of 4, 2 and 4 for complex I, III and IV, respectively.

KEY WORDS: Respiratory chain complexes, proton pumps, synthesis of ATP, H^+/e^- stoichiometry.

INTRODUCCIÓN

El ATP desempeña un papel central en el metabolismo celular, ya que además de ser la moneda energética por excelencia, tiene funciones reguladoras y se usa como bloque de construcción de algunas biomoléculas, como el RNA. Dentro de su ciclo general de producción y consumo, el ATP se sintetiza en la glucólisis (por medio de la fosforilación a nivel de sustrato) y en la mitocondria (principalmente a través de la fosforilación oxidativa y a nivel de sustrato), y se consume para realizar trabajo biosintético, mecánico y osmótico, entre otros.

El modelo que se utiliza para ex-

*Recibido: 5 de octubre de 1999. Aceptado: 25 de septiembre de 2001.

[1]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-159, C. P. 04510, México, D.F. Correo E: pardov@servidor.unam.mx, fedem@servidor.unam.mx [2]Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Apartado Postal 4-870, C. P. 06400, México, D.F. Correo E: lupegs@hotmail.com

plicar la fosforilación oxidativa es el de la teoría quimiosmótica, el cual propone que el flujo de los electrones a través de los componentes de la cadena respiratoria se acopla con el bombeo vectorial de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, con lo cual se genera un gradiente de potencial electroquímico de protones que se utiliza para la síntesis de ATP.

La cadena respiratoria clásica de las mitocondrias tiene cuatro complejos que participan en la transferencia de electrones: el complejo I o NADH deshidrogenasa (9), el complejo II o succinato deshidrogenasa (10), el complejo III o citocromo bc_1 (11), y el complejo IV o citocromo oxidasa (12). De éstos, la actividad de los complejos I, III y IV se asocia con el bombeo de protones a través de la membrana. Por otro lado, la síntesis de ATP se lleva a cabo en el complejo V o ATP sintetasa (13, 14).

PROTONES VECTORIALES Y QUÍMICOS

Para calcular la relación estequiométrica entre el bombeo efectivo de protones y el transporte de electrones, hay que considerar que los H^+ pueden provenir de dos fuentes, los que se bombean (protones vectoriales), y los que forman parte de la reacción química *per se*, llamados escalares o químicos, y que se producen debido a que uno de los sustratos sólo acepta electrones. Este es el caso de la reacción en la que interviene el complejo III, y que se lleva a cabo de acuerdo con la siguiente ecuación, en la que no se incluyen los protones vectoriales:

$$QH_2 + 2\text{cit } c_{ox} \longrightarrow Q + 2\text{cit } c_{red} + 2H^+$$

Como se puede ver, al reaccionar estos sustratos se liberan dos protones al medio, inclusive en ausencia de una membrana. Como se estudiará a continuación, la presencia de estos protones escalares da lugar a varias conclusiones paradójicas.

LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES Y LAS REACCIONES QUE CATALIZAN

El complejo I bombea[1] 4 H^+ por cada par de electrones –lo que resulta en el movimiento neto de 4 cargas positivas a través de la membrana– y se transfieren 2 H^+ y 2 electrones (es decir, dos átomos de hidrógeno) a la coenzima Q o ubiquinona (6, 15). La siguiente ecuación describe la reacción que cataliza el complejo I:

$$NADH + 1H^+_N + Q + 4H^+_N \longrightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_P$$

en donde los subíndices N y P se refieren al lado negativo (matriz) y positivo (espacio intermembranal) de la membrana interna mitocondrial. En esta reacción se consume un protón escalar que originalmente se liberó durante la oxidación de un sustrato reducido, como el α-cetoglutarato, el isocitrato o el malato. Si la reacción que cataliza el complejo I se asocia con la de la oxidación de cualquiera de estas tres moléculas, se observa que hay una desaparición neta de solamente 4 H^+ en la matriz mitocondrial, ya que ese protón escalar se produce en la primer reacción y luego se consume en la segunda. Por tanto, el protón escalar que aparece en la ecuación anterior no se considerará al sumar los protones que desaparecen de la matriz mitocondrial durante la actividad de la cadena respiratoria.

El complejo III cataliza la transferencia de dos electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo *c*, como se ve en la siguiente ecuación:

$$QH_2 + 2H^+_N + 2\text{cit } c_{ox} \longrightarrow Q + 4H^+_P + 2\text{cit } c_{red}$$

En esta reacción se bombean dos H^+ vectoriales de la matriz mitocondrial hacia el lado citosólico de la membrana interna mitocondrial, y se liberan otros dos H^+ escalares en el espacio intermembranal de la mitocondria, debido a que el citocromo *c* no es un aceptor de H^+ (6, 16). En este complejo, son 2 las cargas positivas que viajan del lado N (negativo) al lado P (positivo) de la membrana. Hay que aclarar que este flujo de cargas positivas no se debe al flujo de los protones, sino al movimiento de dos electrones del lado P (positivo) al lado N (negativo) de la membrana, el cual es equivalente al flujo de 2 cargas positivas hacia el espacio intermembranal. Como se observa en la ecuación de la reacción que cataliza el complejo III, el número de H^+ que se translocan de la matriz al espacio intermembranal ($2H^+$) es diferente al número de protones que finalmente aparecen en el espacio intermembranal ($4H^+$) (6, 16).

El complejo IV recibe los electrones de cuatro moléculas de citocromo *c* para reducir a una molécula de oxígeno en dos moléculas de H_2O:

$$4\text{cit } c_{red} + 8H^+_N + O_2 \longrightarrow 2H_2O + 4\text{cit } c_{ox} + 4H^+_P$$

En este proceso se bombean cuatro H^+ al espacio intermembranal, lo que corresponde a 4 cargas

[1] En el Vol. *20*(3): 184-185, del Boletín de Educación Bioquímica se presentaron dos puntos de vista acerca del concepto del bombeo de protones en el Complejo III. Estos argumentos también se pueden aplicar al caso del Complejo I.

positivas que migran del lado N de la membrana interna mitocondrial al lado P (6, 17). Por otro lado, cuatro electrones fluyen en sentido contrario para combinarse con una molécula de oxígeno y con 4 H^+ que provienen de la matriz mitocondrial. Al igual que en el caso anterior, se considera que el movimiento de los 4 electrones es equivalente al flujo de 4 cargas positivas hacia el espacio intermembranal (17). Si se suman los movimientos de los protones con el de los electrones, se obtiene que, por cuatro electrones que se transfieren de los citocromos *c* al oxígeno, se desplazan un total de 8 cargas positivas del lado N al lado P de la membrana interna mitocondrial, se bombean 4 H^+ a través de la membrana y se consumen 4 H^+ escalares –o químicos– en la matriz mitocondrial cuando se forman las dos moléculas de agua.

EL PROBLEMA DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE PROTONES EN LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES

Para entender mejor el problema asociado con la determinación de la estequiometría $H^+/2e^-$ de los complejos respiratorios, supóngase que se desea obtener la estequiometría del bombeo de sodio y potasio por medio de experimentos cinéticos, utilizando una preparación de la ATPasa de Na^+/K^+ reconstituida en vesículas (Fig. 1), y con la siguiente reacción de transporte:

$$3\,Na_{ext} + 2K_{in} + ATP \longrightarrow$$
$$3\,Na_{in} + 2\,K_{ext} + ADP + Pi$$

Para lograr este objetivo se determina la velocidad inicial de la hidrólisis del ATP y la del transporte de Na^+ y K^+, con lo cual se obtiene una estequiometría de $3Na^+/ATP$ y $2K^+/ATP$ (18). Un punto importante en este ejemplo es que se debe tener la misma estequiometría sin importar si el flujo se determina desde afuera o desde dentro de la vesícula, es decir, determinando la desaparición del Na^+ en el medio extravesicular o la aparición del Na^+ en el interior de la vesícula.

Esto no ocurre con los complejos mitocondriales III y IV, ya que la aparición de los H^+ en el espacio intermembranal depende tanto de los H^+ bombeados como de los producidos en la reacción química de óxido-reducción. Así, si se determina la variación del pH en el espacio intermembranal, la conclusión es que el complejo III transporta $4H^+/2e^-$ y el complejo IV solamente $2H^+/2e^-$, a pesar de que el cambio en el potencial redox es mucho mayor para la reacción catalizada por el complejo IV (Fig. 1). Si ahora se cuantifican los cambios de pH en la matriz mitocondrial se obtienen unos valores diferentes: $2H^+/2e^-$ para el complejo III y $4H^+/2e^-$ para el complejo IV (Fig. 1). Por consiguiente, estas "estequiometrías de bombeo de protones" dependen de la posición del sistema de medición.

Esta incertidumbre en la definición de la estequiometría $H^+/2e^-$ desaparece cuando se determina el número de cargas positivas que fluye a través de cada uno de los complejos respiratorios. Los valores que se obtienen: $2+/2e^-$ para el complejo III y $4+/2e^-$ para el complejo IV, no dependen de si se estudia este movimiento de cargas desde la matriz mitocondrial o desde el espacio intermembranal. Por esta razón, parece más lógico definir el bombeo efectivo de protones en términos de las cargas positivas que se mueven a través de la membrana, el cual se relaciona con el desplazamiento de los protones y/o electrones a través de la misma (8).

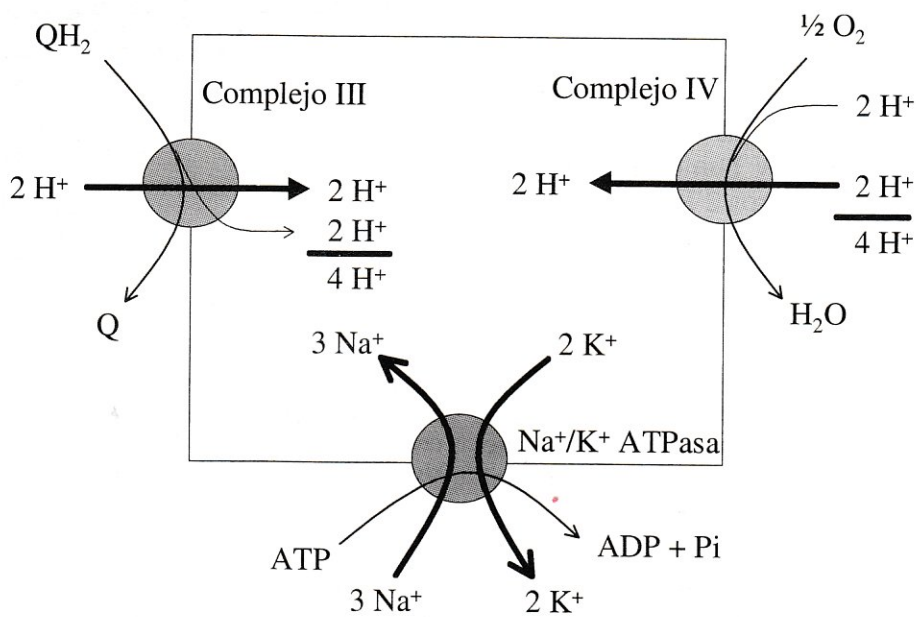


Figura 1. *Esquema de la bomba de Na^+/K^+, del complejo III y del complejo IV. Para fines de ilustración, solamente se considera el orígen y destino de los protones en las reacciones catalizadas por el complejo III y el IV, por lo que se incluye al quinol y al oxígeno pero no al citocromo c. Para el caso de los complejos mitocondriales, el interior de la vesícula corresponde al espacio intermembranal, mientras que el exterior a la matriz mitocondrial.*

LA ESTEQUIOMETRÍA EFECTIVA $H^+/2e^-$ ES DE 4, 2 Y 4 PARA EL COMPLEJO I, III Y IV, RESPECTIVAMENTE

Como se habrá notado, el cálculo de la estequiometría del bombeo de protones del complejo III y IV se dificulta por la presencia de los protones escalares. Sin embargo, este problema se soluciona cuando se relacionan las cargas positivas que se translocan a través de cada complejo con la suma total de protones que desparecen de la matriz mitocondrial y que aparecen en el espacio intermembranal. Como se puede ver en la figura 2, son 10 las cargas positivas que fluyen del lado N al lado P de la membrana interna mitocondrial y son 10 los protones que desaparecen de la matriz mitocondrial y que aparecen en el espacio intermembranal.

De estas 10 cargas positivas que fluyen a través de la membrana, 4 lo hacen a través de la NADH deshidrogenasa, 2 a través del citocromo bc_1 y 4 a través de la citocromo oxidasa. Por otro lado, de los 10 protones, el complejo I bombea 4 H^+, mientras que el complejo III y el complejo IV bombean 2 H^+ cada uno. Los otros 2 H^+ que aparecen en el lado citosólico de la membrana interna mitocondrial son escalares y provienen de la reacción catalizada por el complejo III. Asimismo, los otros 2 H^+ que desaparecen en la matriz mitocondrial son los protones escalares o químicos que se consumen en la formación del agua en la reacción de la citocromo oxidasa.

El siguiente paso consiste en relacionar las cargas positivas con los protones que se translocan a través de la membrana. Se puede ver que cuatro de estas cargas positivas se relacionan con el bombeo de 4 H^+ por el complejo I ($4H^+/2e^-$). A las

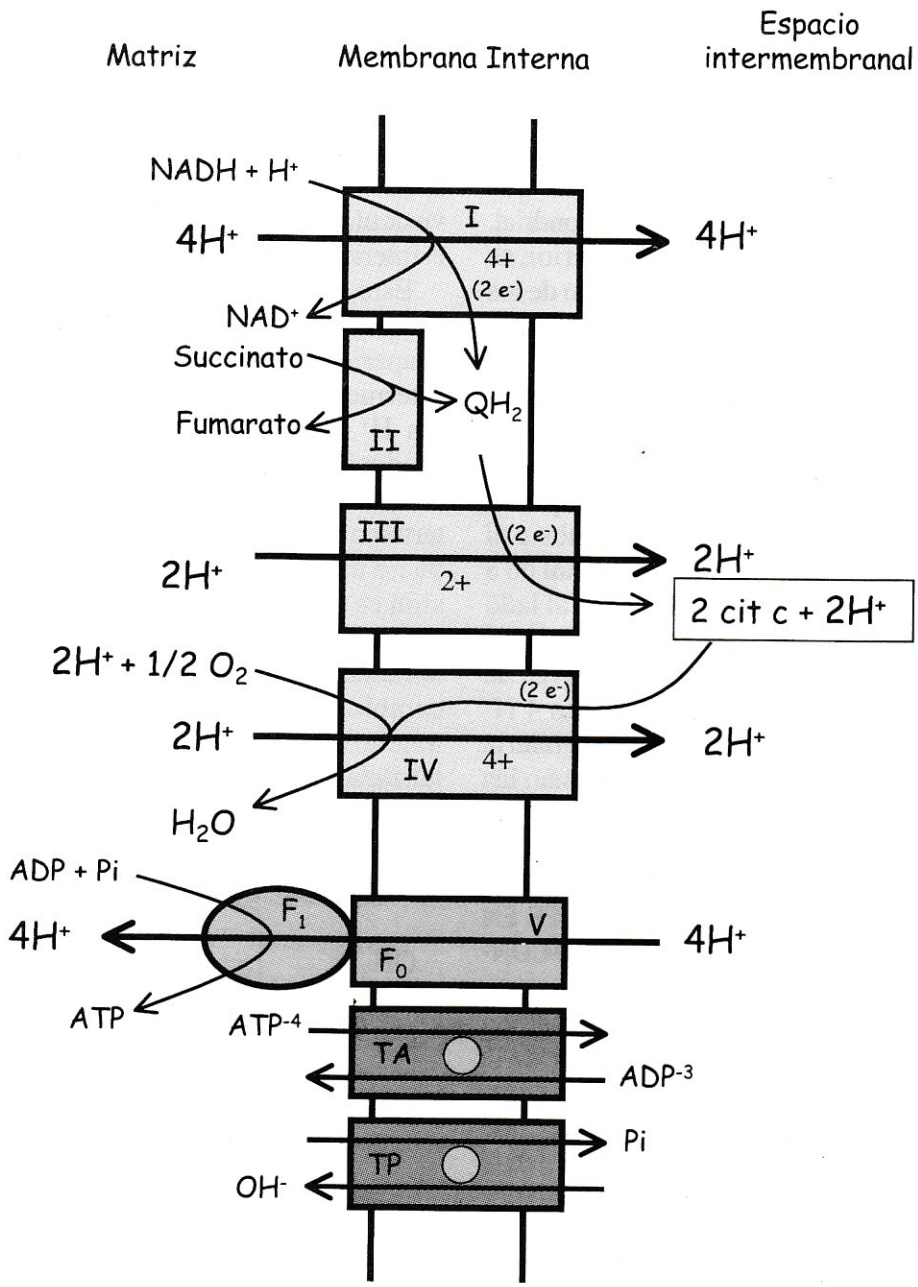


Figura 2. *El transporte de H^+ en la mitocondria. Las flechas curvas representan el camino que siguen los electrones entre los componentes de la cadena respiratoria, comenzando en el NADH y terminando en el H_2O. Estas flechas no tienen ningún significado mecanístico, por lo que no se les debe asociar con el movimiento de electrones a través de la membrana, fenómeno que ocurre durante el ciclo catalítico de cada uno de los complejos involucrados en el bombeo de protones. Las flechas gruesas muestran el bombeo de H^+ a través de la membrana en cada uno de los complejos respiratorios y en la ATP sintetasa. Además, entre paréntesis se indica el número de cargas positivas que se mueven a través de la membrana durante el ciclo catalítico de cada uno de los complejos. De esta manera, la estequiometría efectiva del transporte de H^+ por par de electrones es la siguiente: 4 en el complejo I, 2 en el complejo III y 4 en el complejo IV. Tres protones se requieren para la síntesis del ATP en la matriz mitocondrial y un protón para el transporte del ATP, el ADP y el Pi. TA = Translocador de adenín nucleótidos; TP = Transportador de fosfato (Figura tomada de la referencia 8).*

dos cargas positivas que se mueven en el complejo III se les asignan los 2 H^+ vectoriales que el mismo complejo III bombea ($2H^+/2e^-$). Por último, al complejo IV se le asignan los 2 H^+ escalares que desaparecen del lado N de la membrana y los 2 H^+ que aparecen en el lado P, por lo que ahora el movimiento de cargas positivas (4+) en la citocromo oxidasa se iguala al movimiento de protones ($4H^+$), lo que resulta en una estequiometría de $4H^+/2e^-$ para este complejo. En resumen, las estequiometrías efectivas $H^+/2e^-$ para el complejo I, III y IV son de 4, 2 y 4, respectivamente (Fig. 2).

CONSIDERACIONES TERMODINÁMICAS

Hay varias consideraciones termodinámicas que apoyan un mayor bombeo de protones en los complejos I y IV. El cambio de potencial redox estándar para la reacción catalizada por el complejo I es de +0.365 V, para la del complejo III es de +0.209 V y para la del complejo IV es de +0.562 V (6). De estos valores resulta un cambio de energía libre estándar de reacción de 16.8, 8.1 y 27.7 kcal/mol para las reacciones en las que participan el complejo I, III y IV, respectivamente. Por otro lado, se ha reportado que la diferencia de potencial eléctrico en la membrana interna mitocondrial es de 150 mV, y que el ΔpH es de 0.5 a 1 unidad (19, 20), por lo que la diferencia de potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu$) a través de la membrana interna mitocondrial varía de 4.1 a 4.8 kcal/mol. De este modo, el bombeo de protones a través de la membrana está limitado por el ΔG° de la reacción y el $\Delta\mu$. Por otro lado, el máximo número de protones transportados por cada complejo se puede calcular con la siguiente ecuación (21):

$$n = (\Delta G^\circ/\Delta\mu)_{equilibrio}$$

en donde n es el número de protones bombeados por el complejo, $\Delta\mu$ la diferencia de potencial electroquímico de los protones y ΔG° el cambio de energía libre estandar de la reacción. La tabla I resume los resultados de este análisis (si se supone un valor promedio de 4.4 kcal/mol para el $\Delta\mu$) y muestra que el complejo I puede bombear hasta 4 protones, el complejo III no más de dos protones y el complejo IV tiene la capacidad de bombear hasta 6 protones. Estos resultados concuerdan con la estequiometría de 4, 2 y 4 reportada en 1991 por Hinkle y colaboradores (8), en donde se define el término de bombeo efectivo de protones. Con este término se quiere señalar que los complejo III y IV están trabajando como si bombearan 2 y 4 protones a través de la membrana, respectivamente.

Cabe mencionar que si se acepta la estequiometría de 4, 4 y 2 se cae en otra contradicción, ya que el complejo que cataliza la reacción con un ΔE° más pequeño bombea $4H^+$, mientras que el que cataliza la reacción con el ΔE° más grande solamente dos. De esta manera, se considera implícitamente que el complejo III, con una estequiometría de $4H^+/2e^-$, contribuye con un 40% a la fuerza protonmotriz de la mitocondria, mientras que el complejo IV ($2H^+/2e^-$) solamente con un 20%. Sin embargo, un análisis más cuidadoso muestra que la citocromo oxidasa mueve 4 cargas positivas a través de la membrana, por lo que debe de contribuir con un porcentaje mayor a la fuerza protonmotriz, ya que ésta está constituida principalmente por el potencial de membrana ($\Delta\Psi$ = 80% y ΔpH = 20%, suponiendo que el $\Delta\Psi$ es de 150 mV y el ΔpH es de 0.5 unidades). Hay otros puntos que dan lugar a confusión: si el complejo III transporta dos cargas positivas y 4 H^+... ¿en dónde quedaron las dos

TABLA I

CARACTERÍSTICAS TERMODINÁMICAS DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR EL COMPLEJO I, III y IV

COMPLEJO	REACCIÓN CATALIZADA	ΔE° (V)	ΔG° (kcal/mol)	n ($H^+/2e^-$)
I	$NADH + Q + H^+ \longrightarrow NAD^+ + QH_2$	0.365	–16.8	3.8
III	$QH_2 + 2cit\ c_{ox} \longrightarrow Q + 2H^+ + 2cit\ c_{red}$	0.209	– 8.1	1.8
IV	$2cit\ c_{red} + 2H^+ + \frac{1}{2} O_2 \longrightarrow H_2O + 2cit\ c_{ox}$	0.562	–27.7	6.3

El ΔG° de la reacción se obtuvo con la siguiente ecuación: $\Delta G^\circ = -mF\Delta E^\circ$, en donde F es la constante de Faraday y m el número de electrones que participan en la reacción. n corresponde a la relación estequiométrica entre el número de protones bombeados y el par de electrones transferidos durante la reacción de oxidorreducción.

cargas positivas de los dos protones adicionales? Lo mismo ocurre con el complejo IV: si éste mueve 4 cargas positivas y transporta solamente dos H^+....¿en dónde quedaron los dos H^+ que supuestamente deberían estar asociados a esas cargas?

ESTEQUIOMETRÍA DE LA ATP SINTETASA

Con respecto a la ATP sintetasa, se ha observado que ésta puede trabajar con diferentes estequiometrías, dependiendo de la procedencia de la enzima y del medio ambiente en el que se desarrolló el organismo (22). En la mayoría de los libros se considera que se requieren 3 H^+ para la síntesis de una molécula de ATP, y ciertamente esta es la situación que prevalece en las mitocondrias de los mamíferos (22). Sin embargo, la estructura del sector F_0 de la ATP sintetasa (23) así como experimentos que se realizaron con la ATP sintetasa de cloroplastos y de cianobacterias (24), sugieren que la estequiometría de este complejo puede tomar valores de $4H^+$/ATP.

Si se considera que la estequiometría de la ATP sintetasa en las mitocondrias es de $3H^+$/ATP y que se requiere del flujo de un protón para el transporte del ATP, del ADP y del Pi a través de la membrana interna mitocondrial (Fig. 2), entonces la síntesis de un ATP consume un total de 4 H^+. Si por cada NADH que se oxida en la cadena respiratoria se bombean 10 protones al espacio intermembranal, el máximo de moléculas de ATP que se pueden sintetizar es de 2.5 (10/4 = 2.5). Asimismo, si por cada $FADH_2$ que entra a la cadena respiratoria se bombean 6 protones, el total de moléculas de ATP que se sintetizan es de 1.5 (6/4 = 1.5).

PRODUCCIÓN NETA DE ATP EN LA OXIDACIÓN DE LA GLUCOSA Y DEL ÁCIDO PALMÍTICO

Si se fija la estequiometría de la ATP sintetasa en $3H^+$/ATP, entonces la oxidación completa de un mol de glucosa produce 29 moles de ATP y la de un mol de ácido palmítico produce 104 moles de ATP. Estos valores contrastan con los 36 moles

TABLA II

PRODUCCIÓN DE ATP EN LA OXIDACIÓN DE LA GLUCOSA A CO_2 Y H_2O

REACCIÓN	CONSUME	PRODUCE	NÚMERO DE H^+ BOMBEADOS	SÍNTESIS DE ATP O EQUIVALENTE
Glucosa → Glucosa-6-fosfato	ATP	ADP + Pi		–1
Fructosa-6-fosfato → Fructosa-1,6-bisfosfato	ATP	ADP + Pi		–1
Gliceraldehído-3-fosfato → 1,3-bisfosfoglicerato	2 NAD^+	a) 2 ($NADH + H^+$) b) 2 ($NADH + H^+$)	a) 12 b) 18	a) 3 b) 4.5
1,3-bisfosfoglicerato → Piruvato	4 ADP	4 ATP		4
$Piruvato_c$ → $Piruvato_m$	2 H^+ = 0.5 ATP			–0.5
Piruvato → Acetil-CoA	2 NAD^+	2 ($NADH + H^+$)	20	5
Isocitrato → α-cetoglutarato	2 NAD^+	2 ($NADH + H^+$)	20	5
α-cetoglutarato → Succinil-CoA	2 NAD^+	2 ($NADH + H^+$)	20	5
Succinil-CoA → Succinato	2 (GTD + Pi)	2 GTP		1.5*
Succinato → Fumarato	2 FAD	2 $FADH_2$	12	3
Malato → Oxaloacetato	2 NAD^+	2 ($NADH + H^+$)	18	4.5
Moléculas de ATP gastado	2.5			
Moléculas de ATP sintetizado	a) 31.5, b) 33			
Síntesis neta de ATP	**a) 29, b) 30.5**			

a) Los hidrógenos ingresan a la mitocondria a través de la lanzadera del glicerol fosfato, transfiriéndolos al FAD.
b) Los hidrógenos ingresan a la mitocondria por la lanzadera de glutamato/malato, obteniéndose NADH + H^+ intramitocondrial, pero con el gasto de un H^+ en el transporte del glutamato.
*Aunque se sintetizan 2 moles de ATP, se gastan $2H^+$ (–0.5 ATP) para que estos 2 ATP salgan de la mitocondria.

TABLA III

OBTENCIÓN DE ENERGÍA EN FORMA DE ATP EN LA OXIDACIÓN COMPLETA DEL ÁCIDO PALMÍTICO A CO_2 Y H_2O

REACCIÓN	CONSUME	PRODUCE	NÚMERO DE H^+ BOMBEADOS	SÍNTESIS DE ATP O EQUIVALENTE
Ácido palmítico → Palmitil-CoA (Acil-CoA)	ATP	AMP + 2 Pi		
Acil-CoA → Enoil-CoA	7 FAD	7 $FADH_2$	42	10.5
Hidoxiacil-CoA → Cetoacil-CoA	7 NAD^+	7 ($NADH + H^+$)	70	17.5
Isocitrato → α-cetoglutarato	8 NAD^+	8 ($NADH + H^+$)	80	20
α-cetoglutarato → Succinil-CoA	8 NAD^+	8 ($NADH + H^+$)	80	20
Succinil-CoA → Succinato	8 (GDP + Pi)	8 GTP		6*
Succinato → Fumarato	8 FAD	8 $FADH_2$	48	12
Malato → Oxaloacetato	8 NAD^+	8 ($NADH + H^+$)	80	20
Moléculas de ATP gastado	2			
Moléculas de ATP sintetizado	106			
Síntesis neta de ATP	**104**			

*Aunque se sintetizan 8 moles de ATP, se gastan 8H^+ (–2 ATP) para que estos 8 ATP salgan de la mitocondria.

de ATP que se describen en la mayoría de los libros para la oxidación de la glucosa y los 129 moles de ATP para el ácido palmítico (Tabla II y III).

Para la oxidación de la glucosa, el cálculo anterior se basó en la producción de 8 moles de NADH en la matriz mitocondrial, 2 moles de $FADH_2$, 2 moles de NADH citosólico cuyos electrones se transfieren a la cadena respiratoria a través de la lanzadera de glicerofosfato, 2 moles de ATP citosólico debido a la fosforilación a nivel de sustrato y otros dos moles de GTP en la matriz mitocondrial en una reacción catalizada por la succinil-CoA sintetasa. Posteriormente, la nucleósido difosfocinasa cataliza la síntesis de ATP a partir del GTP. Aquí se debe considerar que se gastan 2 protones para el transporte de estas dos moléculas de ATP al citosol, por lo que la cantidad total de ATP que se produce por la fosforilación oxidativa disminuye en 0.5. Además, se tomaron en cuenta los 2 H^+ (0.5 ATP) que se utilizan en el transporte de dos moléculas de piruvato.

Si el NADH citosólico se oxida por la lanzadera de malato-aspartato, entonces se sintetizan 4.5 moles de ATP por los dos moles de NADH citosólico, ya que el intercambiador de glutamato/aspartato está acoplado al flujo de un protón por glutamato (25), de tal manera que el rendimiento global aumentaría a 31 moles de ATP por mol de glucosa oxidada.

FOSFORILACIÓN A NIVEL DE SUSTRATO Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA: ¿CUÁL ES LA MÁS EFICIENTE?

En una primera aproximación se podría pensar que la fosforilación oxidativa es la vía que trabaja con más eficiencia, es decir, que aprovecha, para la síntesis de ATP, una proporción mayor de la energía libre que se desprende durante la reacción de oxidación. Sin embargo, éste no es el caso. Para calcular la eficiencia de la síntesis de ATP en cada proceso se necesita la siguiente información: 1.– los $\Delta G^{o'}$ para la transformación de la glucosa en lactato y para la oxidación del piruvato hasta CO_2 y H_2O; y 2.– el $\Delta G^{o'}$ de hidrólisis del ATP. El cociente de estos dos valores determina la eficiencia termodinámica de la reacción en condiciones estándar.

Con respecto al primer punto, la transformación de un mol de glucosa en dos moles de lactato libera 47 kcal de energía libre, mientras que en la oxidación completa de 2 moles de piruvato a 6 moles de CO_2 y 4 de agua se liberan 566 kcal. Si se supone que se necesitan 7.5 kcal de energía libre para sintetizar un mol de ATP, entonces la eficiencia de la fosforilación a nivel de sustrato es de 32% (2 x 7.5/47) mientras que para la fosforilación oxidativa es de 33% (25 x 7.5/566), ya que se utilizan 4 H^+ para la síntesis de ATP. Este valor se parece al de la fosfori-

lación a nivel de sustrato, pero hay que hacer notar que corresponden a un límite superior, ya que hasta un 25% del gradiente electroquímico de protones se disipa por difusión pasiva de los H^+ (26), lo que reduce todavía más la eficiencia de la fosforilación oxidativa.

CONCLUSIÓN

Aunque con las dos estequiometrías (4, 4, 2 vs 4, 2, 4) se transloca el mismo número de protones a través de la membrana interna mitocondrial (10 H^+), es importante definir la capacidad de bombeo efectivo de cada complejo. El análisis de las reacciones químicas de cada complejo con sus consideraciones termodinámicas sugieren que la estequiometría que se debe aceptar es la de $4H^+/2e^-$ para el complejo I y IV y de $2 H^+/2e^-$ para el complejo III. Es decir, que los complejos III y IV tienen un bombeo efectivo de protones de 2 y 4, respectivamente. Por otro lado, el conocimiento de la estequiometría del bombeo de protones acoplado al transporte de electrones a través de los complejos respiratorios, nos permite tener parámetros cuantitativos acerca del rendimiento del metabolismo energético en relación con la síntesis de ATP, con lo que se podrán evaluar nuevamente los valores nutricionales de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo que recibieron de la UNAM a través de la DGAPA (IN200897 para JPPV; IN202496 e IN200399 para FMM) y del CONACyT (26096M para FMM).

REFERENCIAS

1. Baynes J y Dominiczak M H (1999) Medical Biochemistry. Mosby, Basildon, Inglaterra. pp 83-96.
2. Stryer L (1995) Biochemistry. 4ª Ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA. pp 528-558.
3. Devlin T M (editor) (1997) Textbook of Biochemistry with clinical correlations. 4ª Ed. John Wiley and Sons.
4. Murray R K, Mayes P A, Granner D K y Rodwell V W (2001) Bioquímica de Harper. 15ª Ed. Editorial El Manual Moderno, México, D.F. México. pp 161-174.
5. Mathews C K y van Holde K E (1996) Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
6. Nelson D L y Cox M M (2000) Lehninger principles of Biochemistry. 3ª Ed. Worth Publishers, New York, NY, USA. pp 659-721.
7. Voet D, Voet J y Pratt C W (1999) Fundamentals of Biochemistry. John Wiley and Sons Inc. New York, NY, USA. pp 500-511.
8. Hinkle P C, Kumar M A, Resetar A y Harris D L (1991) Mechanistic Stoichiometry of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. Biochemistry *30*: 3576-3582.
9. Grigorieff N (1999) Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase. Curr Opin Struct Biol *9*: 476-483.
10. Hägerhäll C (1997) Succinate:quinone oxidoreductases Variations on a conserved theme. Biochim Biophys Acta *1320*: 107-141.
11. Iwata S, Lee J W, Okada K, Lee J K, Iwata M, Rasmussen B, Link T A, Ramaswamy S y Jap B K (1998) Complete structure of the II-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. Science *281*: 64-71.
12. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R y Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. Science *272*: 1136-1144.
13. Abrahams J, Leslie A, Lutter R y Walker J (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria. Nature *370*: 621-628.
14. Rastogi V K y Girvin M E (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. Nature *402*: 263-268.
15. Dutton P L, Moser C C, Sled V D, Daldal F y Ohnishi T (1998) A reductant-induced oxidation mechanism for Complex I. Biochim Biophys Acta *1364*: 245-257.
16. Trumpower B L (1990) The protonmotive Q Cycle. J Biol Chem *265*: 11409-11412.
17. Gennis R B (1998) How does cytochrome oxidase pump protons? Proc Natl Acad Sci USA *95*: 12747-12749.

18. Garrahan, P J y Glynn I M (1967) The stoichiometry of the sodium pump. J Physiol *192*: 217-235.

19. Soboll S (1995) Regulation of energy metabolism in liver. J. Bioenerg. Biomemb *27*: 571-582.

20. Lemasters J J, Chacon E, Ohata H, Harper I S, Nieminen A, Tesfai S A y Herman B (1995) Measurement of electrical potential, pH, and free calcium ion concentration in mitochondria of living cells by laser scanning confocal microscopy. Meth Enzymol *260*: 428-444.

21. Cramer W A y Knaff D B (1991) Energy transduction in biological membranes. A textbook of Bioenergetics. Springer-Verlag, New York, NY, USA. pp 3-21.

22. Tomashek J J y Brusilow W S (2000) Stoichiometry of the energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. J Bioenerg Biomemb *32*: 493-500.

23. Fillingame R H, Jiang W y Dmitriev O Y (2000) Coupling H^+ transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor. J Exp Biol *203*: 9-17.

24. Van Walraven H S, Strotmann H, Schwarz O y Rumberg B (1996) The H^+/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. FEBS Lett *379*: 309-313.

25. LaNoue K F, Meijer A J y Brouwer A (1974) Evidence for electrogenic aspartate transport in rat liver mitochondria. Arch Biochem Biophys *161*: 544-550.

26. Rolfe D F S, y Brand M D (1996) Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. Am J Physiol *271* (Cell Physiol 40): C1380-C1389.

REB 21(1): 12-20

BACTERIOCINAS DE BACTERIAS LÁCTICAS: BIOSÍNTESIS Y TRANSPORTE*

Blanca I. Escudero Abarca[1] y Sergio Sánchez Esquivel[2]

RESUMEN

La síntesis de un gran número de bacteriocinas se basa en una estructura genética general, codificada en plásmidos o en el cromosoma. Dicha estructura comprende los siguientes genes organizados en uno o dos operones: a) gen estructural, b) gen de inmunidad c) gen que codifica para un sistema de transporte específico para ABC y d) genes que codifican para proteínas accesorias. En el caso de la nisina, sus determinantes genéticos se localizan en un transposón integrado al cromosoma en forma de agrupaciones de genes, en los que, además, existen otros que codifican a las proteínas encargadas de las reacciones de modificación postraduccional. Las bacteriocinas se sintetizan en forma de precursores (prebacteriocinas), en donde la región que dará lugar a la bacteriocina (probacteriocina) está unida a una secuencia líder N-terminal (del tipo doble glicina para bacteriocinas de clase IIa) de aproximadamente 14 a 30 residuos, que es removida durante su maduración.

PALABRAS CLAVE: Bacteriocina, bacterias ácido lácticas, secuencia líder, doble glicina, transportador ABC.

ABSTRACT

The biosynthesis of many bacteriocins is based on a general genetic structure, encoded either on plasmids or in chromosomes. This structure comprises the following genes organized in one or two operons: a) the structural gene encoding the prebacteriocin, b) the immunity gene, c) a gene encoding a specific ABC-transporter and d) genes encoding accessory proteins. For nisin, the genetic determinants are located on a transposon inserted in the chromosome, comprising a group of genes that also encode proteins involved in posttranslational modification reactions. The bacteriocins are synthesized as precursors (prebacteriocins). The section, giving origin to the bacteriocin (probacteriocin) is joined to a leader N-terminal sequence (of the double glycine type for class IIa bacteriocins) of 14 to 30 amino acid residues, which is removed during maturation.

KEY WORDS: Bacteriocin, lactic acid bacteria, leader peptide, double glycine, ABC transporter.

INTRODUCCIÓN

El papel que desempeñan las bacterias lácticas en la fermentación de alimentos es de gran importancia, ya que de forma natural, o bien añadidas intencionalmente, influyen no sólo en el desarrollo de características organolépticas, sino que les pueden conferir a los mismos ciertas propiedades probióticas, benéficiosas para la salud de los consumidores. Además poseen un gran potencial para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. Su efecto antimicrobiano ha sido apreciado por el hombre desde hace más de 10,000 años, siendo el ácido láctico el principal producto antimicrobiano generado por la fermentación de los carbohidratos y la consecuente disminución del pH. Sin embargo las bacterias ácido lácticas también producen otras sustancias potencialmente antimicrobianas como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo y las bacteriocinas.

1. DEFINICIÓN DE BACTERIOCINA

El término bacteriocina, fue aplicado desde hace más de 40 años a antibióticos proteicos, caracteriza-

*Recibido: 19 de octubre de 2000. Aceptado: 17 de julio de 2001.

[1]Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Instituto Tecnológico de Veracruz. Apartado Postal 1420, Veracruz, Ver., México. Correo E: escudero@itver.edu.mx [2]Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, C. P. 04510, México, D.F. Correo E: sersan@servidor.unam.mx

dos por un peso molecular relativamente elevado, espectro de actividad muy reducido (predominantemente intraespecífico), adsorción a receptores específicos y cuyos determinantes genéticos se localizaban a nivel de plásmido. Se pensaba que la desrepresión y acumulación en la biosíntesis de bacteriocinas podía conllevar a una lisis parcial de las células productoras de dicha bacteriocina (biosíntesis letal). A medida que se ha ido acumulando información sobre la estructura y la función de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, se ha hecho evidente que el término agrupa a una gran variedad de macromoléculas, muchas de las cuales difieren considerablemente de la definición de bacteriocina basada en las colicinas. Tagg en 1976, las definió como proteínas o complejos proteicos con actividad antimicrobiana sobre especies relacionadas genéricamente a las cepas productoras. En 1982, Koninsky las definió como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora y Klaenhammer en 1988, como un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza proteica que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas. Actualmente se considera que las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosómico y que, posteriormente, pueden sufrir modificaciones postraduccionales (1-3).

2. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se han clasificado en 3 grandes grupos, como se señala en la tabla I (4). A esta clasificación habría que añadir aquellos péptidos pequeños termoestables y sin residuos modificados que carecen de la secuencia consenso y que tienen un espectro de actividad muy reducido como la lactococcina A y otras bacteriocinas no clasificables

TABLA I

CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

CLASE	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLO
Clase I o lantibióticos	Péptidos pequeños, (–5kDa), termoestables y con aminoácidos modificados como la deihidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB), la lantionina o la β-metil-lantionina.	Nisina
Clase II	Péptidos pequeños, termoestables y sin residuos modificados, que se subdividen en 3 subclases:	
	IIa: que poseen la secuencia consenso YYGNGV en la parte N-terminal y una gran actividad anti-*Listeria*. También se conoce como «familia pediocina».	Pediocina PA-1, Sakacina A, Sakacina P, Leucocina A, Curvacina A Lactacina F
	IIb: Su actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos.	Lactococcina B
	IIc:Incluye a las bacteriocinas de la clase II transportadas mediante un sistema sec-dependiente.	Helveticina J. Acidofilina A, Lactacina A y B
Clase III	Proteínas de más de 30 kDa, termolábiles y sin aminoácidos modificados.	

según este esquema, como la enterocina L50 o la AS-48. Las bacteriocinas de clase I y II son las más estudiadas porque son las más abundantes y se consideran los candidatos con mayor potencial para la industria alimentaria. En los últimos 10 años, se ha avanzado mucho sobre el conocimiento de ellas acerca de su procesamiento, mecanismo de secreción, inmunidad celular y relación estructura-función. Paralelamente ha habido un incremento sobre los estudios de su uso en alimentos. En esta revisión se hablará sobre la biosíntesis de nisina por ser ésta la única bacteriocina que se utiliza en alimentos (leche, yoghurt, queso fundido, cárnicos, pescado, vegetales enlatados, cerveza, vino, licores de frutas y postres, entre otros) y de las bacteriocinas de la clase IIa por presentar una fuerte actividad antagónica contra *Listeria monocytogenes*, patógeno de alimentos, causante de listeriosis, enfermedad que se manifiesta por síndromes como infección del embarazo, meningoencefalitis e infecciones focales en niños y adultos que padecen una enfermedad, teniendo así un potencial de uso en la industria alimentaria.

3. BIOSÍNTESIS DE NISINA

Los determinantes genéticos de la biosíntesis de una bacteriocina se pueden localizar a nivel plasmídico, cromosómico o en transposones (generalmente insertados de forma muy estable en el cromosoma de las células hospedadoras) como sucede para el caso de nisina, con un tamaño de 70 kb. En ese mismo transposón se localizan genes involucrados en la fermentación de sacarosa (Fig. 1). Se han identificado 11 genes relacionados con la biosíntesis de la nisina, que incluyen a los genes implicados en la maduración, secreción, procesamiento, regulación e inmunidad a la misma. Si bien los genes involucrados en la biosíntesis de lantibióticos se encuentran agrupados, no está claro si constituyen un operón verdadero. Hay evidencia de que los genes son transcritos de manera coordinada como una sola molécula de ARNm.

La nisina, pertenece al grupo de los lantibióticos (denominados así por contener aminoácidos no usuales como la lantionina), y es un péptido formado por 34 aminoácidos. Es producido por algunas cepas de *Lactococcus lactis*. Su molécula contiene aminoácidos no usuales que incluyen además de lantionina, 4 beta-metil-lantioninas, una dehidrobutirina (Dhb), y dos dehidroalaninas (Dha). Estos últimos aminoácidos se producen de la deshidratación de serina y treonina (Fig. 2). La condensación de Dha y Dhb con cisteína, genera enlaces tioéster y los aminoácidos lantionina y beta metil-lantionina, respectivamente, los cuales son el resultado de modificaciones post-traduccionales.

Actualmente ha habido un avance espectacular sobre la síntesis de la nisina. Se sabe que existen dos variantes naturales, la nisina A y la nisina Z, codificadas por los genes *nisA* y *nisZ*. Estos genes han sido clonados y secuenciados y difieren sólo en un par de bases. La nisina Z contiene un residuo de asparagina en la posición 27 en lugar de un residuo de histidina que se encuentra en la nisina A. No se han encontrado ambos genes en el mismo operón.

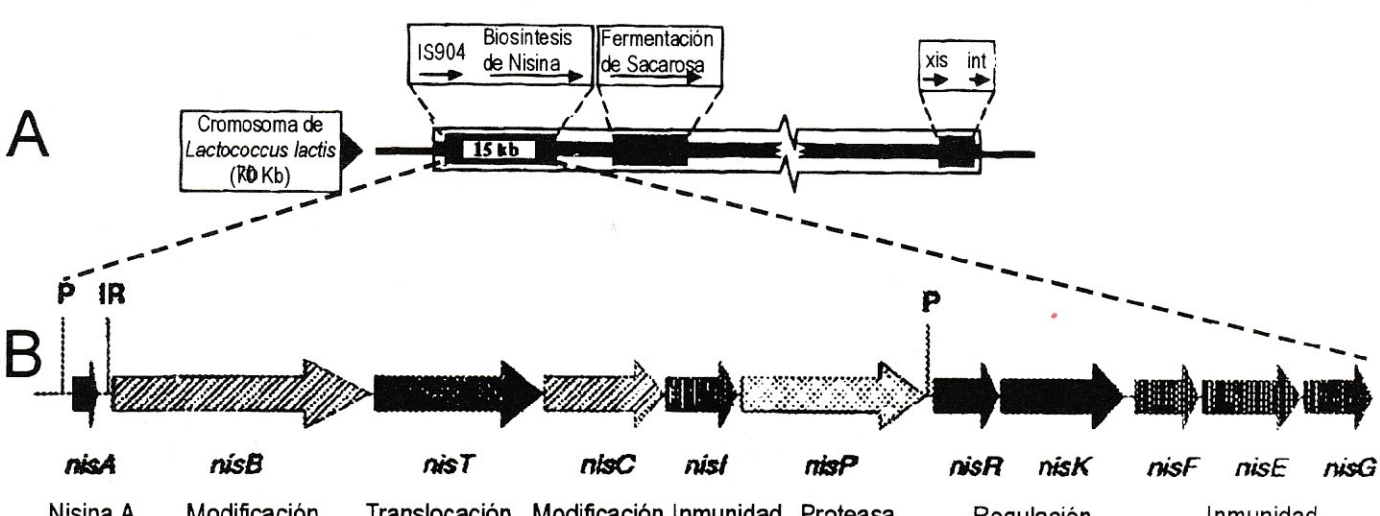


Figura 1. *A) Transposón de 70 kb insertado en el cromosoma de* Lactococcus lactis. *B) Organización de los genes que intervienen en la biosíntesis de nisina. P= promotor, IR= secuencia repetida invertida que puede actuar como terminador rho-dependiente (modificado de la referencia 5).*

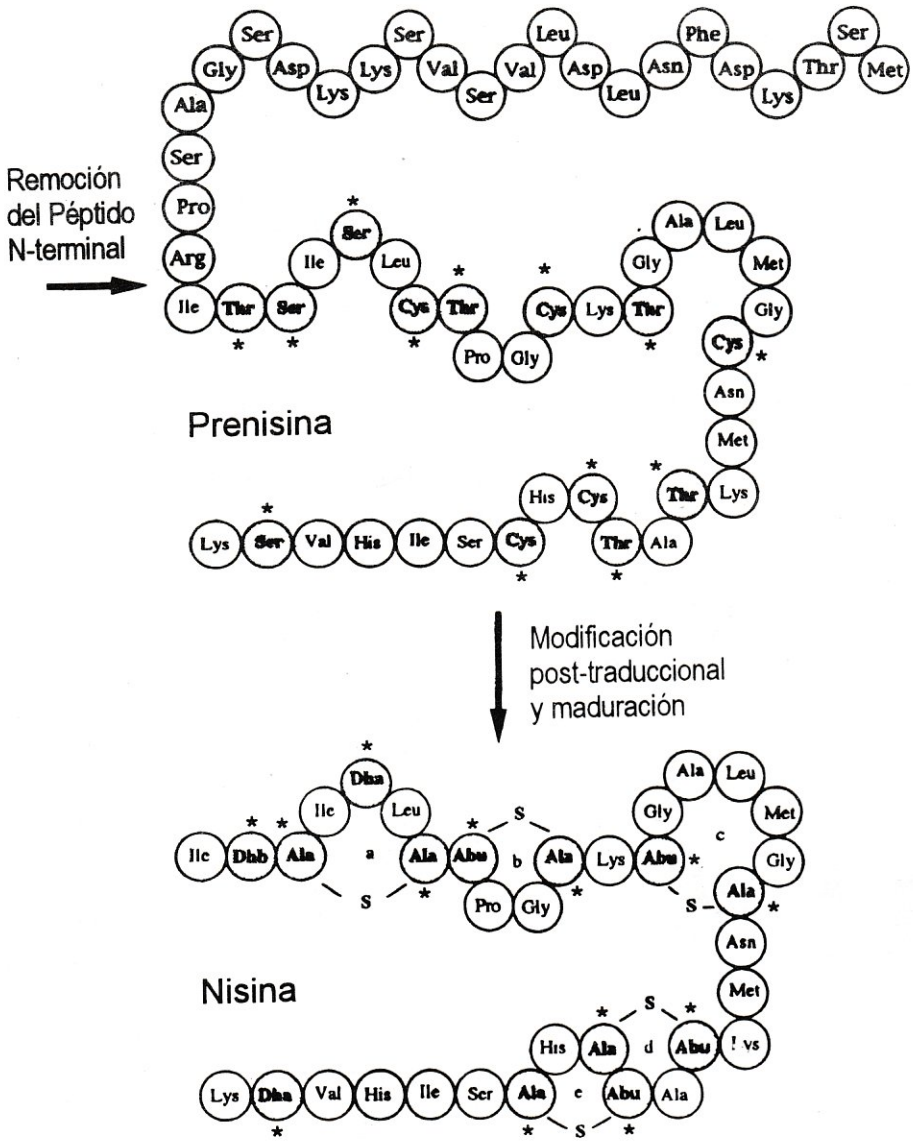


Figura 2. *Estructura de las moléculas de prenisina A y nisina A. Los residuos sombreados y con asterisco en la molécula de prenisina sufren reacciones de modificación. a-e= anillos de lantionina, Dha=deshidroalanina, Dhb=deshidrobutirina, Abu-S-Ala=beta-metil lantionina, Ala-S-Ala= lantionina (modificado de la referencia 5).*

La figura 3 representa un modelo de la biosíntesis de nisina en donde se muestran las diferentes proteínas del agrupamiento de genes involucrados en su síntesis. Curiosamente en el caso de la nisina, la propia bacteriocina actúa como feromona inductora de su propia biosíntesis (5, 6).

Gen estructural: *nis*A

El producto del gen *nis*A es un péptido de 57 residuos de aminoácidos, ello confirma que la molécula madura de nisina resulta de la modificación del precursor. La secuencia del péptido líder es muy hidrofílica y fuertemente cargada, no contiene cisteína y probablemente se pliega en medios ambientes anfifílicos, es decir, que tienen afinidad tanto a regiones hidrofílicas (polares) o lipofílicas (no polares). Por el contrario, la secuencia de la prenisina es lipofílica y su estructura secundaria es caracterizada por giros beta y ausencia de alfa-hélices (7).

Gen *nis*B

Este gen se localiza a 108 pb hacia la región 3' de la secuencia de ADN, al final del gen *nis*A. Tiene una longitud de 2556 pb, codifica una proteína de 852 residuos de aminoácidos (en el gen descrito para *L. lactis* ATCC 11454) con un peso molecular de 100.5 kDa, la cual es un fuerte candidato para la modificación post-traduccional de la prenisina. La proteína NisB contiene varias regiones hélices con carácter anfipático (que contiene dos dominios, uno polar y otro no polar), lo cual da evidencia de que es una proteína asociada a la membrana.

Gen *nis*T

Codifica para una proteína de 600 aminoácidos con un peso molecular de 69 kDa, correspondiente a una proteína de la familia de los transportadores ABC (del inglés, ATP-binding cassette). En la molécula se encuentran motivos estructurales, claramente hidrofóbicos, en los que una secuencia lineal de 3 a 4 residuos de aminoácidos se pliega en una hélice enrollada a la derecha, estabilizada por puentes de hidrógeno internos. Este arreglo sugiere una localización membranal de la molécula. Tiene una gran similitud a las proteínas involucradas en la secreción de polipéptidos, polisacáridos y drogas antitumorales, indicando que la proteína NisT puede estar involucrada en el transporte de nisina.

Gen *nis*C

El producto de este gen es una proteína de 414 residuos de aminoácidos con un peso molecular de

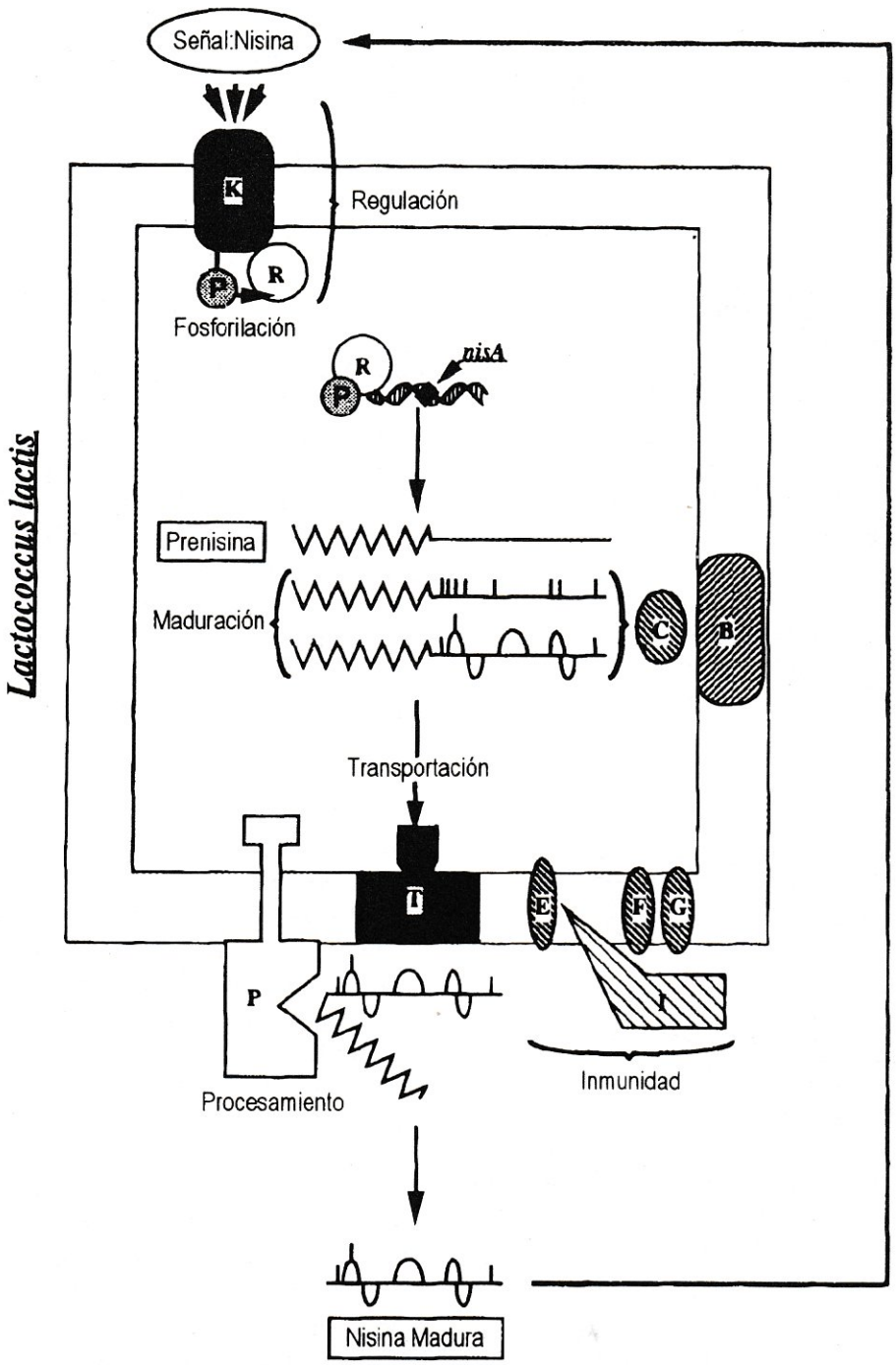


Figura 3. *Esquema que representa el modelo de la biosíntesis de la nisina. B= NisB, C= NisC, T= nisT, I= NisI, P= NisP, R= Nis R, K= NisK, F= NisF, E= NisE, G= Nis G. (Tomada de la referencia 5).*

47.3 kDa, se ha sugerido que puede tener un papel esencial en la modificación enzimática de prenisina, con base a la homología de genes encontrados exclusivamente en otros lantibióticos.

Gen *nis*I

La lipoproteína que codifica es de 245 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 27.8 kDa. La expresión de nisI en cepas no productoras sensibles a nisina, confiere resistencia a dichas cepas, mostrando claramente que la proteína NisI está involucrada en inmunidad contra la nisina añadida de manera exógena (6). Aunque la nisina es la bacteriocina más estudiada de las bacterias ácido lácticas (BAL), poco se sabe acerca de la inmunidad a nisina. La existencia de mecanismos específicos de autoprotección que contemplan la acción de sus propios productos, es una característica común en células productoras de bacteriocinas.

Gen *nis*P

Da origen a una proteína de 682 residuos de aminoácidos, correspondiendo a un tamaño molecular de 74 kDa. La proteína NisP es una proteasa parecida a la subtilisina (subtilisin-like) involucrada en el procesamiento del péptido líder, lo cual se ha comprobado *in vitro*. La secuencia primaria de NisP muestra que es sintetizada como un precursor pro-NisP, el cual es madurado a una proteína activa probablemente mediante una proteasa o bien autocatalíticamente como sucede en la familia de las serín proteasas.

Genes *nis*R y *nis*K

El gen *nis*P es seguido por dos marcos de lectura adicionales, nisR y nisK. El gen *nis*R codifica para un polipéptido de 229 residuos con una masa molecular de 26.7 kDa y el gen *nis*K una proteína de 447 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 51.3 kDa. El gen *nis*R empalma un marco de lectura con otro del gen *nis*K.

Las proteínas NisR y NisK están involucradas en la regulación de la biosíntesis de la nisina. La proteína NisK es muy parecida a la histidín cinasa de sistemas regulatorios de dos componentes, los cuales actúan como sensores de señales en mem-

brana y la proteína NisR actúa como un regulador de respuesta. Parece ser que la interacción entre nisina y la proteína NisK es responsable de la autoregulación de la biosíntesis de nisina mediante un mecanismo de transducción de señales.

Genes *nis*F, *nis*E y *nis*G

Estos genes tienen su propio promotor. El gen *nis*F codifica para una proteína de 225 residuos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 24.7 kDa; el gen *nis*E, una proteína de 242 ó 247 residuos de aminoácidos y el gen *nis*G una proteína de 214 residuos de aminoácidos con un peso molecular deducido de 24.2 kDa. Estas proteínas intervienen en el transporte de nisina y comparten una gran similitud con los miembros de la familia de los transportadores ABC. Además del gen *nis*I, los genes *nis* EFG pueden estar involucrados en la inmunidad a nisina. La proteína NisG, que es predominantemente hidrofóbica, se cree que podría actuar en forma similar a las proteínas de inmunidad a colicina por la interacción con moléculas de nisina formadoras de poros (7, 8).

4. BACTERIOCINAS DE CLASE IIA

Las bacteriocinas de la Clase IIa, identificadas hasta ahora, contienen entre 37 y 48 residuos de aminoácidos y son considerablemente similares entre ellas. Su clasificación se basa en la presencia de una secuencia consenso YGNGV en el extremo amino, el cual se ha sugerido que es parte de una secuencia de reconocimiento de un receptor unido a membrana, y de su fuerte actividad antilisterial. Otra característica es que su carga neta es positiva; presentan un alto contenido de residuos de aminoácidos con grupos ionizables, especialmente aminoácidos básicos y también residuos no polares y pequeños aminoácidos como glicina, la cual se cree que confiere a estas bacteriocinas un alto grado de libertad conformacional. El dominio hidrofílico altamente conservado del extremo amino contrasta con el dominio hidrofóbico y/o anfifílico moderadamente conservado del extremo carboxilo. Adoptan estructuras parcialmente helicoidales en soluciones no acuosas. La conformación del extremo amino contiene hojas beta y se estabiliza por un puente disulfuro entre dos cisteínas. Estos residuos de cisteína parecen estar presentes en posiciones conservadas dando lugar a la formación un anillo de 6 miembros que también es conservado en las bacteriocinas de la clase IIa. De entre las bacteriocinas de la clase IIa, la pediocina PA-1/AcH, la enterocina A y la divercina V41 son únicas en el sentido de que poseen un puente disulfuro extra que involucra un segundo par de residuos de cisteína. La presencia de puentes disulfuro parece ser crucial para la actividad, particularmente de aquellas bacteriocinas que poseen dos puente disulfuro. Hasta la fecha, se ha mostrado que las bacteriocinas de la clase IIa son naturalmente producidas sólo por bacterias ácido lácticas, a diferencia de otras clases de bacteriocinas como los lantibióticos (9).

La mayoría de los péptidos líder comparten una secuencia consenso y son del tipo doble glicina, en cuyo sitio de procesamiento existen dos residuos de glicina en su extremo carboxilo. La actividad de ciertas bacteriocinas de la clase II depende de la acción complementaria de dos

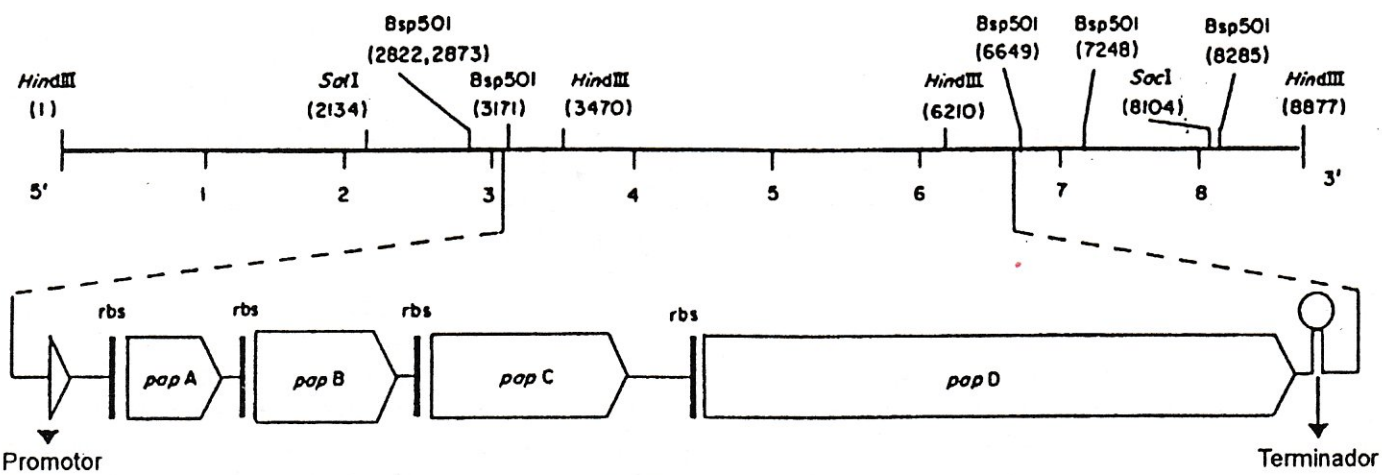


Figura 4. *Representación esquemática del plásmido pSMB 74, mostrando varios sitios para endonucleasas de restricción y los cuatro con su promotor común y su terminador. Cada gen tiene un sitio independiente de unión al ribosoma (rbs), y un codón de terminación. Los genes están separados por secuencias espaciadoras de longitud variable (modificado de la referencia 12).*

péptidos. Ambos poseen un líder doble glicina y están codificados en genes individuales, aunque contiguos y pertenecientes a un mismo operón. En algunos casos es necesaria la presencia de ambos para que exista actividad, como ocurre con la lactococina G. En otros, aunque uno de los péptidos posee cierta actividad, ésta se ve dramáticamente aumentada por la presencia del segundo, como sucede con la plantaricina S y la lactacina F. La fuerte conservación del péptido líder y de la doble glicina en el sitio de ruptura, sugiere que existe un mecanismo general de procesamiento para la maduración de las bacteriocinas.

4.1 Biosíntesis de Pediocina

En contraste al operón de nisina que se localiza en un transposón integrado al cromosoma; el de pediocina AcH (pap) se localiza en el plásmido pSMB74, con un tamaño de 8.9 kb (Fig. 4). Sus determinantes genéticos ocupan un fragmento aproximado de 3,500 pb, que contiene cuatro marcos abiertos de lectura, correspondientes a los genes *pap*A, *pap*B, *pap*C y *pap*D. Estos genes están dispuestos dentro de un mismo operon y comparten un promotor común (entre 3137 y 3166 pb) y un terminador rho-independiente (entre 6599 y 6636 pb). Cada gen tiene un sitio de unión al ribosoma independiente (rbs), codones de iniciación y terminación y secuencias espaciadoras entre ellos. Las tres secuencias espaciadoras comprenden de 23 a 98 pb, estando la más grande entre *pap*C y *pap*D. La transcripción del operón origina dos transcritos; el primero (1.2 kb) cubre los genes *pap*ABC, mientras que el segundo (3.5kb) abarca los cuatro genes del operón, es decir *pap*ABCD (10, 11, 12).

Gen *pap*A

Codifica para la proteína PapA de 62 residuos de aminoácidos, precursor de pediocina, a partir del cual es removido un péptido de 18 residuos de aminoácidos, que constituye la secuencia líder o péptido señal. El péptido restante de 44 residuos de aminoácidos es pediocina AcH el cual presenta dos puentes disulfuro entre 4 residuos de cisteína.

Gen *pap*B

La proteína PapB que codifica, es de 112 residuos de aminoácidos y se cree que confiere inmunidad a la cepa productora. No es esencial para la producción de pediocina. Sin embargo, también se han descrito determinantes inmunogénicos en el cromosoma de *P. acidilactici* PAC 1.0. La expresión incrementada de este gen conduce a altos niveles de inmunidad hacia la pediocina. Esta proteína se asocia a la membrana citoplásmica.

Gen *pap*C

Sintetiza la proteína PapC de 174 residuos de aminoácidos que se une a membrana y pertenece al grupo de proteínas accesorias requerida para la secreción y transporte de pediocina. También se especula que está involucrada en la formación de canales. Es interesante señalar que la estructura de la Pap C es similar a la proteína LcnD, requerida ésta para la secreción de lactococcina A, esto sugiere que existe un mecanismo común de secreción para ambas bacteriocinas.

Gen *pap*D

El producto de este gen, es una proteína accesoria, perteneciente al grupo de transportadores de tipo ABC, formada por 724 residuos de aminoácidos. Cuando el gen *pap*D fue mutado se mostró que era esencial para el transporte de pediocina, junto con la proteína PapC. PapD es, además, capaz de procesar la prepediocina. Cuando los genes *pap*A y *pap*D son interrumpidos no se observa la formación de pediocina. Se cree que el incremento en PapD conduce a una maduración y translocación más eficiente de la pediocina. El dominio N-terminal de PapD se localiza hacia al citoplasma y es responsable del procesamiento de la prepediocina, que involucra ruptura de la secuencia líder en el sitio de procesamiento seguido por la doble glicina (10, 13).

5. REGULACIÓN Y TRANSPORTE DE BACTERIOCINAS

5.1. Regulación

La producción de algunas bacteriocinas está regulada transcripcionalmente mediante un sistema de transducción de señal que consta de tres componentes: un sensor histidín cinasa (HK), un regulador de respuesta (RR) y un péptido inductor (FI) (Fig. 5). Los genes que codifican estos tres componentes se transcriben en una misma molécula de ARNm y están sujetos a un fenómeno de autorregulación mediado por el péptido inductor y que depende, en última instancia de la densidad celular. En ocasiones el péptido inductor es muy similar, pero no idéntico, a la bacteriocina y carece de actividad antimicrobiana.

5.2 Transporte

El transporte de la mayoría de las bacteriocinas, así como la remoción del péptido líder, se efectúa mediante sistemas de transporte específicos para la proteína ABC. Recientemente se ha demostrado que el transportador ABC cumple con esta función dual, lo cual representa una estrategia novedosa para la secreción de proteínas bacterianas (13).

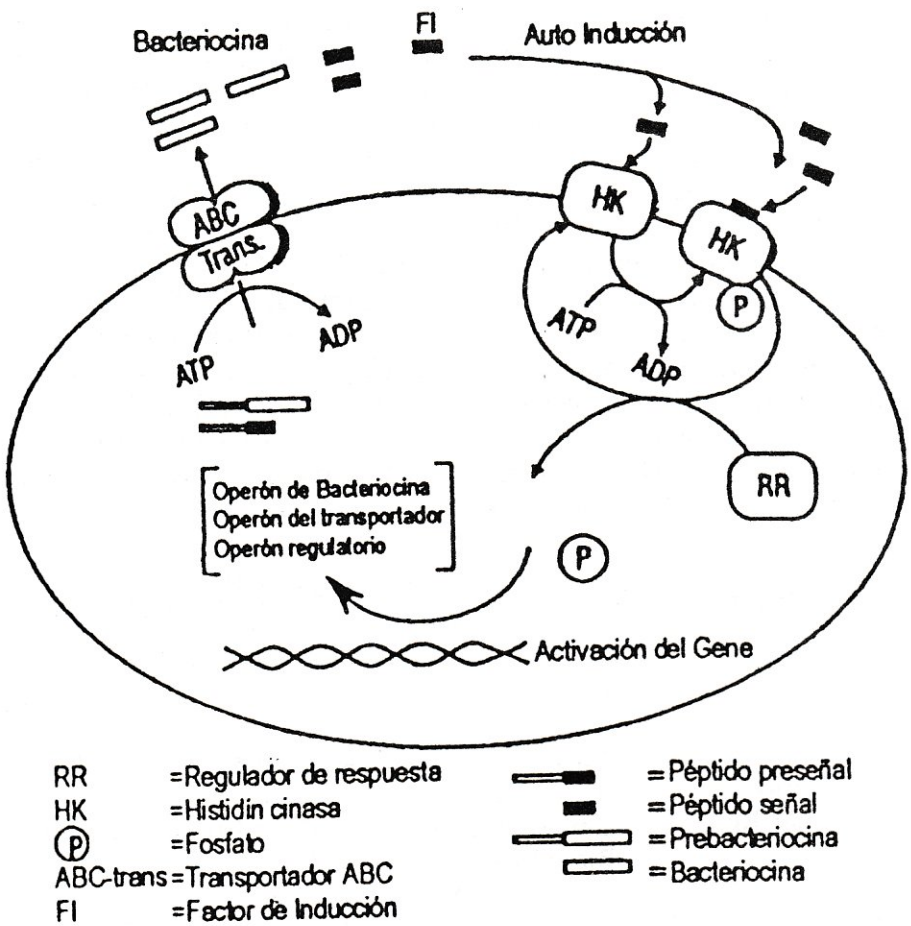


Figura 5. *Diagrama propuesto para la producción/regulación de bacteriocinas de la clase II. RR= Respuesta reguladora, HK= Histidín Cinasa, P= Fosfato, ABC= Sistema transportador (modificado de la referencia 4).*

El transportador puede ser codificado en el mismo operón del gen estructural de la bacteriocina o en un operón cercano. Los transportadores ABC desplazan una amplia variedad de sustratos, como iones inorgánicos, azúcares, aminoácidos, péptidos y proteínas, a través de membranas en procariotes y eucariotes.

Todos los transportadores de tipo ABC son homodímeros. Cada componente del homodímero requiere la función de dos dominios proteicos diferentes que son: un dominio de unión de ATP, de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos localizados en la membrana, de cara al citoplasma y un dominio N-terminal hidrofóbico, integrado a la membrana (normalmente formado de 6 segmentos), que reconoce y desplaza el sustrato a través de la membrana citoplasmática.

La energía necesaria para el desplazamiento de las bacteriocinas proviene de la hidrólisis del ATP. No se sabe cómo los transportadores ABC reconocen su sustrato; probablemente lo hagan a través de la unión del sustrato al dominio proteolítico, de manera que los dos dominios proteolíticos del homodímero se unen al precursor de bacteriocina. Posteriormente, la hidrólisis de 2 moléculas de ATP induce cambios conformacionales en el transportador que resultan en la ruptura y desplazamiento de dos péptidos simultáneamente. Se ha demostrado que las mutaciones que afectan el residuo de glicina en la posición 2 en el péptido líder de la lactacina F y colicina V, resultan en la pérdida de la secreción de bacteriocina. Además, esto indica que el residuo conservado de glicina es parte de ambos, del sitio consenso de ruptura y de la señal de exportación para la secreción de la bacteriocina (13).

Comparando la secuencia de aminoácidos de siete transportadores ABC dedicados al desplazamiento de bacteriocinas conteniendo el péptido líder doble glicina, con otros, ha sido aparente una característica diferencial. Contienen una extensión N-terminal de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos que constituye el dominio proteolítico encargado de escindir el péptido líder de la bacteriocina. El transportador ABC de lantibióticos tales como nisina, con una secuencia líder diferente al tipo doble glicina, no tiene dicha extensión.

5.3 Sistema *sec*-dependiente

Aunque la mayoría de las bacteriocinas se secretan empleando transportadores ABC de dedicación exclusiva, recientemente se ha observado que algunas bacteriocinas de la clase II (acidocina B, enterocina 31, divergicina A y enterocina P) no poseen una secuencia líder del tipo doble glicina, sino que son sintetizadas con una secuencia N-terminal típica de los péptidos señal del tipo *sec* y por lo tanto, acceden al sistema de secreción general de las células.

6. BIOSÍNTESIS MÚLTIPLE DE BACTERIOCINAS

La producción de bacteriocinas múltiples por un organismo es bastante común. En *Carnobacterium piscicola* LV17B se ha mostrado la producción de por lo menos dos bacteriocinas diferentes, una codificada por un plásmido y las otras dos por su cromosoma. *Lactobacillus*

plantarum también produce múltiples bacteriocinas, dos de las cuales se encuentran constituídas por dos péptidos y otra por uno solo. Los genes que codifican para las bacteriocinas mencionadas se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano.

PERSPECTIVAS

El conocimiento de la biosíntesis, mecanismos de transporte y estructura de las bacteriocinas, abre la posibilidad de desarrollar nuevos péptidos antimicrobianos, no sólo con mejores niveles de actividad sino también con una estabilidad mayor en diferentes tipos de alimentos. Por ejemplo, se ha observado un incremento significativo en la actividad de la pediocina PA-1 debido a la sustitución de un residuo de Glu por Lys en la posición once del péptido. Por otro lado, la clonación de genes de bacteriocinas y su expresión constitutiva, también serían una estrategia clave en la producción de las mismas. En cuanto a su desplazamiento a través de la membrana, podría ser factible la producción de bacteriocinas múltiples a través del sistema *sec*-dependiente en una bacteria láctica. Para ello sería necesario el reemplazo del péptido líder por uno que contenga doble glicina. Asimismo, las señales de expresión podrían ser útiles para la síntesis y exportación de proteínas heterólogas en bacterias ácido lácticas, como los propios péptidos antimicrobianos, basada en la similitud significativa que comparten los péptidos líder y también los transportadores de la mayoría de las bacteriocinas de la clase IIa y algunos lantibióticos.

REFERENCIAS

1. Tagg J R, Dajani A S y Wannamaker L W (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev *40*: 722-756.
2. Konisky J (1982) Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Annu Rev Microbiol *36*: 125-144.
3. Klaenhammer T R (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie *70*: 337-349.
4. Nes I F, Diep D B, Havarstein L S, Brurberg M B, EijsinkV y Holo H (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek *70*: 113-128.
5. Rodríguez J M y Dodd H M (1996) Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. Microbiología Sem (España) *12*: 61-74.
6. Engelke G, Gutochowski-Eckel Z, Hammelman M y Entian K D (1992) Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane location of the NisB protein. Appl Environ Microbiol *58*: 3730-3743.
7. Kaletta C y Entian K D (1989) Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. J Bacteriol *171*: 1597-1601.
8. Dodd H M, Horn N y Gasson M J (1990) Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. J Gen Microbiol *136*: 555-566.
9. Ennahar S, Sonomoto K e Ishizaki A (1999) Class IIa Bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. J Biosc Bioeng *87*: 705-716.
10. Venema K, Kok J, Marugg J D, Toonen M Y, Ledeboer A M, Venema G y Chikindas M L (1995) Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0: PedB is the immunity protein and Ped D is the precursor processing enzyme. Mol Microbiol *17*: 515-522.
11. Marugg J D, González C F, Kunka B S, Ledeboer A M, Pucci M J, Toonen M Y, Walker S A, Zoetmulder L C M y Vandenbergh P A (1992) Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl Environ Microbiol *58*: 2360-2376.
12. Motlagh A, Bukhtiyarova M y Ray B (1994) Complete necleotide secuence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. Lett Appl Microbiol *18*: 305-312.
13. Havarstein L S, Diep D B y Nes I F (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol Microbiol *16*: 229-240.

Características y Formación de un Dominio Transcripcionalmente Activo en Eucariotes*

Viviana Valadez Graham[1] y Félix Recillas Targa[1]

RESUMEN

La necesidad funcional de compactar al genoma de una célula eucariota en cromatina para contenerlo dentro del núcleo restringe el acceso al ADN, de proteínas que regulan la actividad genética. Tanto los nucleosomas individuales como la organización del genoma en estructuras más complejas (como los cromosomas), limitan el acceso a factores de transcripción y en consecuencia reprimen la actividad genética. Es necesario por lo tanto que exista un remodelaje regulado de la cromatina que permita la accesibilidad de las proteínas a sus secuencias blanco en el ADN y así se lleve a cabo la expresión eficiente y ordenada de un gen. Para favorecer la expresión génica se ha propuesto que los genes se encuentran organizados en dominios dentro del genoma, los cuales son unidades transcripcionales cuya expresión es regulada de manera independiente por elementos inherentes a ellos, y cuya formación proponemos que representa uno de los primeros niveles de regulación en células eucariotas a lo largo del desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Cromatina, nucleosoma, dominios, sitios de hipersensibilidad a la DNasa I, LCR.

ABSTRACT

In higher eukaryotes the genome is packaged into a compact and repressive chromatin structure. To allow small portion of the genome to be expressed in a given cell-type, tissue or moment, it is necessary a series of ordered chromatin remodeling events. On recent years it is more generally accepted that eukaryotic genome is organized into structural and functional discrete domains. In the present work we propose that chromatin domain formation represents one of the first steps in genome remodeling influencing the control of gene activation.

KEY WORDS: Chromatin, nucleosome, domains, DNase I hypersensitive sites, LCR.

INTRODUCCIÓN

El genoma de una célula eucariota se encuentra asociado a proteínas llamadas histonas, las cuales contribuyen a empaquetar el ADN. Esta asociación del ADN con proteínas denominada cromatina, permite que la información genética pueda ser contenida dentro del núcleo. Hasta hace algunos años se estudiaba a la estructura de la cromatina y la activación transcripcional como dos procesos biológicos independientes, de hecho se pensaba que la cromatina no jugaba un papel esencial dentro de la regulación transcripcional y que su papel era meramente estructural. Actualmente se entiende que la activación transcripcional de los genes de células eucariotas, se encuentra íntimamente asociada a cambios en la arquitectura de la cromatina. El empaquetamiento del ADN constituye *per se* una estructura represora que impide la transcripción genética, pero que a su vez es capaz de remodelarse para permitir la expresión regulada de los genes. Este remodelaje en la cromatina favorece o impide de manera regulada el ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción asociado a la ARN polimerasa II en las regiones promotoras de genes, repercutiendo en la expresión de los mismos. En un nivel más elevado de complejidad, la transcripción de los genes eucariotes es modulada además por elementos distantes, es decir, que se encuentran alejados de las regiones promotoras de los mis-

*Recibido: 6 de febrero de 2001. Aceptado: 17 de julio de 2001.

[1]Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-242, C. P. 04510. México D. F. Fax 5622-5630. Correo E: frecilla@ifisiol. unam.mx

mos. Estos elementos en posición *cis* son sitios de unión a factores que en cooperación con diversos complejos son capaces de regular la transcripción genética positiva o negativamente y posiblemente contribuyen también a la remodelación de la cromatina.

En el contexto de la cromatina, estos sitios de unión a factores se encuentran en regiones que son hipersensibles al corte por nucleasas, como por ejemplo la DNasa I. La hipersensibilidad al corte por estas enzimas correlaciona con una estructura más abierta o accesible de la cromatina, lo que permite la unión de diferentes factores de transcripción a sus secuencias blanco en el ADN. En ocasiones, cuando los genes son activamente transcritos, esta accesibilidad al corte por endonucleasas puede extenderse por varias kilobases pudiendo incluir a uno o varios genes. A las regiones de la cromatina que se encuentran abiertas en un tiempo y espacio determinado del desarrollo celular se les ha denominado dominios transcripcionalmente activos.

En años recientes se ha propuesto que estos dominios tienen límites bien definidos y la transcripción del gen o genes contenidos en ellos es regulada diferencialmente a lo largo del desarrollo por elementos situados dentro de estos límites. Existen además, evidencias citológicas que apoyan el concepto de dominios, siendo la más evidente lo que ocurre durante la expresión genética en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de larvas de *Drosophila.* Al observar al microscopio los cromosomas politénicos, estos presentan un patrón de bandas e interbandas. En las bandas se encuentran los genes, los cuales al ser expresados generan una estructura conocida como "puff", la cual se observa como un ensanchamiento de la banda representativo de un relajamiento en la estructura de la cromatina. Cabe señalar que estas estructuras o "puffs" están acotados, es decir, que no invaden bandas adyacentes y que recientemente se ha propuesto, contribuyen a la formación y mantenimiento de un dominio transcripcionalmente activo. Así pues, se ha comprobado que en los "puffs" existe un dominio que está siendo regulado y transcrito por elementos inherentes a él y que no invaden otros dominios gracias a la presencia de sus límites.

Además de las evidencias bioquímicas y citológicas mencionadas, existe actualmente un cúmulo de datos experimentales recientes que apoyan el concepto de una organización del genoma eucariote en dominios transcripcionalmente activos. En esta revisión se analizarán los elementos y mecanismos que regulan la apertura y el cerrado de regiones específicas en el genoma. De igual manera se pondrá de manifiesto que el remodelaje de la cromatina es esencial para la formación de un dominio transcripcionalmente activo. Se discutirá primeramente aspectos relacionados sobre las proteínas involucradas en la compactación de la información genética, en segundo lugar se describirán los elementos de regulación de la transcripción, posteriormente se hará un análisis detallado sobre los límites de los dominios y por último se discutirá la manera cómo cooperan de manera coordinada todos estos elementos para formar, mantener y regular la expresión de los genes contenidos en un dominio. A su vez, se propone que la formación de un dominio representa probablemente uno de los niveles iniciales dentro de la regulación de la expresión genética.

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Para comprender cómo se forma un dominio transcripcionalmente activo, es necesario entender el contexto en el cual el ADN está estructurado en forma de cromatina y su relación con el núcleo celular. Si se extiende de manera lineal la molécula de ADN contenida en el interior del núcleo de una célula eucariota, su longitud varía entre 2 y 4 metros; tomando en cuenta que el diámetro del núcleo oscila entre 10 y 20 micras, se hace evidente que debe existir un sistema de empaquetamiento que compacte el genoma celular de manera que pueda ser contenido dentro del núcleo. Para empaquetar el ADN, la célula se vale de unas proteínas llamadas histonas las cuales forman un octámero cilíndrico sobre el cual el ADN es enrollado para formar lo que se conoce como nucleosoma. El nucleosoma tiene un diámetro de 6.5 nanómetros (nm), el cual está compuesto de un tetrámero central formado por dos copias de las histonas H3 y H4, flanqueado por dos heterodímeros de las histonas H2A y H2B. Las histonas insertan residuos de argininas en el surco menor del ADN que está en contacto con el octámero. Esta unión se estabiliza gracias a los extremos amino-terminales de las histonas, los cuales quedan expuestos por fuera del cilindro de histonas y son ricos en residuos de lisina. La abundancia en residuos de lisina en los extremos amino-terminales genera una carga neta positiva, la cual interacciona con la carga negativa del ADN estabilizando la unión del ADN al octámero de histonas, de esta manera el ADN queda enrollado sobre el octámero (1).

La estructura nucleosomal es considerada como el primer nivel estructural de empaquetamiento, donde 146 pares de bases (pb) de

ADN se enrollan en 1.65 vueltas alrededor del octámero de histonas. Los cilindros de histonas van posicionándose uno tras otro regularmente a lo largo del ADN, de manera independiente de secuencias nucleotídicas específicas formando una cadena de polinucleosomas conocida como collar de perlas o fibra de 10 nm.

En el siguiente nivel de estructuración de la cromatina, la histona H1, juega un papel tanto estructural como de regulación. Primero se toma en consideración la contribución de la histona H1 a la estructuración de la cromatina, para posteriormente presentar las evidencias de la participación de esta histona en la regulación transcripcional. La histona H1 contribuye a la formación de lo que se conoce como cromatosoma, el cual contiene al octámero de histonas, a la histona H1 y abarca 168 pb de ADN (20 pb más por la interacción con la histona H1). La histona H1 se localiza en la región internucleosomal e interacciona con el ADN que entra y sale del nucleosoma (ADN de unión), tiene un papel estructural fundamental, ya que contribuye a que la fibra de 10 nm escale al siguiente nivel de compactación del ADN en cromatina: la fibra de 30 nm o solenoide. La histona H1 estabiliza la fibra de 30 nm al fomentar contactos entre nucleosomas adyacentes (2). Se han propuesto varios modelos para explicar la formación de la fibra de 30 nm y hasta la fecha el más aceptado es el que sugiere que la histona H1 coopera para formar una estructura de hélice con 6 nucleosomas por vuelta. Cabe señalar que durante la mayor parte del ciclo celular, la cromatina permanece empaquetada en fibras de 30 nm de diámetro, aunque existen niveles más complejos de compactación siendo el más alto el de los cromosomas, pero a la fecha se desconocen los mecanismos por los cuales se alcanzan los niveles más elevados de estructuración y compactación de la cromatina.

Cabe resaltar que la fibra de 30 nm es una estructura altamente compacta y consecuentemente represora. Anteriormente se pensaba que la fibra de 10 nm era el molde natural de la transcripción, ya que ésta constituía una estructura lo suficientemente abierta y accesible de la cromatina sobre la cual el complejo transcripcional podría realizar su función. Sin embargo, las siguientes evidencias sugieren que el molde real donde ocurre el remodelamiento de la cromatina para una subsecuente activación de la transcripción es la fibra de 30 nm:

–Las condiciones en las que se hicieron los estudios *in vitro* utilizando la fibra de 10 nm como molde de la transcripción, no son las mismas que existen en una célula *in vivo*. De hecho en condiciones fisiológicas la fibra de cromatina tiende a compactarse al siguiente nivel, en el cual se forman los llamados "loops" o asas de solenoides, los cuales se supone que se forman cuando las proteínas que se unen al ADN anclan la fibra de 30 nm a estructuras nucleares juntándolas, formando de esta manera el cuello de las asas. Cada asa de solenoides contiene entre 20,000 a 80,000 pb y alcanza una compactación de hasta 400 nm. Diversos cálculos teóricos han estimado que cada cromosoma humano contiene aproximadamente 2600 asas.

–Si se realiza una estimación teórica del tamaño que abarca el ADN descompactado es prácticamente imposible considerar a la fibra de 10 nm como el molde real de la transcripción debido a que en un momento dado de diferenciación de la célula, los genes activos generarían una descompactación de la cromatina que impediría su inclusión dentro del núcleo. Además, en estudios hechos por microscopía electrónica, se ha observado que una descondensación por debajo del nivel de la fibra de 30 nm, sólo ocurre entre polimerasas que se encuentran en la etapa de extensión y cuando hay una gran densidad de éstas. Cuando las polimerasas terminan de extender y se encuentran lo suficientemente alejadas de la región que estaba siendo transcrita, la estructura de la cromatina regresa rápidamente a la fibra de 30 nm (3). Esta última observación explicaría la presencia de la histona H1 en dominios que están siendo transcritos ya que su presencia ayudaría a un pronto empaquetamiento de los genes recién transcritos al nivel de la fibra de 30 nm (Fig. 1).

Una muestra adicional de la relevancia de la histona H1 en estos niveles de estructuración es el efecto que tiene la fosforilación de H1 en 5 residuos de serina específicos, esta fosforilación ayuda a formar los cromosomas durante la mitosis. En este nivel, la compactación llega hasta 1400 nm (Fig. 1). En cromatina *de novo*, la histona H1 se encuentra moderadamente fosforilada, a medida que la cromatina madura, la histona H1 se vuelve altamente fosforilada. La fosforilación de H1 es mayor en células que se dividen rápidamente y menor en células que no están proliferando. Los niveles de fosforilación de la histona H1 son menores en G1 y mayores en la fase S del ciclo celular y en la mitosis; en esta última, la fosforilación aumenta específicamente durante la metafase, que es cuando los cromosomas se encuentran condensados. Asimismo, la histona H1 está presente en una menor densidad y con un

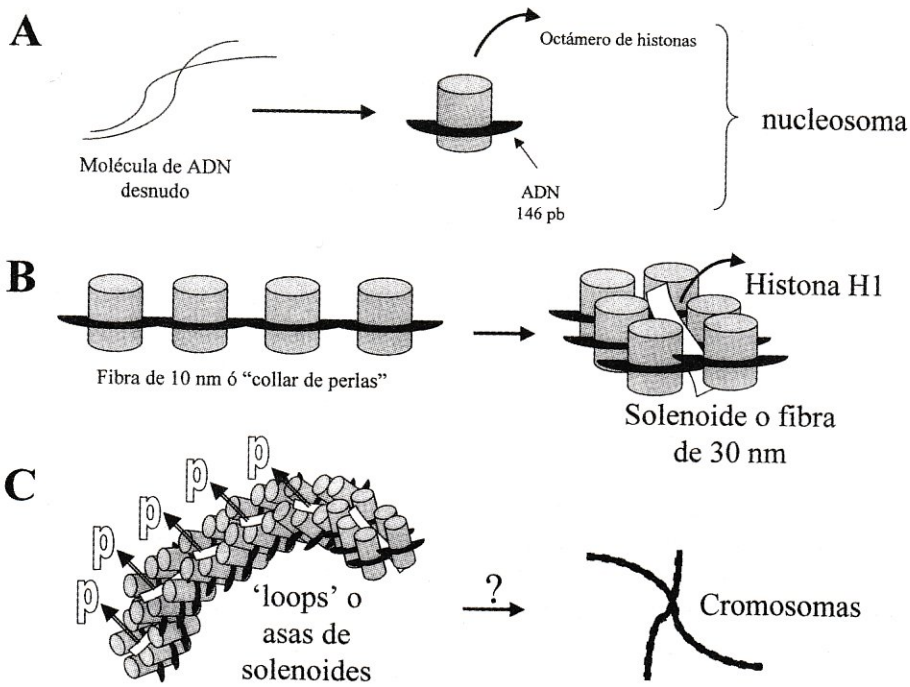


Figura 1. *Niveles de empaquetamiento del ADN. A) El ADN desnudo se enrolla en 1.6 vueltas alrededor del octámero de histonas para formar un nucleosoma. B) En el siguiente nivel, los nucleosomas se van ordenando periódicamente a lo largo de la fibra de ADN formando lo que se conoce como collar de perlas o fibra de 10 nm; al participar la histona H1, los contactos entre los nucleosomas se hacen estables y se forma el solenoide o fibra de 30 nm. C) El siguiente nivel corresponde a las asas de solenoides, las cuales se forman cuando la histona H1 se fosforila, en este nivel la compactación llega hasta 400 nm, las P representan la fosforilación de la histona H1, después de este nivel todavía no se sabe como se llega a la compactación de los siguientes niveles hasta llegar a los cromosomas.*

grado menor de fosforilación en dominios transcripcionalmente activos. Estos resultados han llevado a pensar que existe una relación directa entre la fosforilación de la histona H1 y la compactación de los cromosomas. Sin embargo, en otros sistemas donde la división es amitótica se ha encontrado que por el contrario, la histona H1 se desfosforila y esto permite la condensación de los cromosomas. La fosforilación de la histona H1 debilita la interacción de los extremos básicos de la proteína al ADN, pero por otra parte esta fosforilación acentúa la unión de la histona H1 a la cromatina. Dos de los ejemplos más representativos de que la defosforilación de la histona H1 contribuye a la condensación de los cromosomas son los siguientes:

–En *Tetrahymena* la histona H1 se encuentra hiperfosforilada en células en interfase, y completamente defosforilada cuando los cromosomas se encuentran en el estado altamente condensado.

–En las fases terminales del desarrollo de eritrocitos de pollo, el núcleo está condensado en heterocromatina, lo que ocurre debido a la presencia de la histona H5 (homólogo de H1 en pollo). La histona H5 recién sintetizada está altamente fosforilada, pero cuando la cromatina del eritrocito se condensa, la histona H5 se encuentra defosforilada. Estos datos permiten pensar que todavía existe una paradoja acerca de las funciones de la histona H1 y sus modificaciones postraduccionales como la fosforilación y su contribución a la estructuración de un dominio.

Además de su importante papel estructural, se ha propuesto que la histona H1 puede actuar en la regulación transcripcional. La regulación mediada por la histona H1, se lleva a cabo de diferentes maneras:

1) En sistemas experimentales *in vitro* se ha demostrado que la histona H1 se encuentra en intercambio activo, es decir, que no permanece siempre unida al ADN. Además, la fosforilación en sitios específicos de esta histona correlaciona con un nivel de empaquetamiento más elevado que el del solenoide durante la mitosis. Se sugiere que la histona H1 podría actuar modulando la exposición de un sitio en el ADN a proteínas reguladoras. Al estar ausente la histona H1, no existen contactos estables entre los nucleosomas adyacentes, por lo tanto se impide el siguiente nivel de empaquetamiento de la cromatina manteniéndose una estructura más laxa, lo que permite una mayor accesibilidad al ADN.

2) Recientemente, se han hecho estudios *in vitro* en los cuales se ha demostrado una interferencia estérica entre los extremos amino-terminales de la histona H1 y otras histonas como la H3 impidiendo la acetilación de sus extremos amino-terminales y por lo tanto que la cromatina se descompacte e interfiriendo con la unión de factores reguladores de la estructura de la cromatina y de la transcripción genética.

Este conjunto de evidencias apoyan la idea de que el molde real de la transcripción es la fibra de 30 nm o solenoide y que la histona H1 juega un papel importante en la regulación de la transcripción de un dominio (3).

Hasta ahora se ha revisado la manera como las histonas empacan y organizan al ADN para que pueda ser contenido dentro de una célula en las distintas etapas del ciclo celular y es evidente que la estructuración del ADN en cromatina genera un obstáculo, por lo que ésta tiene que ser remodelada para permitir la regulación de la expresión genética. A continuación se analizará la presencia de regiones en la cromatina, las cuales son sitios accesibles para la unión de elementos que participan en la transcripción y en su regulación.

SITIOS DE HIPERSENSIBILIDAD

En 1976 Weintraub y Groudine se preguntaron si la estructura de la cromatina en genes activos sería la misma que en genes inactivos. Para contestar a su pregunta, aislaron núcleos de células eritroides de pollo que expresan los genes de globina y núcleos de células que no expresan estos genes y los trataron con concentraciones crecientes de la nucleasa pancreática DNasa I, la cual reconoce la doble hebra del ADN y corta inespecíficamente en zonas libres de nucleosomas. Posteriormente, mediante una técnica de hibridación indirecta la cual actualmente ha sido reemplazada por el "Southern blot", determinaron la magnitud de la digestión. Observaron que en el ADN genómico de las células que expresaban los genes de globina, la cromatina del *locus* tenía un mayor grado de digestión, mientras que el *locus* de globina de las células que no expresaban los genes era resistente a la digestión. Esto hizo suponer que la estructura de la cromatina se alteraba cuando un gen es transcripcionalmente activo. Actualmente se sabe que la sensibilidad al corte por la DNasa I correlaciona con un relajamiento en la estructura de la cromatina del *locus* de genes activos, aunque el *locus* continúe ensamblado en nucleosomas. Por lo general en estas regiones los nucleosomas se encuentran en menor densidad. En 1979 Wu y Elgin realizaron digestiones con DNasa I en cromatina de núcleos de células de *Drosophila* y encontraron en el "Southern blot" bandas más pequeñas que los fragmentos originales (4). A estas bandas se les denominó sitios de hipersensibilidad al corte por la DNasa I. Se propuso que estos sitios correspondían a regiones con una estructura alterada de la cromatina, donde se observa un mayor grado de digestión de la doble cadena por parte de la DNasa I y que podrían coincidir con elementos reguladores de la transcripción Actualmente se sabe que estos sitios de hipersensibilidad son típicamente, al menos dos órdenes de magnitud más sensibles al corte por nucleasas que el resto de la cromatina y no deben confundirse con la sensibilidad generalizada al corte por nucleasas que presentan los genes que están siendo transcritos y que puede extenderse por varias kilobases (kb). Además, en estos sitios los nucleosomas están ausentes o parcialmente ensamblados. Un sitio de hipersensibilidad típico contiene sitios de unión para una variedad de diferentes factores de transcripción. El aumento de la sensibilidad a nucleasas aumenta en estos sitios por la ausencia de nucleosomas, el ensamblaje parcial de éstos o su desplazamiento, y por la unión de un factor de transcripción que distorsiona a la cromatina favoreciendo su apertura en esa región o en regiones adyacentes. Se ha propuesto la posibilidad de que los factores de transcripción y los nucleosomas compitan por la unión en un lugar dado del genoma (como por ejemplo un promotor o un "enhancer"), e induzcan la formación y mantenimiento de un sitio de hipersensibilidad. El ejemplo más claro que apoya este modelo demuestra que mutaciones en el sitio de unión al factor GATA-1 en el ADN correlacionan con una disminución cuantitativa en la formación del sitio de hipersensibilidad. Por lo tanto se ha propuesto que debe existir un proceso dinámico de interacción proteína-ADN, con elementos que remodelan a la cromatina y la formación de un sitio de hipersensibilidad (5). Una constante para los sitios de hipersensibilidad a la DNasa I es que coinciden, invariablemente, con elementos estructurales o de regulación, como por ejemplo, regiones delimitadoras de un dominio, "enhancers", silenciadores y promotores.

En general se pueden dividir los sitios de hipersensibilidad en 3 diferentes tipos:

1) **Los sitios específicos.** Pueden aparecer antes de la transcripción y generalmente persisten incluso al término de la misma, son tejido específicos y a este tipo corresponden los promotores, "enhancers" y silenciadores. Los promotores son secuencias de ADN que se encuentran generalmente de – 40 a + 40 nucleótidos relativos al inicio de la transcripción, conocida también como región "core", a estos se unen la maquinaria basal de transcripción que contiene a la ARN Polimerasa II, factores generales de transcripción y coactivadores. Los promotores controlan la direccionalidad de la transcripción y responden a activadores o represores transcripcionales que actúan sobre ellos. Además del "core", existe una región proximal que va de – 50 a – 200 que algunos han llamado el promotor regulador. Esta región, cuando es clonada en multímeros cerca de

un promotor, puede conferirle una actividad de "enhancer". Por su parte los "enhancers" o aumentadores son secuencias en *cis* que se encuentran a una distancia relativa del inicio de la transcripción, tienen una organización modular, es decir, que son sitios de unión para más de un factor y son capaces de aumentar la transcripción de una manera independiente de su orientación. Los módulos de los "enhancers" desempeñan funciones específicas al activar la transcripción de un gen durante una etapa del desarrollo determinada, controlando los niveles de expresión del gen (6). Igual que los "enhancers", los silenciadores tienen una organización modular, pero a diferencia de éstos, regulan negativamente la transcripción (7).

2) **Los sitios constitutivos.** La presencia de estos sitios precede a la activación transcripcional y no son tejido específicos, es decir que en un mismo *locus* pueden estar presentes en diferentes tipos celulares y su presencia es independiente de la expresión genética. Estos sitios se han encontrado en algunos casos enmarcando a un gen o grupo de genes y se ha propuesto que corresponden a los límites físicos y funcionales de los dominios transcripcionalmente activos. Estos límites son regiones en el ADN que funcionan como secuencias neutras, es decir que no presentan actividad silenciadora, promotora o de aumentador y por lo tanto no afectan la transcripción positiva o negativamente. Estas regiones delimitadoras bloquean o aislan la influencia de elementos de regulación de la transcripción que se encuentran fuera del *locus* al cual están flanqueando y se ha propuesto que contribuyen al mantenimiento de un *locus* activo. A estas secuencias se les ha llamado "insulators" o delimitadores.

3) **Las regiones de control de un dominio o "Locus Control Regions (LCR)".** Otro tipo de sitio de hipersensibilidad son los comúnmente llamados LCRs, los cuales están conformados por varios sitios de hipersensibilidad, y contienen múltiples sitios de unión para activadores transcripcionales. La diferencia entre los LCRs y los "enhancers" es que los primeros actúan en una etapa previa a la transcripción de los genes haciéndolos competentes para ser transcritos ya que presentan una actividad tipo "enhancer" y además, se ha propuesto que contribuyen a la apertura de la cromatina por diferentes mecanismos. Otra característica de los LCRs que los diferencía de los "enhancers", es que estos están usualmente más alejados de los genes que controlan, en ocasiones hasta 16 kb. Más adelante se discutirá sobre el papel de los LCRs en el control de la transcripción dentro de un dominio.

Los LCRs son un conjunto de sitios de hipersensibilidad al corte por la DNasa I, que corresponden a elementos reguladores tejido específicos en el ADN y que fueron descritos primeramente en el *locus* β-globina de humano. El estudio de la regulación de estos genes es importante ya que la falta de expresión de éstos causa una enfermedad conocida como talasemias que son una clase de anemias muy severas. Diversos grupos encontraron, al estudiar el *locus* β-globina de individuos afectados por esta enfermedad, una serie de supresiones río arriba del primer gen embrionario ε del dominio, las cuales disminuían dramáticamente la expresión de todos los genes del *locus*, aunque éstos estuviesen intactos. Este descubrimiento suponía la presencia de elementos de regulación en la región 5' del *locus*. Al analizar la estructura de la cromatina de esta región en células normales, encontraron una serie de sitios de hipersensibilidad, a los cuales subsecuentemente se les llamó "Locus Control Region" o LCR. Ratones transgénicos que expresaban niveles bajos de los genes globina, a los que se añadió el transgen de la región 5' no-codificante que incluía al LCR, normalizaron los niveles de expresión de los genes y mantuvieron su especificidad a lo largo del desarrollo observándose además que la expresión de los genes era independiente del sitio de integración (8). Esta observación motivó estudios subsecuentes basados en la idea de que los LCRs pudieran contrarrestar los problemas de silenciamiento de los vectores diseñados para terapia génica. Pronto los investigadores concluyeron que, en efecto, los LCRs son útiles para este fin, pero su intervalo de acción es restringido ya que su función es tejido específica. Se han descrito LCRs en el *locus* de β-globina de otros vertebrados con diferente número de sitios de hipersensibilidad (Tabla I). A partir del descubrimiento del LCR β-globina se han descrito LCRs en otros *loci* como el de TCRα de células T, en el *locus* CD2 en humanos y en el *locus* de la lisozima de pollo, entre otros (Tabla I).

Los LCRs se definen funcionalmente por las siguientes características: 1) son capaces de conferir altos niveles de expresión a un transgen independientemente del sitio de integración (efecto de posición) y dependiente del número de copias integradas del transgen. Esto significa que en ausencia de un LCR, la expresión de un transgen integrado en un contexto cromatínico, estaría sujeta a los efectos intrínsecos de la estructura de la cromatina, causados por los distintos sitios de integración (8). Por ejemplo, si el transgen se

integra en o cerca de una región de heterocromatina (que tiene una estructura altamente compactada y por lo tanto represora) como podría ser un centrómero o un telómero, su expresión decaería a lo largo del tiempo o nunca sería expresado, 2) regulan la expresión genética durante el desarrollo, y 3) contribuyen a la apertura de la cromatina, para permitir la transcripción de los genes del locus (9).

A pesar del gran número de investigaciones realizadas en laboratorios de todo el mundo, en la actualidad aun se sabe poco acerca de los mecanismos por los cuales los LCRs influyen en la estructura de la cromatina y la expresión de los genes contenidos en un dominio. Sin embargo, se han propuesto a la fecha, cuatro modelos principales para explicar la función de los LCRs:

TABLA I

LOCUS O GENE	ORGANISMO
Gene CD2	Humano
Gene de la adenosina desaminasa	
Genes de pigmentos visuales	
Gene S100 β	
Gene de la queratina 18	
Gene del MHC clase I HLA G	
Gene CD4	
Locus α/δ del receptor de células T	
Gene de la apolipoproteína B	
Locus E/C-I de la apolipoproteína	
Gene de la cadena pesada de la β miosina	
Genes C4A y B del complemento	
Gene de la hormona del crecimiento	
Locus de la cadena pesada Ig	
Genes 1 y 2 del Ig C α	
Gene HLA-B7 del MHC clase I	
Gene de la desmina	
Gene CD34	Ratón
Gene de la glicoporina	
Locus λ 5-V_{preB1}	
Cadena pesada de la Inmunoglobulina μ	
Genes I y II de la metalotioneína	
Gene Ea del MHC clase II	
Gene de la tirosinasa	
Locus β-globina α-fetoproteína	
Genes de la calicreína	Rata
Gene de la proteína acídica de Whey	
Gene de la aldolasa C	
Gene LAP (C/EBP β)	
Gene de la lisozima	Pollo
Locus β-globina	
Gene de la β-lactoglobulina	Oveja

Ig = Inmunoglobulina, MHC = Complejo principal de Histocompatibilidad, LAP = leucina amino peptidasa.

1) **"Looping".** En este modelo, el LCR actuaría como un holocomplejo para estimular la transcripción de genes individuales dentro del *locus* y a lo largo del desarrollo. El LCR se acercaría al promotor del gen a activar formando un asa o "loop", reclutando toda la maquinaria de transcripción. Se ha propuesto un posible contacto entre el promotor y el LCR mediada por interacciones entre distintas proteínas reguladoras y que son tejido y tiempo específicas (Fig. 2A) (10).

2) **"Linking".** Sugiere la cooperación de varios factores en *trans*, los cuales son expresados en un estadio de diferenciación específico y que serían reclutados por el LCR. Este modelo propone la formación de una cadena o relevo, mediada por factores que contribuiría a fomentar una estructura de la cromatina favorable para la transcripción de un solo gene durante una etapa determinada (Fig. 2B).

3) **"Tracking".** Otro modelo que apoya la hipótesis de que el LCR contribuye a la apertura de la cromatina, es el llamado "tracking", el cual propone un reclutamiento del complejo de transcripción y de diversos factores en el LCR y su posterior encarrilamiento en la cromatina, desplazándose a lo largo de ésta con la ayuda de complejos de remodelaje hasta llegar a los promotores de los genes que serán expresados. Este modelo no implica que la polimerasa forzosamente vaya transcribiendo, más bien representa una forma de reclutamiento de la maquinaria de remodelaje de la cromatina y como consecuencia el acceso de la maquinaria transcripcional (Fig. 2C).

4) **Transcritos intergénicos.** Se ha identificado la presencia de transcritos intergénicos, es decir, en regiones no-codificantes en el do-

minio β-globina de humano. Se desconoce la función precisa de estos transcritos intergénicos pero se ha demostrado una correlación directa entre su presencia y la apertura de la cromatina en el contexto del dominio. Esta apertura de la cromatina mediada por estos transcritos intergénicos favorece la expresión regulada de los genes de manera individual (Fig. 2D) (11,12).

Aunque hasta la fecha no se ha podido demostrar del todo que el LCR contribuye a la apertura de la cromatina, está claro que este elemento es absolutamente necesario para que la transcripción de los genes de los dominios donde se ha identificado, se lleve a cabo adecuadamente.

A continuación se analizarán las características de los sitios de hipersensibilidad constitutivos, los que corresponden a secuencias delimitadoras de los dominios.

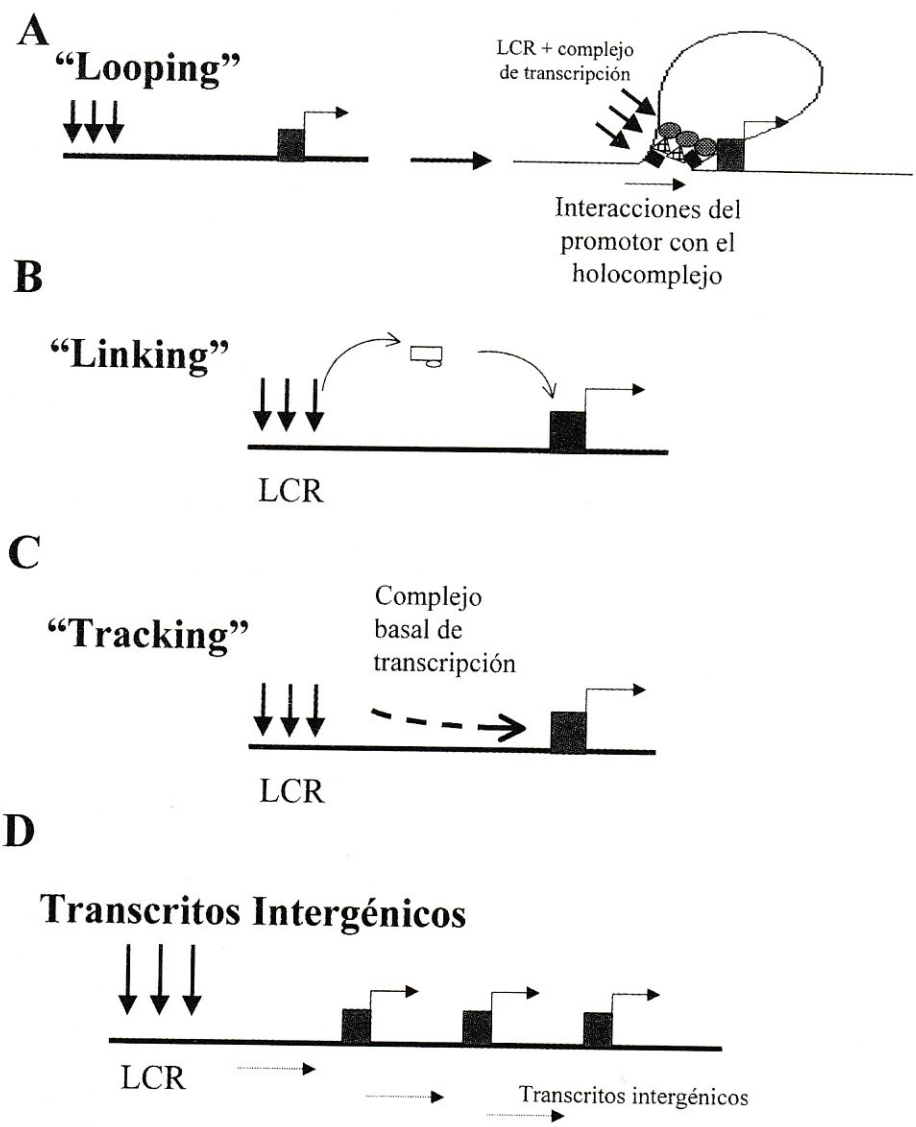


Figura 2. *Modelos propuestos para el funcionamiento del LCR. A) "Looping": en este modelo, el LCR interactúa directamente con el promotor a través de contactos mediados por el holocomplejo e interacciones con factores que se unen de manera específica a los promotores individuales. B) "Linking": este modelo propone el uso de proteínas que actúen en* trans, *o proteínas de relevo que interactúan directamente con otras proteínas del promotor, activándolo. C) "Tracking": se propone que el LCR sirve como una entrada para que el holocomplejo se encarrile en la cromatina y se desplace hasta el promotor que va a ser activado. D) Transcritos Intergénicos: se ha propuesto que el LCR contribuye a la apertura de la cromatina, ya que se han encontrado transcritos intergénicos a lo largo de los* loci *regulados por LCRs (flechas en punteado) y estos transcritos son estadio y tejido específicos.*

LÍMITES DE LOS DOMINIOS

Los genes activos e inactivos en el genoma, existen en *locus* independientes que tienen diferentes programas de expresión durante el desarrollo celular. Si tomamos en cuenta que los sitios de hipersensibilidad descritos anteriormente correlacionan con secuencias reguladoras de la expresión genética y que estos elementos actúan sobre promotores que se encuentran localizados a grandes distancias, es necesario que existan elementos que aseguren que estas regiones de control actúen sólo sobre sus promotores y no sobre promotores de otros *loci* vecinos.

Los "insulators" son secuencias que correlacionan con la presencia de sitios de hipersensibilidad constitutivos en el límite de los dominios y se definen como secuencias neutras que protegen a un dominio de los efectos de la cromatina adyacente, previniendo la promiscuidad entre elementos de regulación de otros dominios y que contribuyen a formar y mantener el *locus* abierto cuando está siendo transcrito (Fig. 3).

Los "insulators" fueron descritos originalmente en los límites de los genes divergentes *heat-shock (Hsp70),* en el *locus* 87A7 de *Drosophila*. Kellum y Schedl analizaron dos secuencias que correlacionaban con sitios de hipersensibilidad constitutivos, estos elementos

fueron nombrados *scs* y *scs'* (del inglés: "*specialized chromatin structures*"), se hicieron construcciones que llevaban al gen *white* controlado por un promotor mínimo, y utilizando estas construcciones generaron moscas transgénicas con un patrón de color de ojos muy variable, esto como consecuencia del efecto de posición causado por el medio ambiente de la cromatina en los distintos sitios de integración. Al flanquear este gene con elementos *scs*, el color de los ojos de las moscas fue homogéneo; es decir, se suprimió el efecto de posición (13). Así se demostró la primera característica funcional de los "insulators": son capaces de proteger a un transgen del entorno cromatínico en el cual se integre (Tabla II).

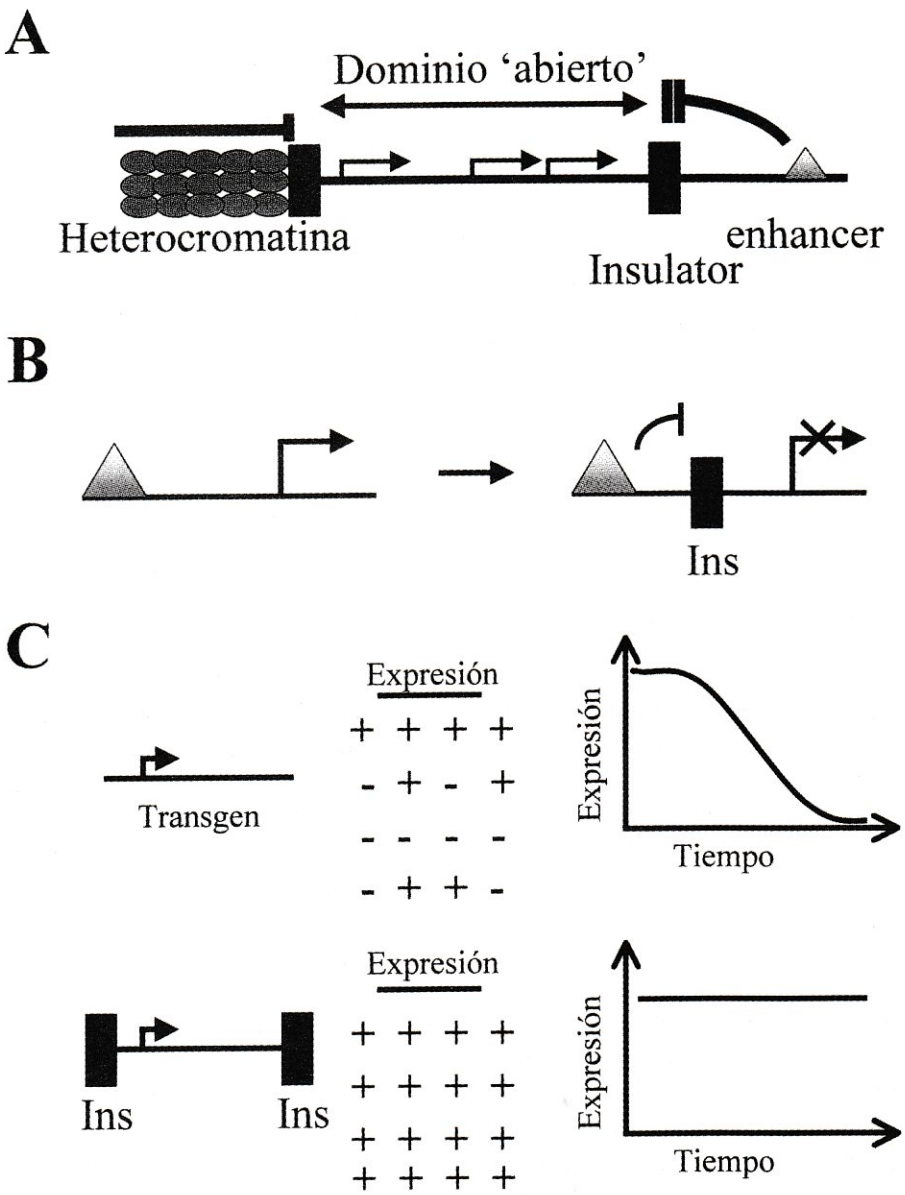


Figura 3. *Actividades Funcionales de los "insulators". A) Los "insulators" son capaces de mantener un dominio abierto protegiéndolo de la invasión de la heterocromatina y de la promiscuidad con elementos de regulación de dominios adyacentes. B) Actividad de bloqueo de "enhancer", un "enhancer" actúa sobre su promotor y lo activa, al colocar el "insulator" entre el "enhancer" y el promotor, se bloquea el efecto del "enhancer" y por lo tanto el promotor no es activado. C) Protección contra el efecto de posición, al integrar un transgen al genoma, su expresión depende del sitio de integración y generalmente decae a lo largo del tiempo, al flanquear el transgen con los "insulators", se suprime el efecto de posición, la expresión del transgen es homogénea y se mantiene a lo largo del tiempo.*

Otra característica funcional de los "insulators" fue demostrada cuando se analizó a *gypsy*, un retrotransposón de *Drosophila*. Esta secuencia era capaz de bloquear la acción de un "enhancer" sobre su promotor solamente cuando se localizaba entre el "enhancer" y el promotor. Esta propiedad también se demostró para *scs* y *scs'*. En particular, el retrotransposón *gypsy* es responsable de una gran variedad de mutaciones que afectan genes a lo largo del genoma de *Drosophila*. Uno de estos genes es *yellow*, el cual es un gen no esencial y su producto está involucrado en la pigmentación de la cutícula de distintos órganos en la mosca de la fruta. La expresión de este gen a lo largo del desarrollo es controlado por una serie de "enhancers" tejido específicos, los cuales se encargan de regular la expresión de *yellow* diferencialmente durante el desarrollo y pigmentar distintas estructuras de la mosca. Los "enhancers" que controlan la expresión de *yellow* en la cutícula, alas y estructuras larvales pigmentadas, están localizados en la región 5' relativa del gen. La inserción de *gypsy* en la región 5' de *yellow* entre el "enhancer" que controla la expresión del gen en la cutícula y el que controla las estructuras larvales, bloquea la interacción del primero con el promotor del gen, pero no afecta al "enhancer" larval que se localiza más próximo al promotor, es decir, entre el transposón y el gen (14). Un análisis más deta-

TABLA II

ELEMENTO	*LOCUS*	ORGANISMO	BLOQUEO DE ENHANCER	PROTECCIÓN CONTRAEFECTO DE POSICIÓN	PROTEÍNA ASOCIADA
HMR-R	HMR	Levadura	ND	ND	SMC, SMC3
HMR-L	HMR	Levadura	ND	ND	ND
UASrpg	Gene TEF2	Levadura	ND	ND	Rap1
STARs	Telómeros	Levadura	ND	ND	Tbf1p, Reb1p
Fab-7	Abdominal-B	*Drosophila*	+	ND	ND
Fab-8	Abdominal-B	*Drosophila*	+	ND	ND
Mcp	Abdominal-B	*Drosophila*	ND	ND	ND
scs	Gene hsp 70	*Drosophila*	+	+	Zw5
scs'	Gene hsp 70	*Drosophila*	+	+	BEAF-32
gypsy	Transposon	*Drosophila*	+	+	Su(Hw), Mod(mdg4)
promotor eve	Gene even-skipped	*Drosophila*	+	ND	GAGA
HS4 β-globina	*Locus* β-globina	Pollo	+	+	CTCF
sns	Gene temprano de histonas	Erizo de mar	+	ND	ND
HS2-6	TCRα/δ-locus Dad-1	Humano	+	ND	ND
BEAD-1	*Locus* TCRα/δ	Humano	+	ND	CTCF
3'HS	*Locus* β-globina	Pollo	+	–	CTCF
DMD	*Locus* H19/Igf2	Humano	+	–	ND
Ars	Gene de la arilsulfatasa	Erizo de mar	+	+	SpGCF1

ND: no detectada, +: sí tiene esa actividad, –: carece de esa actividad.

llado de *gypsy* ha permitido identificar la región dentro del retrotransposón que es responsable del bloqueo de "enhancer". Esta región contiene una secuencia repetida de 8 nucleótidos que se encuentra flanqueada por regiones ricas en adeninas (A) y timinas (T). Cuando esta secuencia es insertada en cualquier lugar del extremo 5' de *yellow*, los "enhancers" que están río arriba de esta secuencia no tienen efecto alguno sobre el promotor, en cambio los que se encuentran río debajo del octámero repetido, siguen siendo funcionales. Además, al colocar estas secuencias flanqueando al transgen *white*, se observó que lo protegían contra el efecto de posición. El fenotipo de las mutaciones causadas por *gypsy*, puede ser revertido al mutar al gen "*suppressor of hairy wing*" *(Su(Hw))*. La proteína del mismo nombre se caracterizó como un componente del "insulator" *gypsy*. Su(Hw) tiene 12 dedos de zinc, interacciona con las secuencias repetidas dentro del retrotransposón *gypsy* y cualquier mutación en el sitio de unión de esta proteína y que como consecuencia impida su unión al "insulator", hace que el efecto de bloqueo de "enhancer" se pierda. Al realizar mutaciones en sitios diferentes a los que interaccionan con *gypsy* en Su(Hw), se identificó otro componente "*modifier of mdg4" (Mod(mdg4))*, esta proteína carece de un dominio de unión al ADN, es incapaz de unirse al "insulator" *gypsy in vitro*, y se ha encontrado que colocaliza con la proteína Su(Hw) y demostrado que interacciona con esta proteína directamente. En ausencia de Mod(mdg4), el "insulator" pierde su unidireccionalidad y adquiere propiedades de silenciador, inactiva "enhancers" río abajo y río arriba del sitio donde se insertó. En resumen, *gypsy* tiene dos componentes principales identificados hasta ahora: Su(Hw) y Mod(mdg4), sin los cuales sus funciones de "insulator" se ven alteradas. Por otra parte, recientemente se han identificado proteínas que se unen a *scs* y a *scs'*. A *scs* se une una proteína codificada por el gene *Zw5* y a *scs'* se unen dos proteínas: BEAF 32A y BEAF 32B. Se ha demostrado que estas proteínas son indispensables para la función de bloqueo de "enhancer" y apoyan el concepto de dominios, ya que se han inmunolocalizado en los límites de los "puffs" de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de las larvas de *Drosophila*. Los casos de *gypsy* y de *scs, scs'* no son

los únicos en que se asocian proteínas a un "insulator", como se verá también en los "insulators" de vertebrados, se ha demostrado la asociación de una proteína llamada CTCF (Tabla II).

El primer "insulator" descubierto en vertebrados es el que delimita al dominio β-globina de pollo en su extremo 5' (15). En este *locus* se identificó un sitio de hipersensibilidad constitutivo (5'HS4), que correspondía al sitio de hipersensibilidad 5'HS5 del mismo *locus* en humano y ratón. Además, río arriba de este sitio de hipersensibilidad en el *locus* de pollo, existe una estructura de cromatina altamente compactada, resistente a la digestión por DNasa I. Otra de las razones por las que se pensó que el 5'HS4 pudiera definir el límite del dominio β-globina, es que hacia el extremo 3' de este sitio de hipersensibilidad, se identificaron otros sitios de hipersensibilidad que corresponden al LCR y este elemento sólo actuaba permitiendo la apertura de la cromatina hacia 3' (que es donde se encuentran los genes del *locus*) y no hacia la región 5' (donde está la estructura de la cromatina altamente compactada). Posteriormente se analizó este elemento y se descubrió que presenta las características funcionales de los "insulators", es decir protege a un transgen del efecto de posición y es capaz de bloquear la acción de un "enhancer" sobre su promotor. Investigaciones recientes han confirmado el concepto de dominio a partir del descubrimiento de un segundo "insulator" en el costado 3' del mismo dominio, lo cual demuestra que este dominio se encuentra enmarcado a ambos lados por "insulators" (Fig. 4). La actividad funcional del "insulator" 5' del gene β-globina pudo reducirse del fragmento de 1.2 kb que contenía el sitio de hipersensibilidad a un fragmento de tan sólo 250 pb al que se le llamó "core", dentro de las 250 pb existe un fragmento de 42 pb que es necesario y suficiente para la función de bloqueo de "enhancer". En 1999 Felsenfeld y colaboradores identificaron y purificaron una proteína que se unía a este sitio y se comprobó que esta proteína era CTCF (CCCTC-binding factor). Para caracterizar la función de CTCF se hicieron mutaciones en el sitio de unión de esta proteína al "insulator" y se descubrió que una menor afinidad de unión de este factor disminuía la capacidad del "insulator" de bloquear la actividad de un "enhancer" sobre su promotor *in vivo*.

La proteína CTCF es altamente conservada en vertebrados, es una proteína de 82 kDa compuesta por 11 dedos de zinc y está involucrada en la activación y el silenciamiento transcripcional dependiendo del contexto en que se encuentre. Se han identificado sitios de unión para

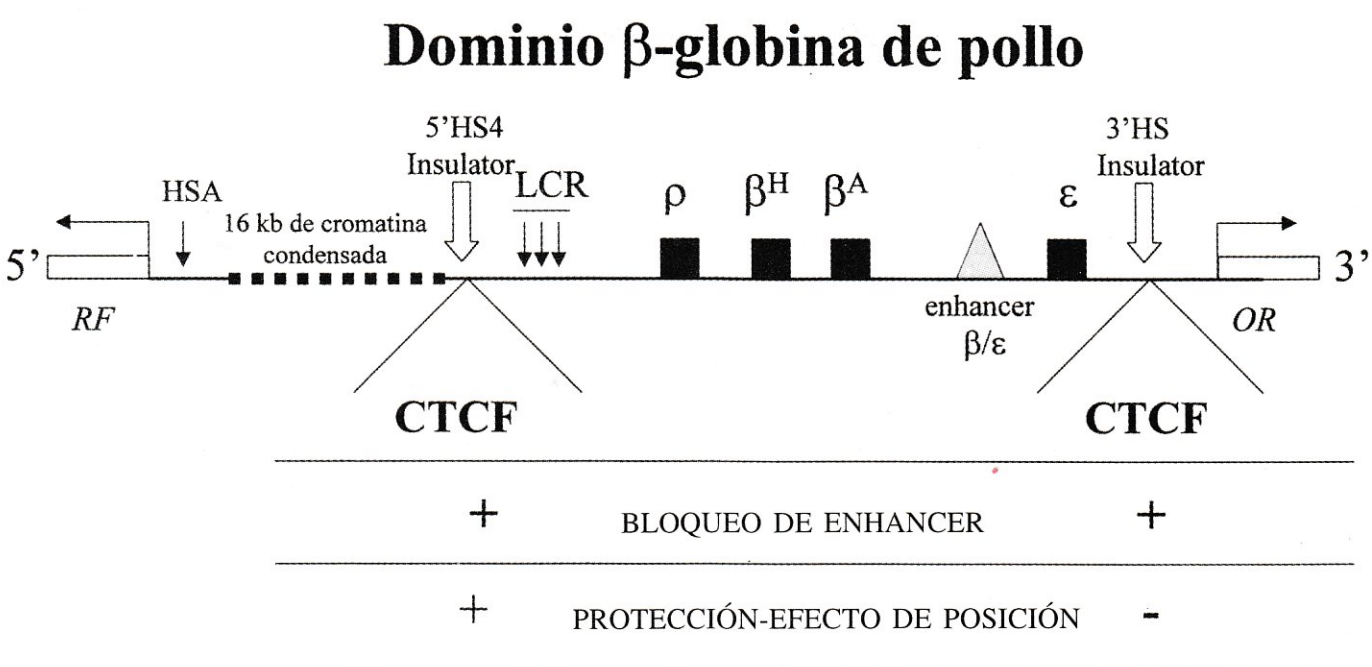


Figura 4. *Esquema del dominio β-globina de pollo. Se señalan la posición de los "insulators" 5' y 3', a los cuales se une la proteína CTCF y las diferentes actividades que presentan. IIS, sitio de hipersensibilidad;* RF, *gene del receptor del folato;* OR, *gene del receptor olfatorio.*

CTCF en otros "insulators" localizados entre genes que se regulan de manera independiente en vertebrados. Por esta razón se ha sugerido que la actividad de bloqueo de "enhancer" mediada por CTCF es un componente funcional de los límites de los dominios de los vertebrados (16).

Una de las evidencias más contundentes de la relevancia de los "insulators" y la participación de CTCF en la regulación génica, es el reciente descubrimiento de una actividad de bloqueo de "enhancer" regulado por "imprinting" en el dominio *Igf2/H19* en ratón y humano. En este dominio de más de 100 kb, el gen *Igf2* se localiza a 80-90 kb del gen *H19*. Ambos genes comparten dos "enhancers" localizados en el extremo 3' de los genes *Igf2* y *H19* respectivamente. Evidencias experimentales demostraron la presencia de una región localizada río arriba del gen *H19* (es decir, entre los genes *Igf2* y *H19*) con la capacidad de ser metilada de manera diferencial dependiendo del tipo de alelo. A esta región se le ha denominado región de metilación diferencial (RMD), la cual se encuentra metilada exclusivamente en el alelo paterno. Trabajos realizados por el grupo de Tilghman (1991) sugirieron originalmente que la expresión alelo específico de estos genes está dada por un mecanismo de competencia entre los "enhancers" distales y los promotores particulares a cada gen. De esta forma se explicaba la especificidad en la expresión monoalélica de cada gen del locus *Igf2/H19*.

Recientemente un cúmulo de estudios experimentales encabezados por los grupos de Tilghman y Felsenfeld demostraron una actividad tipo "insulator" en la región RMD. Esta actividad resulta ser regulada por la interacción del factor CTCF, cuya función es, en este caso, dependiente de la metilación. Para el alelo paterno, donde sólo se expresa *Igf2*, la región RMD se encuentra altamente metilada, lo cual impide la unión de CTCF y por lo tanto no se presenta la actividad de bloqueo de "enhancer", permitiendo la expresión de *Igf2*. Por el contrario, en el alelo materno, donde sólo se expresa *H19*, RMD no está metilado, lo cual permite la unión de CTCF. Esta unión contribuye a una actividad de bloqueo de "enhancer" la cual evita que los "enhancers" activen a *Igf2* y se concentren en la regulación y expresión de *H19*, únicamente en el alelo materno (17). Estas evidencias apoyan el concepto de dominios y la contribución de los "insulators" en la estructura y regulación de los mismos.

Hasta la fecha no ha sido posible determinar los mecanismos exactos de las funciones de los "insulators" y los modelos propuestos tienen una estrecha relación con el funcionamiento propio de los "enhancers". Existen tres modelos propuestos sobre cómo el "insulator" lleva a cabo la función de bloqueo de "enhancer": 1) en el primero, llamado "looping", se propone que el "insulator" interrumpe los contactos proteicos entre el promotor y el "enhancer" (Fig. 5A), 2) en el segundo modelo, llamado "tracking", se propone que al colocar al "insulator" entre el "enhancer" y el promotor, el "insulator" bloquea el paso del complejo de transcripción impidiendo de esta manera la activación del promotor; 3) otro modelo propuesto es el llamado de bloqueo estérico, en el cual, al colocar al "insulator" entre el "enhancer" y el promotor, los factores proteicos que se unen al "insulator" impedirían la unión de los factores del "enhancer", pero hasta la fecha esto no ha sido totalmente comprobado. Anteriormente se había propuesto otro modelo llamado "Decoy" en el cual se propuso que el "insulator" titulaba los factores necesarios para la actividad de los "enhancers" reclutándolos y de esta manera se inactivaba al "enhancer" (Fig. 5A). Sin embargo, actualmente se tienen varias evidencias experimentales que van en contra de este modelo.

Experimentos realizados en transfecciones transitorias con plásmidos circulares y lineales mostraron que los "insulators" no alteran en ninguna forma a los "enhancers" y que su actividad de bloqueo es dependiente de su posición y requieren de proteínas específicas para realizarla. Aunque estos resultados se inclinan mayoritariamente a que el "enhancer" realiza su función por medio del "tracking", ya que el "insulator" bloquea esta función de manera mecánica, a la fecha no existe un estudio que favorezca a uno de los modelos en particular.

Se mencionó que la segunda característica funcional de los "insulators" es proteger a un transgen del efecto de posición cuando se encuentran flanqueándolo. En 1998 Pikaart y colaboradores demostraron que el "insulator" 5' del *locus* β-globina de pollo es capaz de proteger a un transgen del efecto de posición y de la desacetilación y la metilación del *locus* que son sinónimo de represión (18). Basados en estos datos y en los de los "insulators" de *Drosophila*, se propusieron, entre otros, dos modelos sobre cómo el "insulator" podría funcionar para proteger a un dominio del efecto de posición: en el primero, sugieren que el "insulator" funciona como una barrera para el acceso de los complejos de metilación y desacetilación, quizás secuestrando

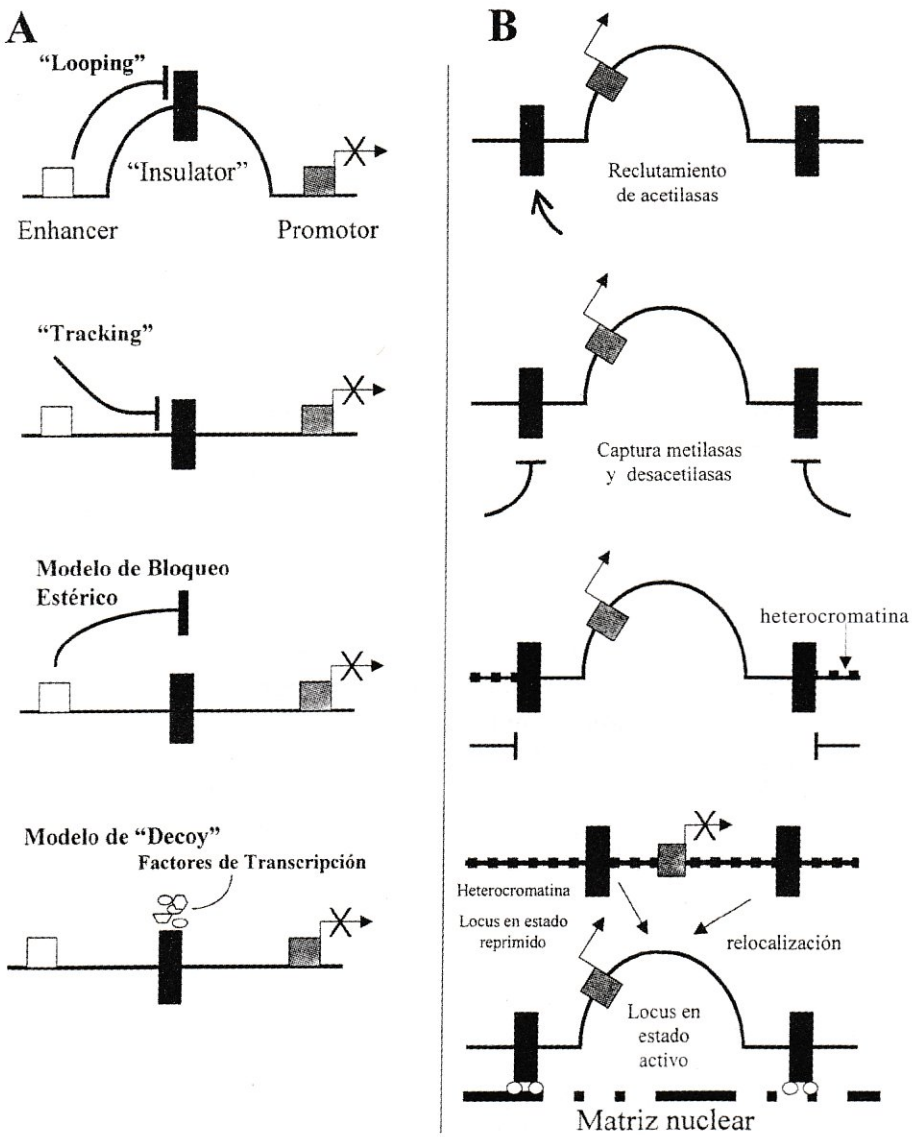


Figura 5. *Modelos propuestos para el funcionamiento de los "insulators". A) Modelos para la actividad de bloqueo de "enhancer". B) Modelos para la actividad de protección contra el efecto de posición. Referirse al texto para mayores detalles.*

desacetilasas de histonas e impidiendo que actúen sobre el dominio; en el segundo modelo, podrían reclutar acetilasas de histonas en mayor número que desacetilasas y así vencer las reacciones de desacetilación que pudieran llevarse a cabo en el *locus* al cual estén flanqueando (Fig. 5B). Anteriormente se mencionó que al integrar un transgen en el genoma, su expresión está supeditada al entorno cromatínico en el cual se integre. Si el transgen se integra en una región de heterocromatina, la expresión del gen es silenciada, ya que la heterocromatina invade al transgen, creando una estructura represora la cual impide su transcripción (Fig 5B). De este concepto se desprende otra actividad de los "insulators", que pueden actuar como una barrera física que impida la invasión de regiones de heterocromatina al transgen (19). Salta a la vista que dadas las propiedades de los "insulators" se está ante un novedoso tipo de elementos de regulación que pueden contribuir a evitar la variabilidad y extinción en la expresión de genes con fines terapéuticos (20) (Tabla II).

En conclusión, los "insulators" son elementos que ayudan a organizar el genoma en dominios cromosomales al servir como límites entre genes o *loci* que se expresan diferencialmente durante el desarrollo, protegiéndolos de los efectos de la cromatina adyacente (ya sea heterocromatina o elementos de regulación en *loci* adyacentes) y ayudando a mantener los dominios abiertos para que puedan ser transcritos.

Otros elementos que delimitan los dominios, son las llamadas secuencias de unión a la matriz nuclear ("Matrix Attachment Regions o Scaffold Attachment Regions, MARs o SARs"), las cuales son elementos en *cis* que están involucrados en la organización de los dominios estructurales asociados con sitios de hipersensibilidad y que se encuentran enmarcando regiones que presentan una sensibilidad generalizada al corte por la DNasa I. A diferencia de los "insulators", no todas las MARs confieren protección contra el efecto de posición, ni tienen una expresión dependiente del número de copias y la gran mayoría no tiene función de bloqueo de "enhancer". Estas secuencias son ricas en A y T, no tienen una secuencia consenso y se identificaron como sitios de unión a la matriz nuclear; el ADN de estas regiones tiene un surco menor más angosto, es propensa a desenrollarse y se dobla con mayor facilidad. Estas secuencias generalmente son reconocidas por la histona H1 y por la topoisomerasa II. Estas dos proteínas contribuyen a compactar la fibra de cromatina en "loops" o bien forman

heterocromatina, por el contrario, otras proteínas como MATH-20 y HMG-IFI, se unen cooperativamente a estas regiones y pueden desplazar a las proteínas que inducen la compactación y de esta manera crear accesibilidad. Tres excepciones a esta regla son las encontradas en la MAR del *locus* de lisozima de pollo, llamadas elementos A, las cuales se encuentran en 5' y 3' delimitando el *locus*. Estas MARs son capaces de proteger contra el efecto de posición y tienen actividad de bloqueo de "enhancer". Otro ejemplo clásico es el de las MARs 5' y 3' del gene humano de la apolipoproteína B (apo B), éstas solamente tienen actividad de protección contra el efecto de posición, sin embargo no son capaces de bloquear a un "enhancer". Existen otros elementos MAR en el gen μ de la inmunoglobulina, éstos fueron encontrados flanqueando el "enhancer" y el promotor del gene. Posteriormente se estudió el papel que jugaban estos elementos en la expresión del gene μ de la inmunoglobulina. Se generaron ratones transgénicos los cuales llevaban construcciones del gene μ con o sin las secuencias MARs, además, analizaron el efecto de la metilación del ADN previo a la transfección (en células en cultivo) en la actividad del gen μ con o sin las MARs. Encontraron que el "enhancer" μ es capaz de activar a un promotor distal en transfecciones estables en células en cultivo, pero no en ratones transgénicos; sin embargo, al estar en combinación con las MARs, el "enhancer" fue capaz de activar al gen también en los ratones transgénicos. Además, el "enhancer" en combinación con una MAR fue capaz de inducir accesibilidad a una región cromatínica. Las secuencias MARs fueron capaces, además, de localizar al transgen a la matriz nuclear y finalmente obtuvieron un dato significativo e inédito en el cual demostraron que las secuencias MARs podían revertir la metilación del ADN, lo que evitaba la represión genética. Sin embargo, las MARs por sí solas son incapaces de ejercer estas funciones, por lo que se propuso que la acción de las MARs era dependiente del "enhancer" (21).

Además de las MARs, se ha demostrado que en el genoma ocurren naturalmente secuencias repetidas ricas en A-T, las cuales presentan algunas propiedades que pudieran estar involucradas en la definición de dominios y a las cuales resulta difícil atribuirles un actividad funcional. Por otra parte, también existen secuencias repetitivas como la familia CR1 que ha sido localizada en los límites de algunos dominios como en los extremos 5' y 3' del *locus* β-globina de pollo, y se ha propuesto que las repetidas de A y T junto con las CR1 pudieran formar una estructura diferente de cromatina que contribuyera a delimitar el dominio.

Al analizar las propiedades de las secuencias delimitadoras como "insulators" o las secuencias MARs, se hace evidente la necesidad de seguir estudiando estas secuencias ya que forman parte fundamental de la organización de los genes en dominios transcripcionalmente activos. A continuación se revisará lo relacionado con las interacciones y la cooperación de estos límites para que los dominios puedan ser regulados.

TERRITORIOS

Hace algún tiempo se pensaba que el núcleo era una estructura donde la transcripción, la duplicación y todas las actividades de procesamiento del ADN, se llevaban a cabo en cualquier lugar de éste. Actualmente se entiende que esto no puede ser cierto ya que se sabe que el núcleo tiene una estructura tridimensional y que esta estructura se adapta a distintas circunstancias, como por ejemplo en respuesta a diferentes tipos de estrés o durante las distintas etapas del ciclo celular para facilitar las funciones celulares, nucleares y de segregación.

En un núcleo en interfase, los cromosomas están organizados en parches llamados territorios cromosomales, los cuales, basados en modelos propuestos por varios grupos, sugieren que se encuentran separados por canales llamados dominios intercromosomales. En esta etapa del ciclo celular, los cromosomas son altamente dinámicos y se ha visto que los genes activos transcripcionalmente se encuentran más cerca de los canales intercromosomales aledaños a la superficie de los territorios y con una mayor superficie de contacto con éstos. Se ha comprobado que los cromosomas se mueven dentro de su territorio y se ha propuesto que la explicación a este movimiento está determinada por la abundancia de factores involucrados en el procesamiento, la transcripción y la duplicación en focos localizados aledaños a estos territorios. Para explicar este concepto, existe un ejemplo clásico que demuestra el movimiento o reclutamiento de genes a una región en las células B de ratón que es rica en una proteína llamada Ikaros. Esta proteína es capaz de inactivar a los genes a través de su relocalización a una región centromérica de heterocromatina. Mientras que los genes que necesitan ser transcritos permanecen en zonas favorables del nucleoplasma, Ikaros recluta a los genes que deben ser reprimidos a sitios de heterocromatina para inactivarlos (22). Esta represión involu-

cra el movimiento de *loci* específicos a un compartimiento nuclear donde son silenciados activamente.

En levaduras se ha observado que los complejos que participan en el silenciamiento genético, particularmente la familia de las proteínas SIR, se localizan en los telómeros cerca de la periferia nuclear donde se encuentran en compartimentos. Se han identificado por lo menos dos proteínas que ayudan a que esto ocurra, una de ellas es el complejo Ku, el cual al ser mutado en cualquiera de sus dos subunidades impide la posición perinuclear del telómero. Además, se ha demostrado que la represión de genes reporteros baja a medida que se alejan de los telómeros (donde se encuentran los complejos represores). Estas evidencias apoyan y asocian el concepto de territorios y dominios. En *Drosophila*, se ha descrito un modelo en el cual se asocian los "insulators" y los elementos de respuesta Polycomb (Pc-G), estos últimos involucrados en la represión de genes pueden actuar en *trans* para mediar la represión y lo hacen a través de interacciones proteína-ADN y proteína –proteína con miembros de la familia Polycomb en zonas definidas dentro del núcleo. Se ha propuesto que la organización y actividad de los "insulators" es influenciada por los elementos Pc-G al establecer dominios subnucleares. Corces y colaboradores han demostrado una clara correlación entre la presencia del "insulator" *gypsy* y una localización subnuclear cercana y en la periferia del núcleo. Las evidencias van más allá dado que demostraron que Su(Hw), el componente central de la acción del "insulator" *gypsy*, colocaliza con una alta frecuencia con la proteína lamina, componente estructural de la membrana nuclear (23).

Las evidencias mencionadas demuestran que en el núcleo debe existir una organización tal que permita la correcta regulación de *loci* independientes, facilitando el remodelaje de la cromatina, ya sea para que se active o se reprima la transcripción en un momento determinado del desarrollo y que los límites de los dominios son elementos importantes para que esta organización se lleve a cabo de manera más eficiente. Además, los nuevos datos surgidos de estudios citológicos apoyan la idea de la necesidad de tener elementos estructurales, ya sean membrana o matriz nuclear, para el anclaje de secuencias que favorezca una topología óptima y así llevar a cabo la expresión de los genes contenidos en un dominio. Actualmente se han hecho estudios en los cuales se ha logrado comprobar que además de los "insulators", los "enhancers" también contribuyen a la organización de los dominios dentro de un contexto cromosómico relocalizándolos lejos de regiones altamente represoras. A continuación se presentan las evidencias.

RELOCALIZACIÓN

Recientemente, dos grupos de investigación independientes analizaron la posibilidad de que los "enhancers" y LCRs contribuyan también a la regulación del dominio al relocalizarlo lejos de regiones de heterocromatina en el interior del núcleo. En el primer trabajo se tomó a uno de los sitios de hipersensibilidad, específicamente el 5'HS2 del *locus* β-globina humano, el cual anteriormente había sido caracterizado como un "enhancer" y en el que se identificaron varios sitios de unión a factores transcripcionales como GATA-1, NF-E2, AP1 y EKLF, y se realizaron mutaciones en sitios específicos para la unión a estos factores, aboliendo su unión. La meta de este estudio era tratar de contestar dos preguntas: primero, si la interrupción de la unión de factores abolía la actividad del "enhancer" y segundo, si estas interrupciones afectaban la localización subnuclear de un transgen.

Se valieron de una técnica de recombinación homóloga para integrar a un transgen cuya expresión era dirigida por el HS2 completo o con las diversas mutaciones en los sitios de unión a factores, actuando en una región cercana al centrómero. Visualizaron al transgen en todos los casos mediante una técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) y comprobaron su expresión; cuando el "enhancer" se encontraba intacto, de una manera estadísticamente significativa, demostraron que el transgen era relocalizado lejos del centrómero y se expresaba adecuadamente, lo que no pasaba en presencia del "enhancer" mutado. Concluyeron que se requiere un "enhancer" funcional tanto para suprimir el silenciamiento genético como para relocalizar a un gen lejos de la heterocromatina centromérica durante la interfase, y que la supresión del silenciamiento requiere de la relocalización del transgen lejos de regiones de heterocromatina (24).

Basados en estos resultados se propuso un modelo en el cual los factores que se unen al "enhancer", posiblemente actúan reclutando y translocando al transgen a compartimentos nucleares o territorios donde existen factores y elementos basales de la transcripción en grandes concentraciones, por sus interacciones con éstos. A su vez no se descarta la posibilidad de que alguno de los factores del "enhancer" reclute a complejos de acetilación, metilación o de remodelaje de la

cromatina completando el ciclo regulador que lleve a la expresión regulada de un gen.

En el segundo trabajo se analizó la posibilidad de que el LCR también estuviese involucrado en la apertura de la cromatina y en la activación transcripcional. El grupo de Groudine se valió de líneas celulares que tenían por un lado al LCR completo del *locus* β-globina (con los 5 sitios de hipersensibilidad) y por otro la supresión presente en la talasemia hispánica ΔHS1-HS5, y una línea celular donde ellos generaron una supresión más pequeña que abarcaba ΔHS2-5. Por medio de FISH analizaron si la ausencia del LCR afectaba a la localización del *locus* y encontraron que la localización en las líneas con el *locus* silvestre y las que tenían la supresión ΔHS2-5, se localizaban lejos del centrómero y tenían a las histonas H3 y H4 hiperacetiladas a lo largo del *locus* (25). Estos datos indicaban que en realidad el LCR no era necesario para la localización del *locus* lejos de la heterocromatina centromérica, ya que la línea celular con la supresión parcial del LCR (ΔHS2-5) también se localizaba lejos del centrómero y además la sensibilidad al corte por la DNasa I se mantenía. Por otra parte, la hiperacetilación de las histonas H3 y H4 es característica de un *locus* β-globina que está abierto. Anteriormente, se había pensado que ésta era una característica que dependía del LCR, pero con los datos anteriores se demostró que el LCR no es necesario para esta acetilación, por lo que infirieron que para la localización del *locus* lejos de la heterocromatina centromérica mediaba una estructura más abierta y una hiperacetilación generalizadas del *locus* y que estas actividades eran independientes del LCR. Por otro lado, la acetilación de H3 cerca del LCR en el *locus* silvestre, que es transcripcionalmente activo, es mucho mayor cuando el LCR se encontraba intacto. Estos datos sugirieron que el LCR no actúa directamente en mantener una estructura abierta de la cromatina, ni ayuda a alejar al *locus* de entornos heterocromáticos y por lo tanto represores, más sin embargo podría actuar a otro nivel para regular la expresión del *locus*.

Esto crea una controversia en cuanto a lo que se conoce del LCR, ya que en estudios realizados por Proudfoot (1997) y de manera independiente por Fraser y colaboradores (2000), demostraron la presencia de transcritos intergénicos los cuales son dependientes de la integridad del LCR (11, 12). Estos dos grupos han propuesto que los transcritos intergénicos contribuyen a la apertura de la cromatina, ya que se encuentran presentes a lo largo del *locus*, son estadio específicos y sólo se encuentran en células donde el *locus* es expresado, es decir, células eritroides. Una de las explicaciones de lo resultados que indican que el LCR no es necesario para la apertura del dominio, es que la regulación de la expresión del *locus* se da en varias etapas y posiblemente niveles, y que la combinación de los diferentes factores juega un papel importante para la regulación del *locus*. Actualmente se están realizando diversos estudios para resolver esta controversia.

MODELOS DE APERTURA Y CERRADO DE DOMINIOS

Se ha establecido que la cromatina no solamente funciona para ayudar a contener al genoma dentro del núcleo, sino también para reprimir la actividad genética, se ha mencionado que esta estructura represora debe remodelarse para permitir la expresión regulada de los genes. Se ha visto que los elementos de regulación en *cis* contribuyen a la formación de una estructura más abierta de la cromatina, muchos de estos elementos en *cis*, interactúan con elementos proteicos para lograr este objetivo. En esta parte de la revisión se tratará de explicar cómo los complejos de remodelaje, la acetilación y la desacetilación de los residuos amino-terminales de las histonas, además de la metilación, juegan papeles importantes para la apertura y el cerrado de la cromatina.

Los complejos de remodelaje están compuestos por conjuntos de proteínas capaces de desplazar o disociar parcialmente un nucleosoma, para que la región donde se encuentren posicionados pueda ser más accesible. Entre estos complejos de remodelaje existen los que son dependientes de ATP, entre estos el mejor descrito es el complejo SWI/SNF, el cual fue inicialmente descrito en levadura y que actualmente se sabe que tiene homólogos en mamíferos; contiene una subunidad llamada SWI2/SNF2 con actividades de ATPasa y helicasa de ADN. Un modelo propuesto para la acción de SWI/SNF es que este complejo puede encarrilarse en el ADN y moverse a lo largo de éste y así desplazar a los nucleosomas, aunque esta propuesta no está del todo aceptada. Un segundo modelo propone que las histonas H2A y H2B se desestabilizan, se tiene evidencia que esta desestabilización facilita el acceso a factores de transcripción al ADN nucleosomal. Se ha encontrado que este complejo es capaz de participar en la unión de derivados de un activador transcripcional GAL4 a sus sitios específicos en un mo-

nonucleosoma reconstituido, de una manera dependiente de ATP, también alterar el patrón de digestión de un nucleosoma y cooperar para interrumpir un arreglo de nucleosomas preensamblados.

Otros complejos que utilizan ATP son: RSC y NURF (del inglés "NUcleosome Remodeling Factor"). RSC contiene varias subunidades homólogas a SWI/SNF y se ha visto que contiene una actividad dependiente de ATPasa capaz de alterar la estructura nucleosomal *in vitro*. CHRAC ("CHRomatin Accesibility Complex") moviliza un arreglo nucleosomal y arregla los nucleosomas en una espaciación periódica. Se sabe que muchos de estos complejos de remodelaje comparten subunidades, lo que implicaría un ahorro de energía para la célula, además se ha visto que existen homologías de las actividades muy conservadas entre estos complejos en los diferentes organismos, lo que indica su importancia.

Además de los complejos de remodelaje dependientes de ATP, existen los que reclutan una actividad de desacetilasas o acetilasas de histonas. Anteriormente se discutió que los extremos amino-terminales de las histonas quedan por fuera del octámero rodeando a la fibra de ADN y estabilizando la unión de ésta con el octámero. Estos extremos amino-terminales de las histonas son pequeños, varían entre 11 y 15 residuos y sufren diferentes modificaciones como acetilación, fosforilación, metilación y ribosilación que correlacionan con una estructura más abierta o cerrada del dominio, entre otras funciones. Los extremos amino-terminales de las histonas del octámero pueden ser modificados reversiblemente por la acetilación de sus residuos de lisina, los cuales interaccionan iónicamente con los fosfatos cargados negativamente de la estructura del ADN. La acetilación de las histonas resulta en una neutralización de la carga y como consecuencia una separación del ADN de las histonas, lo que le permite al ADN nucleosomal ser más accesible a los factores de transcripción. La hiperacetilación de histonas en un dominio, se ha correlacionado con regiones activas del genoma, mientras que las regiones inactivas están hipoacetiladas. Los niveles de acetilación dependen de complejos que tienen actividad de acetiltransferasas o de desacetilasas. Algunos de los activadores y coactivadores que tienen actividad de acetiltransferasa, son GCN5, p300/CBP y la $TAF_{II}250$. GCN5 acetila la histona H3 en la lisina 14 y a la histona H4 en las lisinas 8 y 16 pero sorprendentemente se descubrió que GCN5 sólo acetila histonas libres. Por su parte, P/CAF (p300/CBP associated factor) interacciona con coactivadores transcripcionales como p300/CBP (CREB-binding protein) que es una acetiltransferasa, la cual es capaz de acetilar a las histonas libres o en el octámero. P/CAF acetila a las histonas libres (H3 y H4) y a la histona H3 en el octámero. Además, se sabe que p300 y CBP interaccionan con numerosos factores de transcripción como CREB, c-jun/v-jun y Fos. La $TAF_{II}250$ es parte del complejo de TFIID y tiene una actividad de acetiltransferasa, que acetila a H3 y a H4 en sus extremos amino-terminales y se propone que gracias a esta subunidad TFIID es capaz de desestabilizar a los nucleosomas que están en el promotor, lo que confiere al complejo de transcripción la habilidad de abrir una región de la cromatina sobre la cual está transcribiendo (26). Dentro de los complejos de desacetilasas de histonas que se han identificado está la HDAC-1 en humanos, Rpd3 en levadura y su homólogo en *Drosophila*. Estos complejos se asocian a represores que controlan la proliferación y diferenciación celular como Mad(mxi1)/Max, Sin3 y YY1.

Otro sistema que es utilizado para controlar el cerrado de un dominio o de una zona amplia del genoma, es la metilación del ADN en dinucleótidos CpG, la metilación de citosinas en el carbono 5 de los dinucleótidos es una característica del genoma de eucariotes. En vertebrados, 60-90% de los CpG's están metilados y los CpG's que no están metilados (cerca del 15% de todos los CpG's del genoma) se encuentran en islas CpG. Se ha comprobado que la metilación de regiones del genoma provoca la pérdida de sitios de hipersensibilidad, y le confiere al ADN resistencia a la digestión por nucleasas. Este mecanismo es independiente de secuencias específicas y es un sistema de expresión global. El mecanismo molecular por el que la metilación del ADN reprime la transcripción no es del todo conocido, sin embargo existen reportes que relacionan a la metilación con la desacetilación de histonas. Una proteína que se une a regiones metiladas es MeCP2, que es capaz de interactuar con la cromatina de una manera dependiente de la metilación y recientemente se ha comprobado que puede unirse a componentes del complejo mSin3A/HDAC. La asociación entre MeCP2 y este complejo es muy clara, por lo que se ha propuesto que una región del genoma que esté metilada puede ser silenciada por desacetilación dependiente de MeCP2 generando un estado permanente de represión

a nivel de la estructura de la cromatina. El efecto del silenciamiento mediado por MeCP2, puede ser parcialmente revertido al utilizar un inhibidor de las desacetilasas como la tricostatina A (TSA), lo que indica que la acetilación puede contrarrestar, al menos en parte, el silenciamiento de un gen. Otra forma de revertir el silenciamiento por metilación sería el reclutamiento de desmetilasas; sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado evidencias contundentes de su existencia. La metilación del ADN no es necesariamente la primer causa de inactivación de un gene, podría ser un evento secundario o haber más de una manera de inactivación, lo que queda claro es que estos diferentes mecanismos (activadores y represores) actúan de una manera cuidadosamente regulada para permitir la apertura o cerrado de dominios en la cromatina.

Recientemente, los modelos que se han propuesto acerca de la manera cómo los límites de los dominios regulan la apertura y cerrado de los mismos, relacionan a los "insulators" y MAR's con complejos de remodelaje, metilación y acetilación/desacetilación. Felsenfeld propuso que los límites actuarían reclutando acetilasas y complejos de remodelaje para crear una estructura más accesible del dominio. Recientemente se han encontrado evidencias en el "insulator" 5'HS4 β-globina de pollo que indican la presencia de una actividad de acetilasa de histonas, la cual al parecer tiene direccionalidad. Además, Felsenfeld propuso que los límites eran capaces de bloquear la acción de desacetilasas y metilasas para impedir que éstas actuaran sobre el dominio y mantenerlo abierto. Por otra parte, al reunir todos los estudios acerca de los límites de los dominios (en particular de los "insulators"), existen evidencias que demuestran que las funciones de estos límites dependen del contexto cromatínico en el cual se encuentren, es decir, la actividad de bloqueo de "enhancer" está destinada a evitar la promiscuidad entre los elementos de regulación de dominios adyacente como sucede en el caso del "insulator" 3' del *locus* β-globina de pollo. Este "insulator" sólo presenta actividad de bloqueo de "enhancer"; por el contrario, el "insulator" 5'HS4 del mismo *locus* presenta ambas actividades (bloqueo de "enhancer" y protección contra el efecto de posición). Se ha propuesto que esto se debe a que río arriba del "insulator" se encuentra una región de heterocromatina y por lo tanto debe de evitar que esta estructura represora invada el dominio (Fig. 4). Pero no en todos los casos los "insulators" se han encontrado flanqueando un *locus*, también puede haber "insulators" que se encuentren de un solo lado del *locus* o entre dos genes como el "insulator" del RMD del *locus H19/Igf2*, o incluso *locus* en los cuales no sería necesaria su presencia.

Todas estas evidencias muestran que el futuro del estudio de la regulación de la expresión genética se verá íntimamente relacionado con aspectos tanto topológicos, a través de la formación de dominios, cómo con distintas localizaciones y relocalizaciones de los dominios en nuevos compartimientos subnucleares.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El objetivo de esta revisión fue definir las características de un dominio transcripcional, sus elementos estructurales y de regulación y la manera cómo éstos colaboran para la expresión específica de los genes contenidos en ellos. El hecho de que la cromatina sea una estructura altamente represora, da relevancia a la existencia de los elementos que son capaces de remodelarla para poder activar y regular la transcripción genética. Entre los elementos que regulan la transcripción revisamos a los LCRs, "enhancers" y los "insulators". Estos últimos tienen especial y novedosa importancia ya que son los encargados de delimitar a los dominios, de cooperar con distintos elementos para mantener a los dominios accesibles y protegerlos de los efectos de la cromatina adyacente. La organización del genoma en dominios independientes y la cooperación de los elementos inherentes a ellos para su regulación específica ha llevado a proponer a los dominios como un primer nivel de regulación de la expresión genética.

Al parecer, las investigaciones a futuro tienden a centrarse en dos tipos de enfoques: en estudios citológicos y estudios aplicables como la terapia génica. En los primeros se tendrá que dilucidar la relación entre los elementos de regulación de los dominios y los territorios cromosomales, al parecer se puede imaginar una relación entre los "insulators", MARs, "enhancers" y LCRs con la relocalización de los dominios a sitios donde pueden ser transcritos con mayor eficiencia y topológicamente, lejos o cerca (según sea requerido) de regiones potencialmente represoras dentro del núcleo. Esto ayudaría a entender mejor lo que hasta ahora ha permanecido como una caja negra: la manera como la arquitectura del núcleo favorece la formación de dominios y a tener una idea más clara de lo que ocurre realmente *in vivo* en cuanto a la dinámica de la regulación de la expresión genética.

Dentro de los estudios aplicables estaría el análisis de los "insulators" y secuencias MARs como elementos con una importancia fundamental en la terapia génica. Como se mencionó, el "insulator" 5'HS4 del *locus* β-globina de pollo está siendo utilizado para flanquear transgenes con resultados favorables. Se puede decir que éste es un claro ejemplo de cómo los estudios realizados en ciencia básica apoyan a la ciencia aplicada en medicina.

Por último, si se supone que la formación de un dominio es importante, queda claro que no basta solamente con conocer las secuencias codificantes para entender el funcionamiento y regulación del genoma, y que esto debe ser tomado en cuenta al realizar e interpretar los resultados de proyectos tan ambiciosos como la secuenciación del genoma humano.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Drs. Marietta Tuena y Alejandro Zentella y a los miembros del laboratorio del Dr. Félix Recillas por sus sugerencias y lectura crítica de este manuscrito. Este trabajo fue apoyado por los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN203200) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACyT (33863-N).

REFERENCIAS

1. Luger K, Mader A, Richmond R, Sargent D y Richmond T (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. Nature *389*: 251-260.
2. Widom J (1998) Chromatin Structure: linking structure to function with histone H1. Curr Biol *8*: R788-R791.
3. Orphanides G y Reinberg D (2000) RNA polymerase II elongation through chromatin. Nature *407*: 471-475.
4. Wu C, Wong Y C y Elgin S C (1979) The chromatin structure of specific genes: II Disruption of chromatin structure during gene activity. Cell *16*: 807-814.
5. Boyes J y Felsenfeld G (1996) Tissue-specific factors additively increase the probability of the all-or-none formation of a hypersensitive site. EMBO J *15*: 2496-2507.
6. Blackwood E y Kadonaga J (1998) Going the distance: A current view of enhancer action. Science *281*: 60-63.
7. Kamakaka R (1997) Silencers and locus control regions: opposite sides of the same coin. Trends Biochem Sci *22*: 124-128.
8. Martin D, Fiering S, Groudine M (1996) Regulation of β-globin gene expression:straightening out the locus. Curr Op Gen Dev *6*: 488-495.
9. Fraser P y Grosveld F (1998) Locus control regions, chromatin activation and transcription. Curr Op Gen Dev *10*: 361-365.
10. Bulger M y Groudine M (1999) Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. Genes Dev *13*: 2465-2477.
11. Ashe H, Monks J, Wijgerde M, Fraser P y Proudfoot N (1997) Intergenic transcription and transinduction of the human β-globin locus. Genes Dev *11*: 2494-2509.
12. Gribnau J, Diderich K, Pruzina S, Calzolari R y Fraser P (2000) Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human β-globin locus. Mol Cell *5*: 377-386.
13. Kellum R y Schedl P (1991) A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. Cell *64*: 941-950.
14. Gdula D, Gerasimova T y Corces V (1996) Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA *93*: 9378-9383.
15. Chung J, Bell A y Felsenfeld G (1997) Characterization of the chicken β-globin insulator. Proc Natl Acad Sci USA *94*: 575-580.
16. Bell A, West A y Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer-blocking activity of the vertebrate "insulators". Cell *98*: 387-396.
17. Bell A y Felsenfeld G (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. Nature *405*: 482-485.
18. Pikaart M J, Recillas Targa F y Felsenfeld G (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by "insulators". Genes Dev *12*: 2852-2862.
19. Bell A y Felsenfeld G (1999) Stopped at the border: boundaries and "insulators". Curr Opin Gen Dev *9*: 191-198.
20. Emery D, Yannaki E, Tubb J y Stamatoyannopoulos G (2000) A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. Proc Natl Acad Sci USA *97*: 9150-9155.

21. Forrester W, Fernández L y Grosschedl R (1999) Nuclear matrix attachment regions antagonize metylation-dependent repression of long-range enhancer-promoter interactions. Genes Dev *13*: 3003-3014.

22. Lamond A y Earnshaw W (1998) Structure and function in the nucleus. Science *280*: 547-553.

23. Gerasimova T, Byrd K y Corces V (2000) A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. Mol Cell *6*: 1025-1035.

24. Francastel C, Walters M, Groudine M y Martin D (1999) A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. Cell *99*: 259-269.

25. Schübeler D, Francastel C, Cimbora D, Reik A, Martin D y Groudine M (2000) Nuclear localization and histone acetylarion: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human β-globin locus. Genes Dev *14*: 940-950.

26. Wu C (1997) Chromatin remodeling and the control of gene expression. J Biol Chem 272: 28171-18174.

CITOCINAS Y ACTIVACIÓN ENDOTELIAL*

Adriana Estrada Bernal[1]

RESUMEN

Las células endoteliales cubren la superficie interna de los vasos sanguíneos por lo que juegan un papel importante en la homeostasis de tejidos, fibrinólisis, coagulación, intercambio sangre-tejido, regulación del vasotono, vascularización de tejidos normales y neoplásticos y en la activación y migración de células sanguíneas durante procesos fisiológicos y patológicos. Uno de los procesos fisiológicos más estudiado es la reacción inflamatoria en la que las células endoteliales juegan un papel importante al ser el primer blanco de las citocinas liberadas por células sanguíneas. Cuando las células endoteliales son expuestas a citocinas, sus funciones básicas se ven alteradas profundamente; estas alteraciones involucran la expresión de genes y la síntesis de proteínas, proceso que requiere horas para desarrollarse y que tienen un largo efecto temporal, un fenómeno conocido como activación endotelial. En esta revisión se analiza la activación de las células endoteliales mediada por diversas citocinas, asi como las respuestas, regulación y efectos de esta activación.

PALABRAS CLAVE: Endotelio, activación endotelial, citocinas.

ABSTRACT

Vascular endothelial cells cover the entire inner suface of blood vessels, thus they play an important role in tissue homeostasis, fibrinolysis, coagulation, blood-tissue exchange, vasotonous regulation, vascularization of normal and neoplastic tissues, and blood cell activacion and migration during physiological and pathological processes. One of the physiological processes that have been most widely studied is the inflammatory reaction in which endothelial cells play an important role as targets of cytokines, secreted by blood cells. When endothelial cells are exposed to cytokines, their basic functions are profoundly altered. These alterations involve gene expression and protein synthesis so these processes need hours to develop and have long term effects. All of these events are involved in the process called endothelial cell activation. In this review, it is analyze cytokine mediated endothelial cell activation and the effects and regulation of this activation.

KEY WORDS: Endothelial cell, activated endothelium, cytokines.

INTRODUCCIÓN

Más de 10^{12} células endoteliales recubren el interior de los vasos sanguíneos cubriendo un área de más de 1000 m^2. Las células endoteliales no sólo forman la base estructural de los vasos sanguíneos, sino que proveen una superficie notrombogénica para el flujo sanguíneo y contribuyen a numerosas funciones metabólicas incluyendo la coagulación, fibrinólisis, control del vasotono, presentación de antígeno, síntesis de factores de crecimiento y la regulación del tráfico de células circulantes (Fig. 1).

En un adulto sano el endotelio a pesar de estar metabólicamente activo se considera en estado de reposo porque su recambio es muy bajo, a lo que se conoce como fenotipo constitutivo de las células endoteliales (Fig. 2). Estas células formán una población celular heterogénea que varia no sólo en diferentes órganos, sino también en vasos de distintos calibres dentro del

*Recibido: 6 de febrero de 2001. Aceptado: 25 de septiembre de 2001.

[1]Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-243, C. P. 04510, México, D.F. Tel. 5622-5609, Fax 5622-5611. Correo E: aestrada@ifisiol.unam.mx

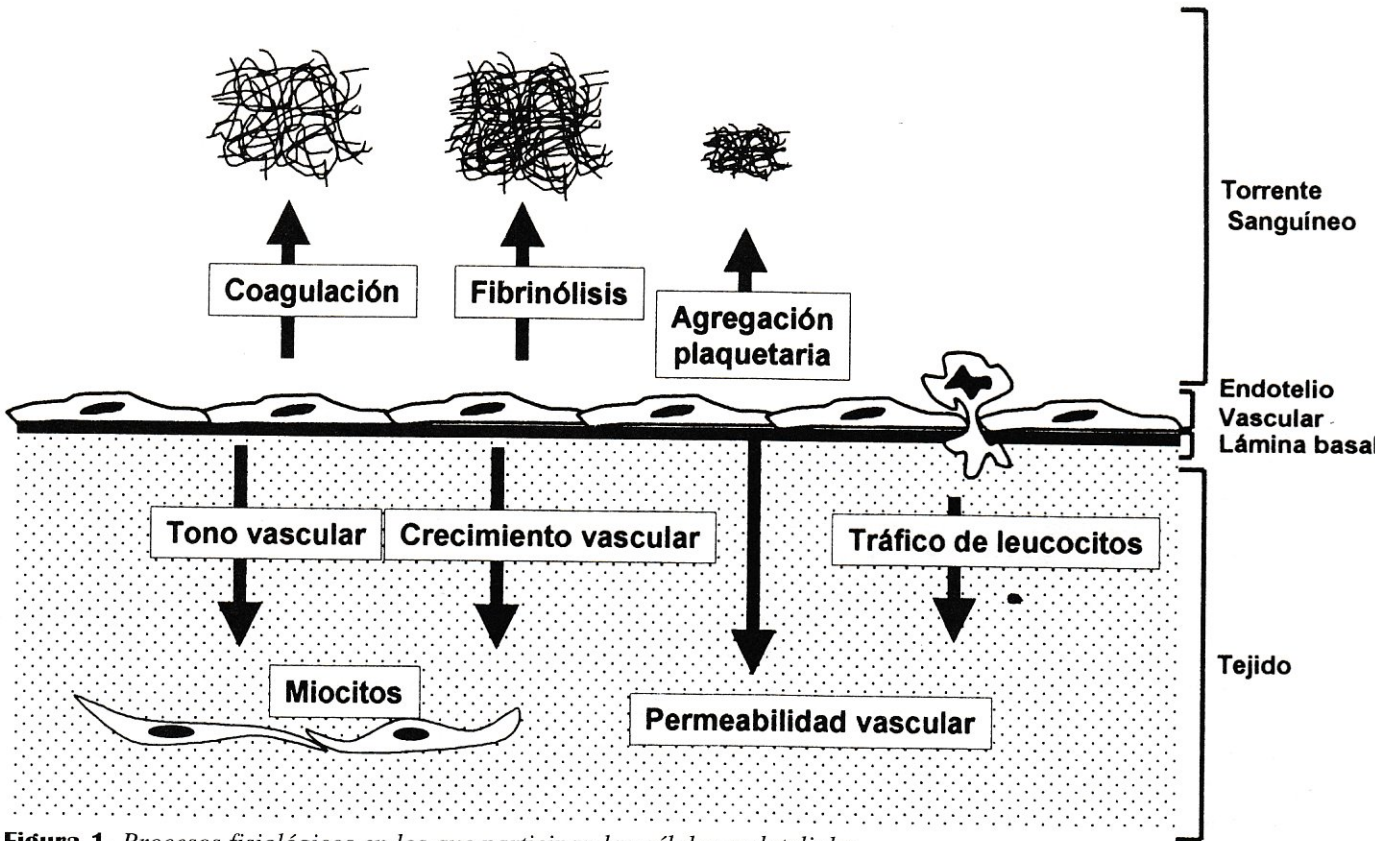


Figura 1. *Procesos fisiológicos en los que participan las células endoteliales.*

mismo órgano. Pueden formar una monocapa continua y fuerte en los órganos donde realizan funciones de barrera como en los pulmones o el cerebro; o pueden formar una capa discontinua con espacios intercelulares o intracelulares (fenestrados). A pesar de que su heterogeneidad estructural es bien reconocida, poco se sabe acerca de las moléculas que regulan el fenotipo constitutivo.

El fenotipo activado inducido por citocinas durante la inflamación ha sido el más estudiado y por tanto el mejor caracterizado (1). Cuando las células endoteliales son activadas por citocinas, sufren profundas alteraciones funcionales que involucran respuestas inmediatas como la aparición de proteínas de membrana previamente sintetizadas y almacenadas en vesículas secretorias; sin embargo, también existen respuestas más lentas pero de larga duración como la inducción de la expresión y síntesis de enzimas o de antígenos de membrana, evento que requiere varias horas para desarrollarse completamente (Fig. 2).

Las células endoteliales son tanto blanco como fuente de citocinas. Estos mediadores polipeptídicos solubles funcionan como señales de comunicación con leucocitos, y con diferentes tejidos y órganos (2).

De ahí la importancia de definir las citocinas que determinan la activación endotelial, así como su respuesta y la regulación de la misma dependiendo de las diferentes señales extracelulares a las que sean expuestas. En esta revisión se analizará la fenomenología de la activación endotelial por citocinas, enfatizando la producción y la acción de varios mediadores (como quimiocinas), así como algunas bases moleculares para la activación endotelial y la implicación fisiológica de la activación.

CITOCINAS

En la fase efectora de la respuesta inmune participan linfocitos T estimulados por antígeno, los cuales secretan mediadores proteicos que activan varias poblaciones celulares reclutándolas al sitio de lesión. La más notable de estas poblaciones es la de los fagocitos mononucleares que pueden secretar un segundo grupo de proteínas que están en posibilidad de influenciar la reacción inmune. Estos derivados de linfocitos y fagocitos mononucleares fueron llamados linfocinas o monocinas respectivamente. Posteriormente, se descubrió que células que no forman parte del sistema inmune eran capaces de secretar estas mismas proteínas y su nombre cambió a citocinas.

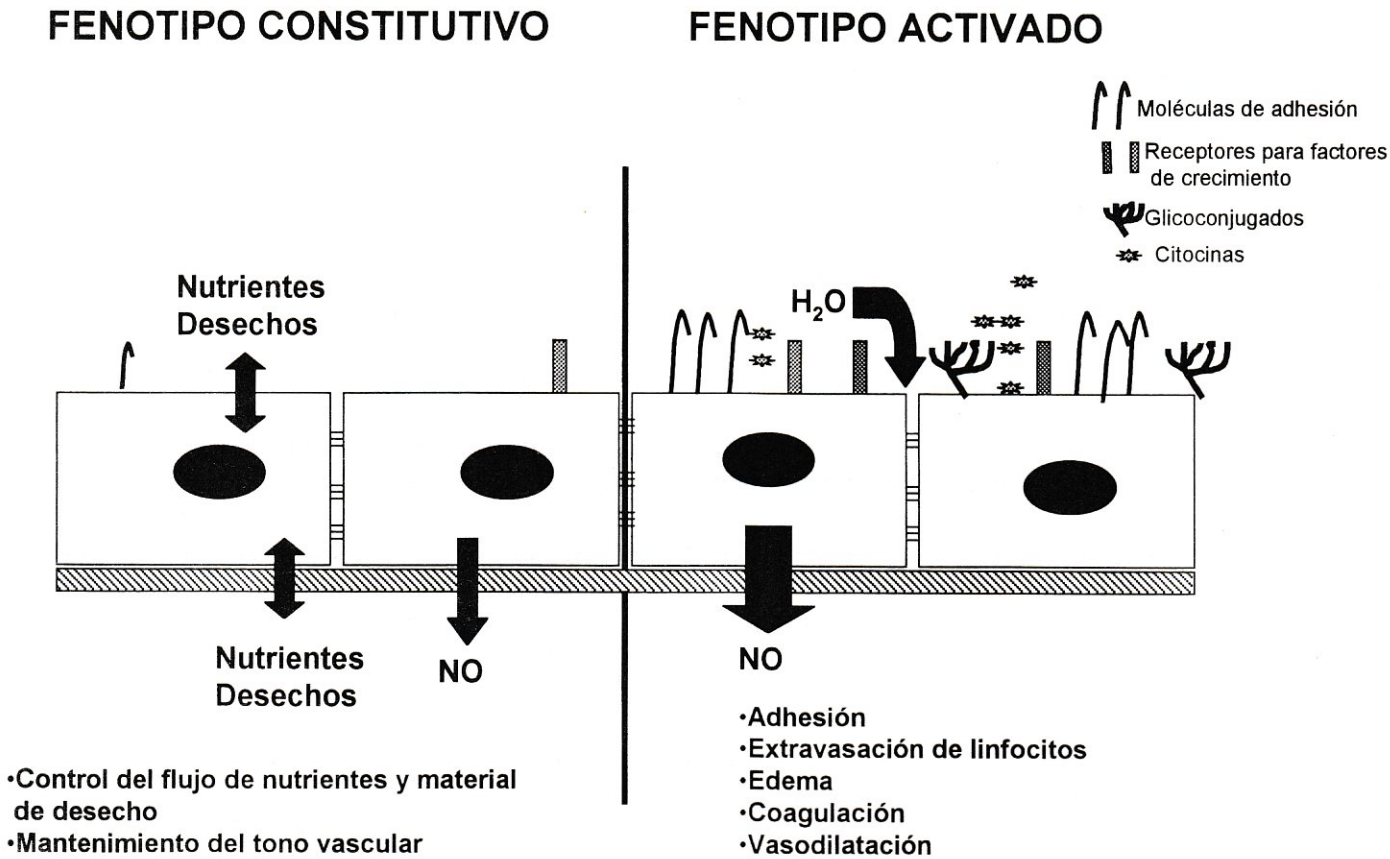


Figura 2. *Fenotipo constitutivo y activado de las células endoteliales. Representación de las funciones que realiza el endotelio cuando se encuentra en estado quiesciente (constitutivo) o activado.*

Si bien es cierto que no existe una definición rigurosa para que una proteína sea considerada citocina, ésta tiene que cumplir con ciertas características mínimas: 1) debe mediar algún aspecto de la reacción inflamatoria; 2) debe ser liberada como parte de la respuesta inmune a antígenos; 3) una citocina frecuentemente causa la secreción de una segunda citocina por su célula blanco y así sucesivamente y, 4) citocinas individuales que regulan la actividad de otras citocinas en la misma célula blanco. Las interacciones entre citocinas pueden ser inhibitorias, aditivas, sinérgicas o pueden resultar en efectos nuevos no observados con cada una de las citocinas individuales. Así que, el efecto preciso de una citocina será determinado por el contexto celular en el que actúa (3).

Las citocinas no siempre son secretadas; en algunos casos pueden ser expresadas en la superficie de la célula estimulada. Sin embargo, secretadas o expresadas en la superficie, comparten un modo de acción: se unen a receptores específicos en la superficie de su célula blanco. Las citocinas no tienen actividad enzimática ni una reactividad química como las de otras proteínas, pero a través de la activación de sus receptores alteran el comportamiento de la célula blanco; en este sentido, las citocinas son similares a las hormonas. La célula blanco de las citocinas puede ser la célula de origen (acciones autócrinas) o pueden ser células cercanas (acciones parácrinas).

En general, existen tres tipos de respuestas independientes del endotelio que pueden estar relacionadas con las citocinas. En el primer tipo de respuesta, las células endoteliales pueden ser lesionadas durante la respuesta inmune, por ejemplo, el rechazo a órganos transplantados parece ser principalmente una respuesta inmune en contra de las células endoteliales extrañas. En este contexto, es posible que la lesión endotelial sea resultado directo no sólo de la destrucción por el sistema de complemento y células T citotóxicas, sino que también resulta de la unión de citocinas a sus receptores en la célula endotelial. En el segundo tipo, las células endoteliales pueden migrar, proliferar y formar nuevos vasos (4), proceso conocido como angiogénesis, la cual es un componente clave de la remodelación de tejido que acompaña la in-

flamación crónica y existe evidencia de que ciertas citocinas pueden iniciar este proceso; una situación análoga ocurre durante la angiogénesis de tumores. Y en el tercer tipo, las células endoteliales pueden adquirir la capacidad para realizar nuevas funciones sin la evidencia de lesión o de división celular; este proceso, al que se le ha llamado activación, es el resultado de cambios cuantitativos y cualitativos de ciertos productos génicos y es una de las respuesta a citocinas mejor estudiadas (3, 5).

Siendo que la activación es definida como un cambio de capacidades y funciones, se podría decir que existen distintos estados de activación. De hecho, la distinción entre los estados de activación, lesión y el estado de proliferación puede ser artificial y ciertamente no excluyente (3).

ACTIVACIÓN ENDOTELIAL POR CITOCINAS

Las citocinas más estudiadas han sido el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleucina 1 beta (IL-1β), ambas son producidas por macrófagos activados y son reguladoras pleiotrópicas de la inflamación. El efecto de estas citocinas sobre el endotelio es muy semejante, de ahí que se presenten juntos.

Interleucina-1 beta (IL-1β) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α)

En su estado basal, la membrana endotelial presenta una superficie anticoagulante que se mantiene por varios mecanismos: la expresión del anti-coagulante sulfato de heparan que cataliza la vía de la trombina III y la expresión de trombomodulina y la secreción de proteína S, las que cataliza la vía de activación de la proteína C. Adicionalmente, las células endoteliales inhiben la agregación de plaquetas al sintetizar prostaciclinas (prostaglandina, I_2, PGI_2) y al catalizar la conversión de la adenosin difosfato (activador de plaquetas) a adenosina (inhibidor de la agregación de plaquetas) (6).

El tratamiento con IL-1β y el TNF-α induce a las células endoteliales a sintetizar y expresar en su superficie el factor tisular (TF), adquiriendo la capacidad de unir el factor VIIa e iniciar la cascada de coagulación (Fig. 3). Este efecto es transitorio con un pico en la expresión del TF entre las 4 y 6 h después del estímulo inicial con la citocina. Consecuentemente, la IL-1β y el TNF-α causan la pérdida de la expresión de trombomodulina y con ella la capacidad para catalizar la vía activada de proteína C (7).

La IL-1β y el TNF-α pueden regular otras vías para la hemostasis: 1) pueden influenciar la función de las plaquetas estimulando la síntesis de PGI_2 llevándolas por arriba de los niveles basales; 2) inducir la expresión del factor Von Willebrand, que funciona como ligando para la adhesión de plaquetas a la pared del vaso; 3) la célula endotelial puede iniciar la lísis de coágulos de fibrina catalizando la activación del plasminógeno a plasmina (la enzima fibrinolítica) y 4) el endotelio puede sintetizar activador tisular de plasminógeno (t-PA) tipo uroquinasa (u-PA) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) (8) (Fig. 3).

El segundo proceso endotelial regulado por la IL-1β y el TNF-α es la inflamación. Uno de los eventos tempranos de esta respuesta es el reclutamiento local y la activación de leucocitos circulantes en el sitio lesionado. El primer paso en el reclutamiento es la adhesión de leucocitos al endotelio de las vénulas postcapilares. Ambos tipos celulares, tanto los leucocitos como las células endoteliales, contribuyen al aumento en la adhesión.

En su estado basal, las células endoteliales no son adhesivas para leucocitos, sin embargo, cuando los macrófagos activados liberan citocinas, en particular la IL-1β y/o el TNF-α inducen que la membrana apical que ve hacia el lumen de los vasos, se vuelva adhesiva para neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos (9). Este aumento en la capacidad adhesiva de los leucocitos es transitorio, por ejemplo, para neutrófilos la adhesión máxima es entre las 4-6 h para después declinar.

Basado en diversos experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* se ha propuesto un modelo que explica el aumento en la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, el cual propone que la IL-1β y/o el TNF-α inducen un aumento en la expresión de moléculas receptoras sobre la membrana de las células endoteliales. Por su parte, los leucocitos expresan en sus membranas contrareceptores a estas moléculas de adhesión inducida por la IL-1β y/o el TNF-α. Algunas de las principales moléculas expresadas por las células endoteliales que participan en este proceso son las moléculas de adhesión intercelular: selectina-E (la cual participa en el "rolling" o adhesión suave), la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) (que participan en la adhesión firme previa a la transmigración de la monocapa endotelial) (Fig. 4). Además del aumento en adhesión, la IL-1β y el TNF-α promueven en la célula endotelial la producción de factores activadores de leucocitos como el factor activador de plaquetas e in-

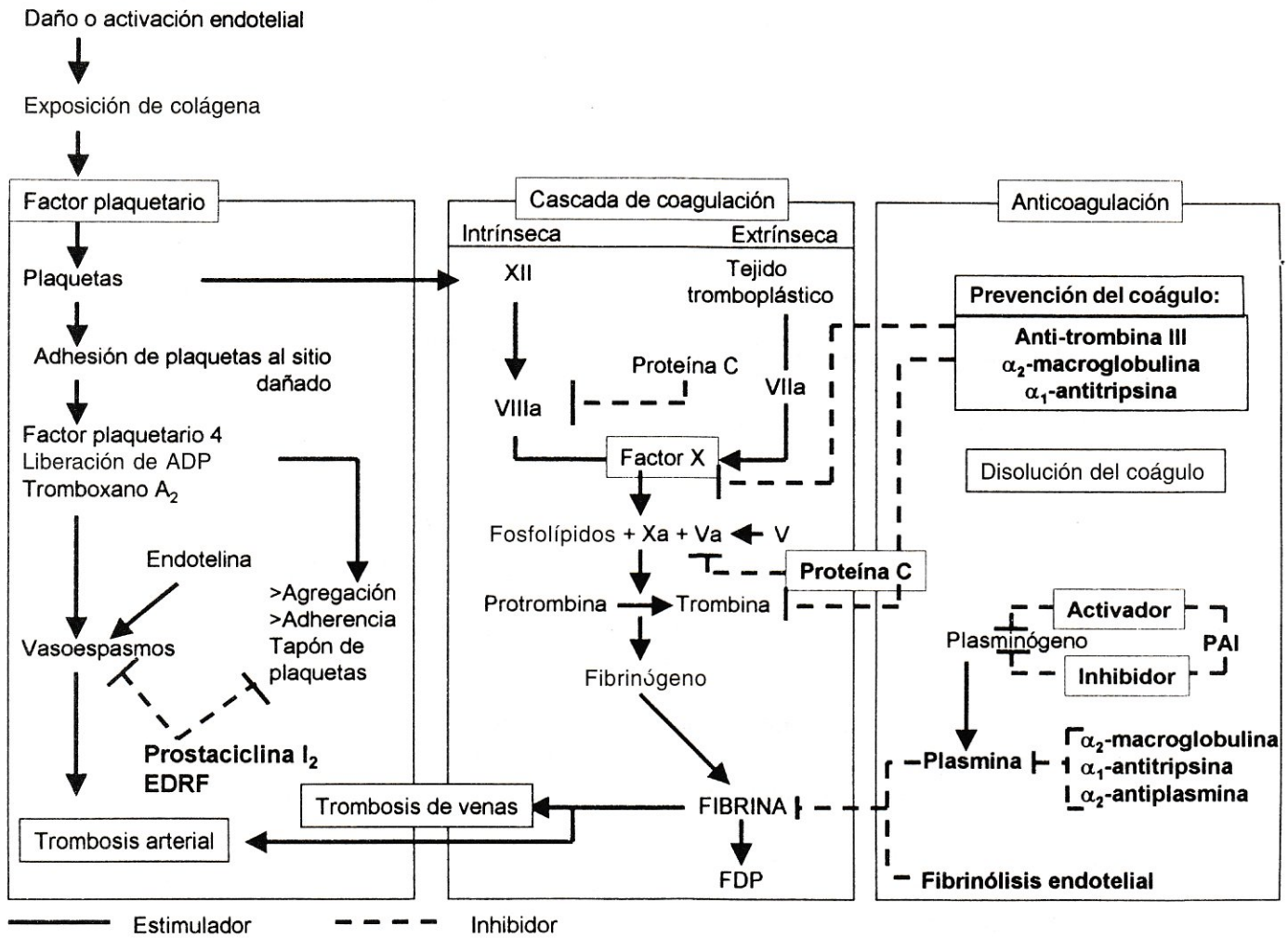


Figura 3. *Regulación de la hemostasis. Vías de coagulación y anticoagulación en las que participan las células endoteliales, participando así en la regulación de la hemostasis de los vasos sanguíneos.*

cluso de citocinas, como el mismo TNF-α o la IL-1β, el factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), y las interleucinas IL-6 (10) e IL-8. También se induce la síntesis de quimioatrayentes para leucocitos como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1).

Todos estos cambios en la expresión inducida por la activación con la IL-1β y el TNF-α van acompañados de cambios en la morfología de las células endoteliales debido a la pérdida de fibronectina en la lámina basal, a una rápida reorganización de la actina citoplásmica y a un cambio en las interacciones físicas entre las células endoteliales, que pasan de un endotelio adoquinado a un arreglo fibroblastoide que facilita la diapédesis de leucocitos. Estos cambios son graduales y están relacionados con una disminución en el volumen celular (11).

Dadas las similitudes entre la IL-1β y el TNF-α se ha querido analizar la relación que existe entre estas dos citocinas; habría que aclarar que el TNF-α y la IL-1β no compiten por los mismos receptores de membrana, de hecho el TNF-α no actúa por inducción de IL-1β, sino que cada una tiene su vía de transducción propia que media sus efectos sobre la célula endotelial. En algunos casos la IL-1β y el TNF-α funcionan como mediadores secundarios o amplificadores de las respuestas biológicas a endotoxinas derivadas de bacterias gram-negativas. Estas endotoxinas actúan directamente sobre la célula endotelial y muestra un espectro de actividad similar al presentado para la IL-1β o el TNF-α. Sin embargo, la endotoxina induce la expresión endotelial de IL-1-β, por lo que existen al menos tres grupos independientes de estímulos que actuan directamente con actividades biológicas sobrelapadas encima del endotelio: IL-1β, TNF-α y endotoxina (3).

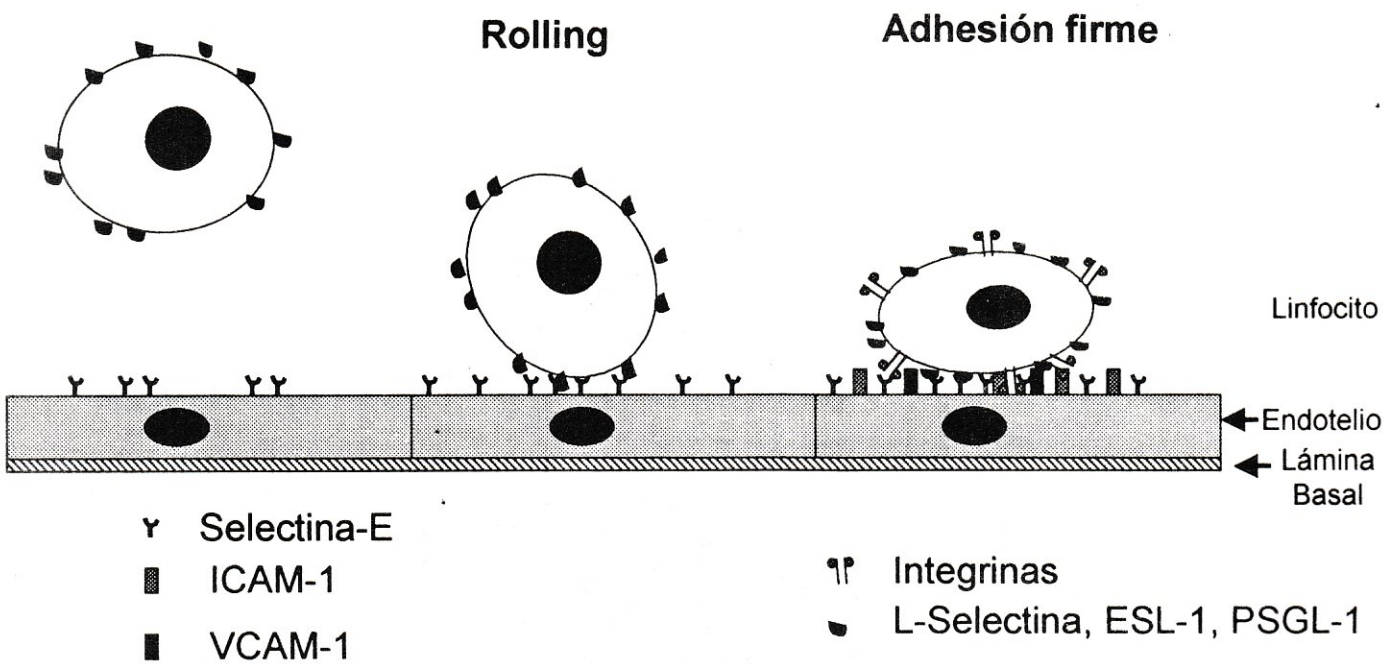


Figura 4. *Moléculas de adhesión endotelial. Moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales que participan en la adhesión y extravasación de leucocitos a los sitios de inflamación.*

Tanto el TNF-α como la IL-1β inhiben la proliferación endotelial (12) y promueven la migración de células de microvasculatura (13) en un modelo de angiogénesis *in vitro*.

En las células endoteliales se encuentran presentes la óxido nítrico sintasa (NOS) tipo II (inducible, isoforma dependiente de calcio) y la tipo III (constitutiva, isoforma específica de las células endoteliales) las cuales catalizan la conversión de arginina en citrulina y óxido nítrico (NO). Ambas enzimas producen una cantidad de NO que específicamente participa en la regulación del vasotono, la tipo III mantiene el control mientras las células se encuentran en el fenotipo constitutivo y la II durante procesos inflamatorios. Las citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β) aumentan la actividad de la NOS tipo II y por lo tanto la síntesis de NO. El NO producido por las células endoteliales funciona de una manera tanto autócrina como parácrina. Por ejemplo, la alteración en los niveles de NO en el endotelio tiene como primer blanco la misma célula endotelial ocasionando que ésta modifique sus propiedades biológicas. La inhibición de la producción basal de NO (NOS tipo II) por análogos competitivos de arginina aumenta la adhesión de leucocitos a la superficie de la célula endotelial. De hecho, el tratamiento de células endoteliales con donadores de NO disminuyen la expresión de VCAM-1, ICAM-1, selectina-E, IL-6, MCP-1, IL-8 y M-CSF que han sido inducidas por IL-1β, IL-4, TNF-α o LPS (14). Sin embargo, el NO no sólo tiene efectos intracelulares sino también participa como instrumento en la respuesta de las células endoteliales, por ejemplo: se ha demostrado que existe muerte de *Shcistosoma mansoni* dependiente de NO cuando las células endoteliales han sido activadas con IFN-γ, IL-1β o TNF-α. También se ha observado que aumenta la movilidad de células endoteliales, es angiogénico *in vivo* y durante el choque séptico el NO producido por las células endoteliales coopera en la patogénesis de la funcion contráctil del miocardio (14).

Existen diferencias entre los efectos mediados por el TNF-α y por la IL-1β, siendo el más importante que el TNF-α induce un aumento en la expresión de antígenos MHC clase I (15), acción que no presenta la IL-1β. Este efecto, que gradualmente alcanza un máximo entre los 4-6 días, es precedido por un aumento del ARNm de MHC. Este aumento puede ser bloqueado por inhibidores de la síntesis de proteínas sugiriendo la participación de una señal intermedia.

Otra gran diferencia es que el TNF-α activa a los neutrófilos mientras que la IL-1β no lo hace, por lo que el TNF-α puede producir adhesión de neutrófilos por acciones directas sobre el endotelio e indirectas al activar a los neutrófilos incrementando la adhesión (16).

Adicionalmente, el TNF-α induce la expresión del factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), que

funciona como quimioatrayente y como mitógeno para las células del estroma colaborando en la formación de nuevos vasos.

IFN-γ

El interferón-γ (IFN-γ) hasta el momento es la única citocina que se conoce que habilita a las células endoteliales para producir antígenos MHC clase II (13), cuya expresión le confiere a la célula endotelial la capacidad de presentar antígenos a las células T $CD4^+$.

El interferón-γ inhibe la proliferación endotelial y produce cambio morfológicos similares a los que se observan con el TNF-α o con la IL-1β. También induce selectivamente la adhesión de linfocitos sin aumentar la adhesión de otras poblaciones de leucocitos. Sin embargo, el tratamiento con IFN-γ no afecta las funciones endoteliales de coagulación ni tampoco las de la inflamación severa.

Otra característica importante del IFN-γ es su capacidad de modular los efectos inducidos por el TNF-α. Las interacciones de las distintas formas de IFN con TNF-α son de interés biológico y clínico, ya que normalmente son producidas de una manera coordinada en las células T activadas. En células en-doteliales, el interferón actúa sinérgicamente con el TNF-α para alterar la morfología epitelioide promoviendo una apariencia fibroblastoide. El sinergismo también se manifiesta en la inducción de la expresión de ICAM-1 y del antígeno MHC clase I (17).

IL-6

Algunos estímulos inducen la producción de grandes cantidades de IL-6 en células endoteliales, entre estos se encuentran: la IL-1β, el TNF-α, la IL-4, la IL-3, la oncostatina M, la IL-17, agentes infecciosos y sus productos, así como la hipoxia.

Estudios hechos con cultivos primarios de células endoteliales humanas (HUVECs) concluyen que ésta citocina no afecta las funciones del endotelio; sin embargo, existen indicios de que esta citocina participa en la angiogénesis y la vascularización de tumores (2).

IL-10

La IL-10 es un estímulo débil para la expresión de quimiocinas o de IL-6 en células endoteliales inmortalizadas, sin embargo, el tratamiento con IL-10 amplifica la acción de la IL-1β y del TNF-α.

Se ha reportado que la IL-10 inhibe la presentación de antígeno por células endoteliales derivadas de la microvasculatura dérmica, mientras que en células endoteliales derivadas de la vena umbilical induce la síntesis de tetrahidrobiopterina (18), un cofactor en la síntesis de óxido nítrico. En células endoteliales irradiadas con UV, la IL-10 induce muerte por apoptosis, misma que es amplificada por lipopolisacárido (LPS). La IL-10 también amplifica la inducción de moléculas de adhesión promovida por IL-1α (19).

IL-4

La IL-4 es un factor de crecimiento y diferenciación de leucocitos al que recientemente se le ha reconocido como un modulador de células endoteliales. Esta citocina induce la expresión del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) en células de la microvasculatura, pero no en la macrovasculatura. La IL-4 tiene efectos antagónicos ligados a la capacidad adhesiva del endotelio; si bien induce selectivamente la expresión de VCAM-1, por otra parte inhibe la expresión de ICAM-1 y de selectina E. Sin embargo, a pesar de que la adhesión de leucocitos requiere normalmente de las tres moléculas (VCAM-1, ICAM-1 y selectina-E) la exposición de células endoteliales a IL-4 resulta en un aumento en la unión de linfocitos pero no de neutrófilos.

Finalmente, la IL-4 es un inductor débil de IL-6 y MCP-1 y amplifica la producción de estos mediadores junto con otros estímulos (2).

Factor de crecimiento transformante-β (TGF-β)

La principal acción biológica del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) es la inhibición de la proliferación de las células endoteliales. A pesar de su efecto antiproliferativo, se ha demostrado que el TGF-β tiene un efecto angiogénico *in vivo*, sin embargo, no se sabe si este efecto es directo o vía otros tipos celulares como los macrófagos (20).

CONCLUSIONES

En esta revisión se resumieron las funciones endoteliales mediadas por citocinas, la mayoría de las cuales se conocen como el proceso de activación endotelial. Las células endoteliales, mucho tiempo consideradas como una capa celular pasiva, tienen un papel activo en el encendido y regulación tanto de la reacción inmune como en la reacción inflamatoria. La variedad de respuestas presentadas por las células endoteliales por efecto de las citocinas es una demostración dramática de la plasticidad de las células endoteliales. Estudios recientes como los mencionados durante la revisión demuestran que apenas se comienza el estudio de las bases moleculares de la activación endotelial por citocinas al tratar de identificar los factores de transcripción y los elementos regulatorios que están involucrados en la

inducción o en la inhibición de la expresión de genes. Sin embargo, el punto central a cerca de la especificidad de la respuesta del endotelio a expresar ciertos genes aún se desconoce.

Otro punto del cual aún se desconoce es la heterogenidad de las células endoteliales. El endotelio vascular es muy heterogeneo en términos de morfología, expresión de marcadores y función. La heterogeneidad es evidente en multiples niveles y surge del análisis al comparar endotelio de venas de alto calibre con venas de bajo calibre, al comparar el lecho vascular de distintos organos y al comparar células endoteliales del mismo órgano. Esta heterogeneidad incluye la respuesta a citocinas así como también la producción de las mismas. La fenomenología de la heterogeneidad de las células endoteliales es compleja, sus bases moleculares y la base conceptual que la describa no ha podido ser establecida.

La producción y acción de las citocinas a nivel de las células endoteliales es un determinante importante en una gran variedad de patologías humanas. La producción de moléculas por las células endoteliales y su liberación a la circulación necesita ser evaluada cuidadosamente en estudios clínicos que se diseñan actualmente. La identificación de la expresión selectiva en distintos lechos vasculares proveen de blancos moleculares para la terapia y el diagnóstico de diversas patologías, lo cual, junto con el reconocimiento del importante papel de las células endoteliales en diversos desórdenes humanos proveen un marco conceptual para la investigación de nuevas herramientas de diagnóstico y para el desarrollo de nuevas estrategias terapeúticas.

REFERENCIAS

1. Risau W (1995) Differentitation of endothelium. FASEB J *9*: 926-933.
2. Mantovani A, Sozzani S e Introna M (1997) Endothelial activation by cytokines. Ann NY Acad Sci *832*: 93-116.
3. Pober J S y Cotran R S (1990) Cytokines and Endothelial cell biology. Phys Rev *70*: 427-451.
4. Folkman J (1987) Angiogenesis: initiation and control. Ann NY Acad Sci USA *401*: 212-215.
5. Cotran R S y Pober J S (1988) Endothelial activation. Its role in inflammatory and immune reactions. En: Endothelial Cell Biology, Simionescu y Simionescu Eds. Kluwer Acad/Plenum Pub Netherlands. pp. 325-346.
6. Esmon C T y Owen W G (1988) Identification of an endothelial cofactor for trombin-catalyzed activation of protein C. Proc Natl Acad Sci USA *78*: 2249-2252.
7. Nawroth P P y Stern D M (1986) Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med *163*: 740-745.
8. Podor T J, Curriden S A y Loskutoff D J (1988) The fibrinolytic system of endothelial cells. En Endothelial cells. Editor: U. S. Ryan. Boca Raton, Fl. CRC, pp 127-148.
9. Bochner B S, Peahcell P T, Brown K E y Schleimer R P (1988) Adherence of human basophils to cultures umbilical vein endothelial cells. J Clin Invest *81*: 1355-1364.
10. Jirik F R, Podor T J, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff D J, Carson D A y Lotz M (1989) Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. J Immunol *142*: 144-147.
11. Stolpen A H, Golan D E y Pober J S (1988) Tumor necrosis factor and immune interferon act in concert to slow the lateral diffusion of proteins and lipids in human endothelial cell membranes. J Cell Biol *107*: 781-789.
12. Lopez-Marure R, Estrada B A y Zentella A (1997) Interference with *c*-myc expression and RB phosphorylation during TNF-mediated growth arrest in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Comm *236*: 819-824.
13. Leibovich S J, Polverini PJ, Shepard H M, Wiseman D M, Shively V y Nuseir N (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor-α. Nature *329*: 630-632.
14. De Caterina R, Libby P y Peng H B (1995) Nitric Oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J Clin Invest *96*: 60-68.
15. Collins T, Korman J A, Wake C T, Boss J M, Kappes D J, Fiers W, Ault K A, Gimbrones M A, Strominger J L y Pober J S (1988) Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA *81*: 4917-4921.

16. Gamble J R, Harlan J M, Klebanoff S J y Vadas M A (1985) Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci *82*: 8667-8671.

17. Lapierre L A, Fiers W y Pober J S (1988) Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression: interactions with immune (γ) interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leukocyte (α) and fibroblast (β) interferons. J Exp Med *167*: 794-804.

18. Schoedon G, Schneemann M, Blau N, Edgell C J y Schaffner A (1993) Modulation of human endothelial cell tetrahydrobiopterin synthesis by activating and deactivatin cytokines: new perspectives on endothelium-derived relaxing factor. Biochem Biophys Res Commun *196*: 1343-1348.

19. Krakauer T (1995) IL-10 inhibits the adhesion of leukocytic cells to IL-1-activated human endothelial cells. Immunol Lett *45*: 61-65.

20. Jennings J C, Mohan S, Linkhart T A, Widstrom R y Baylink D J (1988) Comparison of the biological actions of TGFγ-1 and TGFγ-2:differential activity in endothelial cells. J Cell Physiol *137*: 167-172.

REB 21(1): 50-57

Telómeros y Telomerasa ¿Llaves de la Inmortalidad Celular*

Mina Konigsberg Fainstein[1]

RESUMEN

Los telómeros son la parte terminal de los cromosomas cuyo ADN contiene una secuencia rica en guaninas que se encuentra altamente conservada. Su función es la de estabilizar el genoma eucariótico evitando que los cromosomas se fusionen o recombinen, y al parecer regula el número de duplicaciones que puede tener una célula. Esto ha llevado a proponer que el acortamiento de los telómeros determina que se detenga el crecimiento celular y comience la senescencia. Para prevenir esto último, existe una enzima denominada telomerasa, que se encarga de regenerar a los telómeros y mantenerlos intactos en las células germinales; además, se ha observado que las células inmortalizadas, ya sea mediante la acción de agentes virales o la activación de oncogenes, contienen una alta concentración de telomerasa y no presentan acortamiento de sus telómeros. De ahí el interés que ha surgido sobre el estudio de los telómeros y su posible relación con el envejecimiento celular y el cáncer.

PALABRAS CLAVE: Telómeros, telomerasa, senescencia celular, ciclo celular, envejecimiento.

ABSTRACT

Telomeres are the terminal part of the chromosomes, they are composed of a highly conserved guanine-rich sequence repeats. The function of telomeres is to stabilize the eukaryotic genome avoiding chromosomal fusion or recombination. They seem to regulate the cellular population doublings. This has lead to propose that the shortening of the telomeres conveys to cellular arrest and cellular senescence. Telomerase is an enzyme that regenerates the telomeres and maintains them intact in germinal cells; besides, it has been shown that immortalized cells have a high concentration of telomerase and they do not shorten their telomeres. That is why a great interest has raised in studying telomeres and their relationship with cellular aging and cancer.

KEY WORDS: Telomeres, telomerase, cellular senescence, cell cycle, aging.

INTRODUCCIÓN

El interés por el estudio de los telómeros se inicia hace aproximadamente 50 años con trabajos que los genetistas Herman Muller (1) y Bárbara McClintock (2) desarrollaron en los cromosomas de la mosca de la fruta (*Drosophila)* y la planta del maíz respectivamente. Sus estudios muestran que cuando se pierden los extremos de los cromosomas, estos tienden a unirse y forman agregados inestables, mientras que los cromosomas que mantienen sus extremos íntegros no se fusionan. Esta observación los llevó a concluir que la parte terminal de los cromosomas tiene la función específica de mantener su estabilidad estructural y evita las fusiones entre ellos, por lo que llamaron telómero (del griego *telos*- final) a la sección terminal del cromosoma. Años después, Blackburn (3) trabajando con el protozoario ciliado *Tetrahymena thermophila,* demostró que los telómeros están formados por secuencias repetidas ricas en guaninas. Gracias a las técnicas de biología molecular, ahora se sabe que el ADN telomérico está formado por secuencias repetidas altamente conservadas, que en vertebrados consisten en la secuencia TTAGGG. El número de copias de esta secuencia varía dependiendo de la especie. En

*Recibido: 13 de febrero de 2001. Aceptado: 25 de septiembre de 2001.

[1]Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, C. P. 09340, México, D. F. Tel. 5804-4732. Fax 5804-4727. Correo E: mkf@xanum.uam.mx

humanos es alrededor de 3-15 kilopares de bases (kpb) mientras que en ratones es de 30 a 100 kpb (4).

Estudios recientes de microscopía electrónica han demostrado que los telómeros no tienen una estructura lineal sino que terminan en una especie de asa que se conoce como "t-loop" (6), que se forman por la inserción del saliente 3' del ADN telomérico dentro de la parte de doble cadena del telómero (Fig.1).

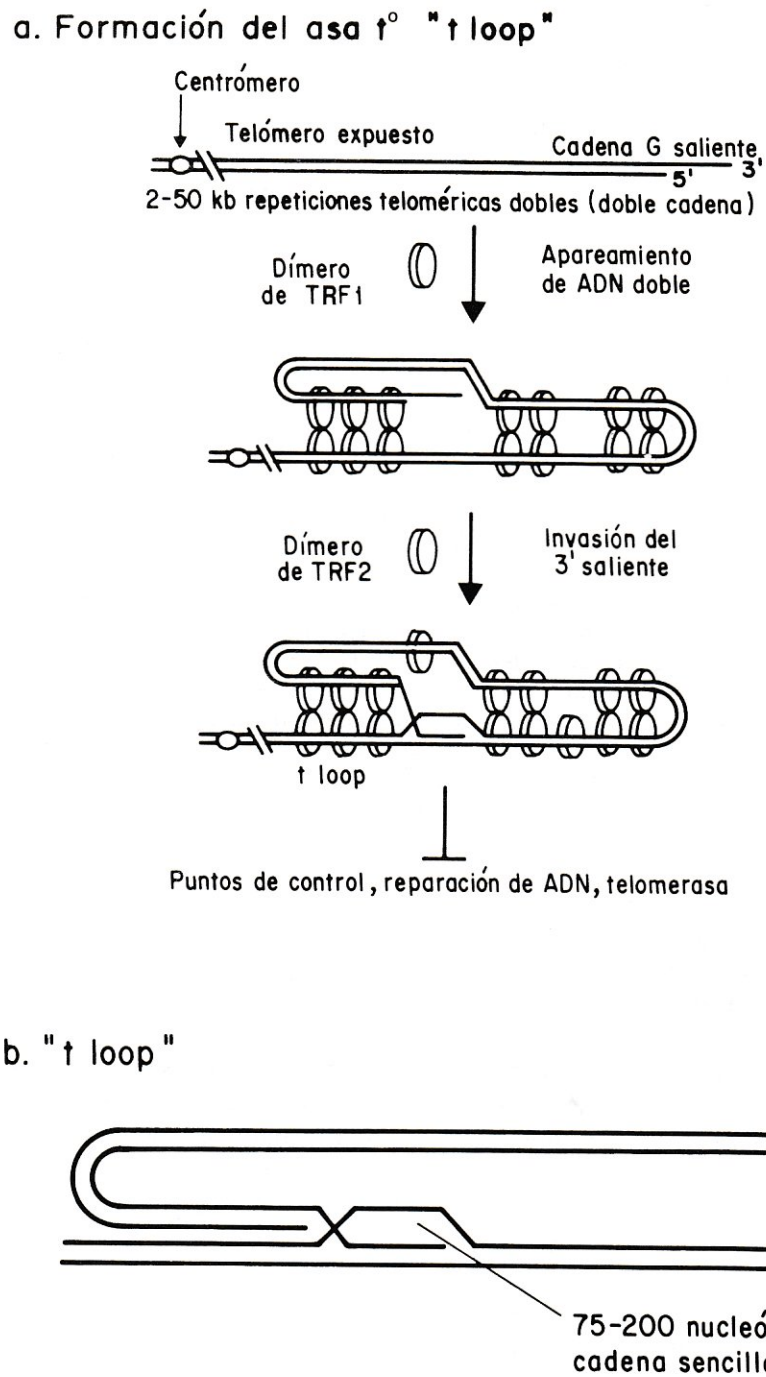


Figura 1. *Asa t o "t loop". a) Formación del asa t o "t loop". Esquema especulativo de una posible formación de la "t loop" basada en las actividades bioquímicas* in vitro *de TRF1 y TRF2. b) "t loop". La estructura del ADN en la parte terminal de los cromosomas de mamíferos forman una invaginación o asa llamada "t loop".*

Se ha sugerido que este arreglo es básico para la protección y la duplicación de los telómeros y por ende la integridad de los extremos de los cromosomas. Para estabilizar y regular la estructura funcional del telómero, se han descrito una serie de proteínas que están asociadas al ADN telomérico formando un complejo, a las que se conoce como proteínas teloméricas y de las que se hablará más adelante (5).

FUNCIONES DEL TELÓMERO Y EL PROBLEMA DE LA DUPLICACIÓN DE LOS EXTREMOS DE LOS CROMOSOMAS

Al telómero se le han adjudicado por lo menos tres funciones primordiales. La primera, como ya se mencionó antes, es la de mantener la estabilidad del genoma eucariótico al proteger la parte terminal de los cromosomas para que no se fusionen entre ellos, no se recombinen y evitar su degradación. En segundo lugar, los telómeros funcionan como una especie de anclaje de los cromosomas, ya que los posicionan y los mueven durante varias etapas del ciclo celular tanto mitótico como meiótico. Por último, se ha les ha conferido una función reguladora, ya que se propone que determina el número de replicaciones que puede tener una célula a lo largo su vida.

En los años 70's Olovnikov (7) planteó el problema *"de la duplicación celular en los extremos o de la duplicación terminal"*, que se refiere a lo siguiente: la enzima ADN polimerasa es una proteína unidireccional que copia la secuencia del ADN siempre y cuando pueda posarse primero sobre una secuencia modelo del ADN. Sin embargo, en los cromosomas lineales, no se pueden copiar las bases del extremo 3' puesto que la polimerasa está posada sobre el extremo del ADN del

borde del cromosoma por lo que no existe un templado para iniciar el proceso. Para tratar de explicar lo anterior, el lector puede imaginar a una persona pintando un cuarto totalmente cerrado; cuando ésta haya terminado de pintarlo, sólo le quedará el pedazo de suelo en el que se encuentra parado, impidiéndole continuar. Para resolver el problema, la solución encontrada por la célula fue la de eliminar el último fragmento del cromosoma. De esta manera, cada vez que la célula se replica pierde un segmento de ADN telómerico.

A primera vista parece que una solución tan radical como eliminar un segmento de cromosoma en cada ciclo de replicación, más que beneficiar a la célula, a la larga terminaría por alterar la información genética. Sin embargo, la parte del cromosoma que se elimina siempre corresponde al telómero y nunca abarca la parte del cromosoma que tiene información vital para la célula.

Se ha establecido (8) que la mayoría de las células somáticas se dividen de manera finita. Se ha denominado senescencia celular o senescencia replicativa al proceso que limita la capacidad de división celular. Este fenómeno fue descrito por Hayflick hace más de 30 años en cultivos primarios de fibroblastos humanos, de ahí que el límite de Hayflick o etapa 1 de mortalidad (M1), se refiera al momento en el que las células dejan de dividirse e inician su etapa de senescencia (Fig. 2). Desde entonces se han estudiado muchos tipos celulares de diferentes especies de animales y se ha determinado el límite replicativo en cada caso. Asimismo, se ha reportado que *in vivo* el fenómeno de senescencia replicativa se lleva a cabo de una manera similar a la que se describió para cultivos primarios, por lo que en un tejido *in vivo* pueden

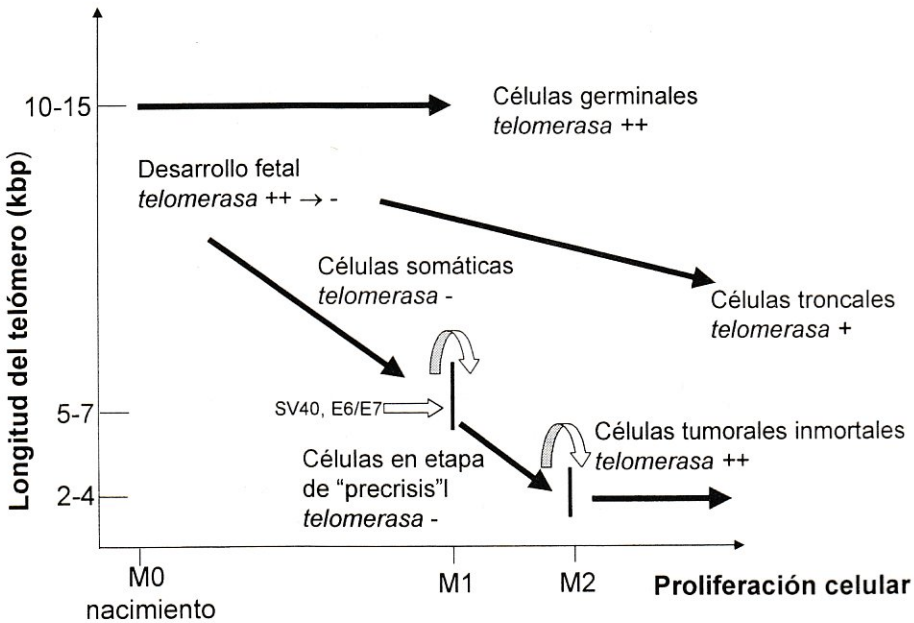


Figura 2. *Representación esquemática de los eventos ocurridos en el crecimiento celular* in vitro. *La figura muestra la relación que existe entre la longitud de los telómeros, la actividad de la telomerasa y la proliferación de las células en cultivo. Las células con una actividad positiva (+) de la telomerasa mantienen sus telómeros estables y por lo tanto siguen proliferando en el cultivo. Las células cuya actividad de la enzima se encuentra disminuida (–) tienden a acortar sus telómeros hasta llegar al límite M1 donde detienen su duplicación. Las células que logran pasar de M1 continúan con su proliferación pero son susceptibles a un bloqueo final hacia la inmortalidad después de un número finito de duplicaciones, a este punto se le conoce como etapa de crisis M2. Estos sitios de regulación proliferativa ("checkpoints") llamados M1 y M2, pueden ser superados por la acción de diversos oncogenes virales (SV40, E6/E7) que hacen que las células continúen con su proliferación. En algunos casos las células logran superar la crisis de M2, vuelven a activar a la telomerasa (++) y se convierten en inmortales.*

convivir células con senescencia y pre-senescencia al mismo tiempo.

La senescencia replicativa es particularmente determinante en células humanas ya que, en contraste con algunas especies de roedores, las células humanas rara vez se inmortalizan de manera espontánea, es decir, pocas veces fallan que presenten senescencia.

Con respecto al fenotipo que presentan las células con senescencia, puede decirse que estas células son viables, metabólicamente activas e incluso responden a señales del medio ambiente. Es importante aclarar que la senescencia replicativa no es muerte celular programada o apoptosis, de hecho, las células senescentes son más resistentes a la muerte apoptótica que las presenescentes. Existen otras dos características que distinguen a las células senescentes. Una de ellas es que dichas células son incapaces de proliferar en respuesta a mitógenos fisiológicos; la otra es que las células senescentes presentan cambios específicos en sus funciones metabólicas (9).

Pero, ¿qué es lo que le indica a una célula el momento en que debe entrar en senescencia? La respuesta exacta a esta pregunta aún no se sabe, sin embargo se ha propuesto que el acortamiento de los telómeros conlleve a la activación de múlti-

ples y diversos mecanismos de señales. Algunas de las hipótesis que se han planteado para explicarlo son las siguientes:

a. Un telómero corto puede desencadenar una señal que sea interpretada por la célula como daño al ADN

Esta hipótesis sugiere que un telómero críticamente corto pueda inducir a la célula a detener su ciclo celular para entrar en un estado de revisión de daño al ADN ("checkpoint"). Una vez detenido el ciclo celular, la célula sería incapaz de reparar el daño y reiniciar el ciclo por lo que entraría en senescencia. Se ha reportado que en levadura, la eliminación de un telómero causa detención del ciclo celular vía una respuesta de daño al ADN (Fig. 3a). Un problema de esta hipótesis es que la detención en la proliferación en levadura es transitoria, mientras que la detención en la proliferación en las células con senescencia de mamífero es irreversible. Además, los niveles de la proteína p53 (que se relaciona con la respuesta al daño al ADN en mamíferos), no siempre se encuentran aumentados en células con senescencia.

b. Los telómeros mantienen secuestrados algunos factores de transcripción que modulan la expresión de ciertos genes

Se propone que conforme los telómeros se acortan, ciertos factores de transcripción que están unidos a él, se liberen y sean capaces de unirse a sitios intragenómicos donde puedan actuar reprimiendo o activando genes que regulen la progresión del ciclo celular y el mantenimiento de las funciones diferenciadas (Fig. 3b). Un mecanismo similar se ha reportado en levaduras donde algunas proteínas asociadas al telómero (Rap 1 o Sir 2, por ejemplo) pueden secuestrar ciertos factores de transcripción que, cuando no están secuestrados, actúan inhibiendo genes en sitios no-teloméricos del ADN. A este fenómeno particular se le llama silenciamiento, ya que cuando estos factores se unen a sus secuencias genómicas correspondientes, las apagan o silencian. La hipótesis anterior resulta atractiva para explicar la complejidad del fenotipo que ocasiona senescencia, sin embargo no existen hasta el momento datos moleculares en células de mamífero que sustenten esta idea.

c. La estructura heterocromática del ADN cerca del telómero mantiene reprimidos genes regulatorios

Una estructura heterocromática específica y particular en estos sitios, podría reprimir genes involucrados con la detención del ciclo celular o la alteración de algunas funciones diferenciadas, el acortamiento de los telómeros modificaría la este tipo de estructura de la heterocromatina, liberando a los genes de la represión (Fig. 3c). Este fenómeno también se ha observado en las levaduras y se conoce como efecto de posición del telómero (TEP). Sin embargo, poco es lo que se sabe sobre la identidad de los genes sensibles al acortamiento de los telómeros ("telomere shortening-sensitive genes", TSSG) y no hay mucha evidencia a este respecto en mamíferos (9, 10).

Por otro lado, y de manera muy interesante, se ha reportado que los cromosomas con telómeros de una longitud normal pero que ca-

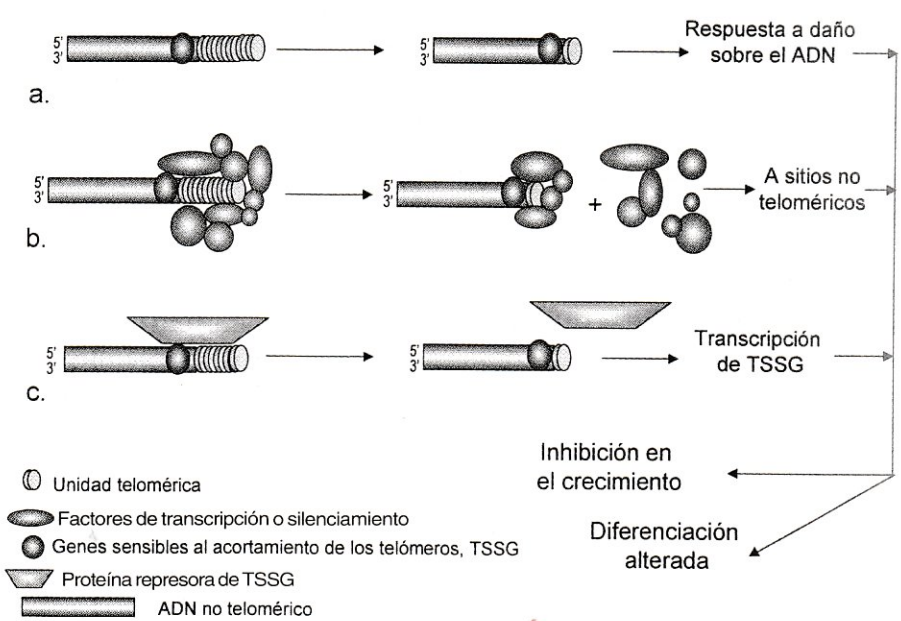


Figura 3. *El acortamiento de los telómeros como señal inductora del fenotipo senescente. a) Un telómero corto puede interpretarse como un rompimiento o daño al ADN y desencadenar una respuesta de reparación como daño genómico. b) Los telómeros mantienen secuestradas o almacenadas proteínas cuya función es activar o reprimir la expresión de genes involucrados con la continuidad del ciclo celular y de las funciones relacionadas con su diferenciación. c) Cuando los telómeros están íntegros, los genes que se ubican cerca de los ellos (TSSG) se encuentran en un estado silenciado o reprimido por la estructura que presenta la heterocromatina. Al acortarse los telómeros, la estructura de la heterocromatina cambia y los genes pueden ser activados.*

recen de algunas de las proteínas teloméricas (TRF1 y TRF2) son incapaces de formar la estructura de asa ("t-loop") por lo que se fusionan unos con otros y entran en senescencia de manera precoz. Lo anterior ha llevado a pensar a ciertos investigadores, que la longitud del telómero por si misma, no es lo único que determina la detención del ciclo celular. La presencia de la estructura "t-loop" y su modificación o desaparición resultado del acortamiento de los telómeros, son factores importantes dentro del fenómeno, explicado por cualquiera de las hipótesis anteriores. La pérdida de la estructura de asa podría ser registrado por la célula como una señal de daño al ADN. Por otro lado, esa misma carencia en la estructura podría liberar los factores de transcripción unidos a las proteínas teloméricas o modificar la estructura de la cromatina desinhibiendo a los TSSG.

REGULACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS

Se supone que a lo largo del artículo el lector se ha preguntado si cada vez que las células se dividen se acortan los telómeros, ¿cómo es que inicialmente las células parten de telómeros largos o enteros? Esto nos remonta a la etapa de fecundación, en la cual los óvulos y los espermatozoides deben poseer telómeros enteros, pues el óvulo fecundado, es decir el cigoto, es la primera célula de un nuevo ser de la cual partirán todas las demás células y necesita, por lo tanto, tener también sus telómeros íntegros.

Hasta el momento, se conocen tan sólo tres tipos celulares que no presentan senescencia, es decir, que no acortan sus telómeros y por lo tanto tienen una vida replicativa inmortal. En primer lugar se encuentran precisamente las células germinales, que mantienen largos sus telómeros de manera indefinida; en segundo lugar están las células tumorales; y por último se encuentran algunas células troncales ("stem cells") que se ha considerado tienen la capacidad de dividirse indefinidamente.

Pero, ¿cómo mantienen largos sus telómeros? Para regenerar o estabilizar los telómeros, se han descrito tres formas diferentes dependiendo del tipo de organismo del que se trate y de las circunstancias particulares según las necesidades de la célula (10). El primer caso se ha descrito en levaduras, en donde la extensión de los telómeros puede ocurrir por recombinación homóloga del ADN telomérico no recíproco entre telómeros de cromosomas homólogos o heterólogos. Otro caso es el de *Drosophila melanogaster*, en el cual el ADN telomérico se alarga por la transposición de retrotransposones específicos (HeT-A y TART) al final de cada uno de los cromosomas. Los estudios realizados en los cromosomas humanos, muestran que el alargamiento de los telómeros está dado por la síntesis de nuevo ADN en los extremos de los cromosomas gracias a la acción de la enzima telomerasa de la cual se hablará más adelante. Cabe mencionar que evolutivamente, el mecanismo más conservado para mantener a los telómeros es por medio de la telomerasa.

Lo anterior deja entrever que la longitud de los telómeros durante el desarrollo de un organismo eucariote está dada por un equilibrio muy sutil y dinámico entre el acortamiento del telómero, dado por el número de duplicaciones celulares, y su regeneración por medio de la telomerasa. Una acortamiento excesivo de los telómeros podría llevar a una senescencia prematura, mientras que una actividad desmesurada de la telomerasa dará como resultado una serie ininterrumpida de divisiones celulares que podrían llevar a la célula a la inmortalización. Recordemos que las células en cultivo tiene una capacidad replicativa limitada; sin embargo, si estas células son transformadas por algún oncogene como SV40 T-Ag o HPV E6/E7, pueden continuar su crecimiento hasta llegar a una segunda etapa de bloqueo en la proliferación llamada M2 o crisis (Fig. 2). Las células que logran sobrevivir a la etapa de crisis son susceptibles de inmortalizarse, este evento se observa en las células cancerosas. Esta etapa se caracteriza por una pérdida en la regulación del ciclo celular, en donde se presenta inestabilidad genómica, se pueden formar tumores metastásicos *in vivo* y típicamente la longitud de los telómeros se mantiene estable (12). Al llegar a este período, muchos de estos telómeros han llegado a la etapa de telómeros cortos, y la telomerasa evita un acortamiento mayor. Todavía no queda claro si la telomerasa es capaz de alargar los telómeros una vez que ya están estabilizados a una longitud particular.

TELOMERASA Y MANTENIMIENTO DE LOS TELÓMEROS

La actividad enzimática de la telomerasa es la de una enzima transcriptasa reversa poco común, puesto que contiene su propio templado de ARN y se encuentra unida a varias proteínas, algunas de las cuales ya han sido caracterizadas. La fracción de ARN es esencial para la función enzimática y se le

ha denominado TER o TR (telomerasa RNA). El gen para TER se ha clonado para más de 20 especies de protozoarios ciliados, para las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, para ratones y para humanos (13). Todos estos ARNs contienen la secuencia complementaria para aproximadamente 1.5 repeticiones del ADN telomérico y actúan como templado para el alargamiento de los telómeros. El ARN de la telomerasa humana (hTER) tiene 445 nucleótidos de los cuales 11 funcionan como templado con la secuencia (5'CUAACCCUAAC-3')(11).

Además de la subunidad del templado TER, el sitio activo de la telomerasa contiene a la subunidad TERT que es precisamente la transcriptasa reversa, y en humanos se denomina hTERT ("human telomerase reverse transcriptase") (Figs. 4 y 5). Sin embargo, los experimentos de reconstitución de la telomerasa han evidenciado que la actividad de la enzima depende, además de lo anterior, de la presencia de dos proteínas chaperonas, que aparentemente son esenciales para el ensamble de la enzima *in vivo*, aunque su papel en la función catalítica es aún controvertido. Una gran parte del trabajo con telómeros se ha realizado en *Tetrahymena thermophila*, por lo que las primeras proteínas asociadas al telómero que se describieron fueron las proteínas p80 y p95 de este organismo. En mamíferos se ha descrito a la proteína relacionada con p80 llamada TEP1 y en levadura las proteínas Est 1p y Est 3p (13).

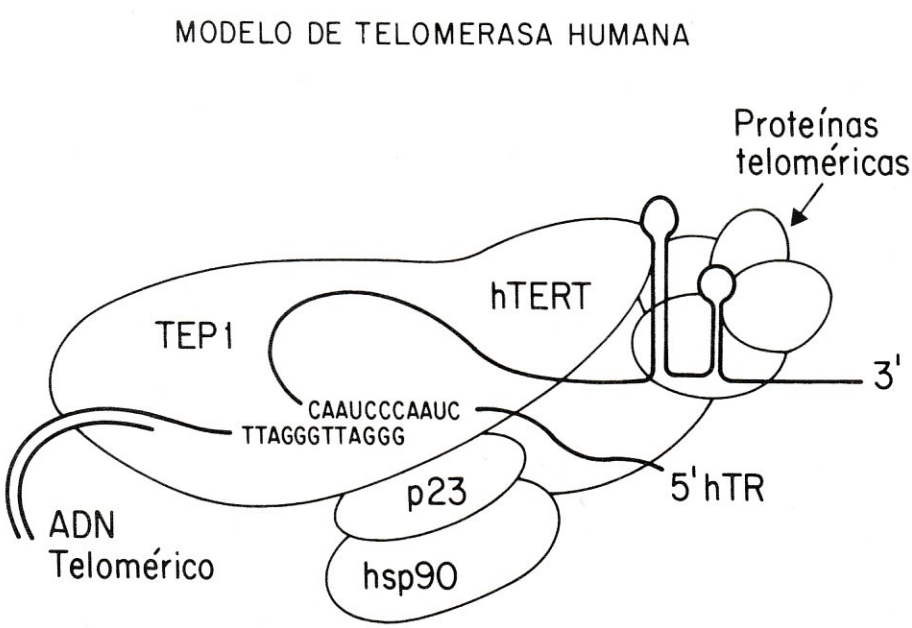


Figura 4. *Telomerasa de mamífero. Se muestra una representación del centro catalítico altamente conservado de la telomerasa y las proteínas accesorias específicas de mamífero. La enzima contiene su propio templado de ARN que posee la secuencia complementaria para aproximadamente 1.5 repeticiones de ADN telomérico (TR). Se encuentra representado un fragmento del templado para humanos denominado hTR. La subunidad hTERT es la transcriptasa reversa en humanos y es la que se encarga de retrotranscribir el ADN telomérico a partir de hTR. TEP 1 es la proteína 1 asociada a la telomerasa y se une a cadenas sencillas de ADN, mientras que p23 y hsp90 son proteínas accesorias del complejo enzimático.*

Se ha sugerido que las proteínas teloméricas TRF1 y TRF2 (así como su análogo en levadura Rap 1), actúan como represores de la telomerasa, puesto que su sobreexpresión en una línea celular inmortalizada causó el acortamiento gradual de los telómeros. TRF1 y TRF2 promueven la asociación de dos cadenas de ADN, lo cual contribuye a estabilizar la estructura telomérica de "t-loop", impidiendo el acceso de la telomerasa al telómero.

La identificación de otra proteína llamada tankirasa ha favorecido el conocimiento de la modulación de la actividad de la telomerasa. La tankirasa tiene la capacidad de auto-ribosilarse y a la proteína TRF1 *in vitro*. Esta actividad inhibe la unión de TRF1 al ADN telomérico. Por esto, se sugiere que la tankirasa podría remover a TRF1 *in vivo* y permitir el acceso de la telomerasa al telómero (13).

Por otro lado, experimentos recientes con *S. cerevisiae* han demostrado la conexión entre el mantenimiento del telómero y las proteínas involucradas en la reparación del ADN. Un ejemplo de ellos es el de una proteína muy conservada en la evolución llamada Ku que se requiere para la reparación de cadenas dobles de ADN. Ku es en realidad un heterodímero de dos proteínas: Ku 70 y Ku 86, que son necesarias la función de unir segmentos finales no homólogos ("non-homologous end joining", NHE). Se ha demostrado que las levaduras que carecen alguna de estas subunidades, pierden 60% de sus repeticiones teloméricas, así como su capacidad silenciadora. Asimismo se sabe que la inducción de daño al ADN promueve la movilidad del heterodímero Ku en levadura desde su posición en los

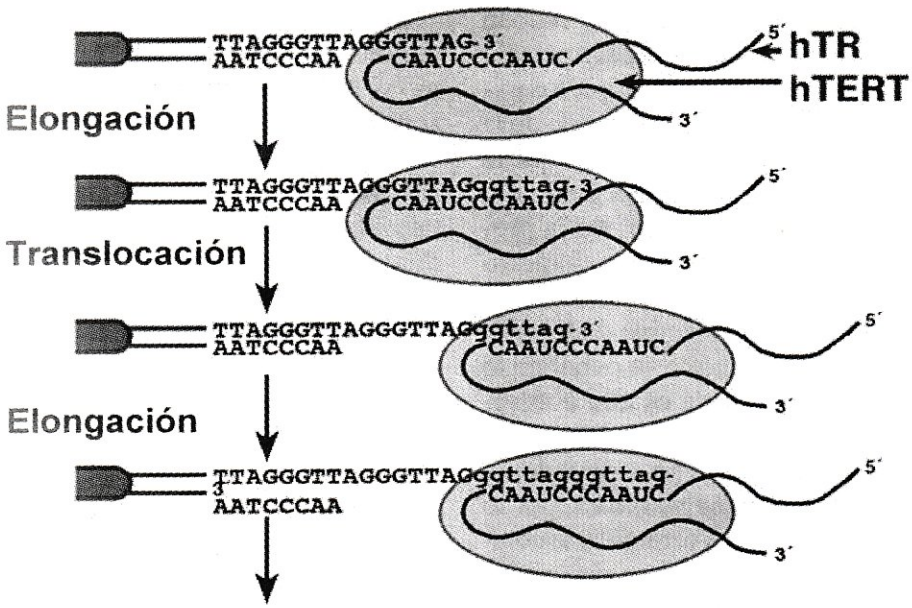


Figura 5. *Mantenimiento de los telómeros. La enzima telomerasa es un transcriptasa reversa que alarga y mantiene a los telómeros. Posee su propio templado para sintetizar el ADN telomérico. En el caso de la telomerasa humana (hTER), el segmento de ARN contiene 445 nucleótidos de los cuales 11 funcionan como templado con la secuencia (5'-CUAACCCUAAC-3'). Asimismo, en el sitio activo de la telomerasa se encuentra la subunidad TERT que es precisamente la transcriptasa reversa. En humanos se denomina hTERT (human telomerase reverse transcriptase) y es la que se encarga de alargar el telómero.*

telómeros hacia los sitios donde hay rompimientos de cadena doble, sugiriendo una relación entre la reparación del ADN y las proteínas teloméricas. En mamíferos también se ha reportado que la proteína Ku se asocia a las secuencias teloméricas y se ha sugerido que en este caso su función sea la de proteger al telómero tanto de la degradación nucleotídica como de la recombinación (14). Lo interesante es que al parecer Ku está involucrada en el mantenimiento de la estructura del telómero por un mecanismo distinto al de la telomerasa; sin embargo, los mecanismos exactos aún están por esclarecerse.

LA TELOMERASA Y SU RELACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO

La información reciente con respecto a los telómeros y su función obligan necesariamente a relacionarlos con la regulación de la vida de las células y con el envejecimiento. Se ha sugerido que una parte importante del deterioro funcional que se observa durante el envejecimiento sea producto del metabolismo alterado de las células con senescencia que se ha acumulado a lo largo de la vida de un organismo. Especialmente porque las células con senescencia no se dividen ni se mueren por apoptosis, por lo que no pueden ser reemplazadas. A esto se le conoce como la teoría telomérica del envejecimiento. Por años se especuló sobre la posibilidad de aumentar la longevidad celular mediante la inserción de telomerasa exógena. Finalmente esto fue posible en los famosos experimentos de Woodring Wright y colaboradores (15), que lograron transfectar el gen de la telomerasa a fibroblastos humanos. Como se esperaba, la enzima regeneró los telómeros y, al no acortarse, las células no entraron en senescencia.

Actualmente, no cabe duda de que los telómeros están relacionados con la proliferación celular, sin embargo, aún quedan muchas discrepancias por resolverse como para afirmar que este sea el único mecanismo que explica el envejecimiento. En primer lugar, hay que recordar que no todas las células del organismo se dividen, ya que existen tanto las células postmitóticas como las premitóticas. Las premitóticas son las células que están en continua división celular y pueden llegar en cierto momento a entrar en senescencia; mientras que las postmitóticas son todas aquellas células que una vez alcanzado un cierto nivel de diferenciación, no vuelven a dividirse más, como por ejemplo las neuronas y ciertas células musculares, por lo que estas células no serían susceptibles a la regulación telomérica (por lo menos como se ha planteado hasta este momento). Esto es interesante, puesto que una gran parte de las patologías asociadas a la vejez se relacionan con fallas o deterioros en el sistema nervioso central y muscular, de manera que dichos sistemas deben tener algún otro tipo de regulación como pudiera ser por ejemplo un mecanismo más determinante hacia la muerte por apoptosis.

Aun cuando algunos científicos piensan que pudiera existir un gen maestro que regule el proceso de envejecimiento, este fenómeno es tan complejo que debe ser regulado por una diversidad de genes y proteínas, que además se vean afectados por factores ambientales. De esta manera, una sola hipótesis como es la telomérica, es insuficiente para entender y explicar cómo se lleva a cabo el envejecimiento.

LA TELOMERASA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER

Por otro lado, se sabe que las células de un organismo tienen diferentes tiempos de proliferación y que muchas veces conviven dentro de un tejido células con senescencia con otras células que se están dividiendo. De hecho se ha propuesto (9) que el mecanismo de senescencia celular está más relacionado con una posible protección contra el cáncer, en los organismos jóvenes, que con un mecanismo integral de envejecimiento. Esto es muy interesante, ya que como se mencionó, se ha reportado que en las células tumorales los niveles de telomerasa incrementan. Actualmente se están efectuando investigaciones con fines terapeúticos para tratar de bloquear a la telo-merasa y acortar los telómeros de las células cancerosas (12).

PERSPECTIVAS

Las investigaciones en torno a la enzima telomerasa y a le estructura del telómeros siguen siendo de gran interés para la comunidad científica puesto que todavía hay muchas incógnitas por resolver, tanto en lo que respecta a la estructura como a la función de los mismos, así como su relación con la regulación de la proliferación celular y los fenómenos como el cáncer, el envejecimiento celular y la apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a los Doctores Patricia McChesney y Rubén Darío Ramírez, del laboratorio del Dr. W. Wrigth en la Universidad de Texas Southwestern Medical Center y a la Dra. Denise Muñoz de la UCLA en Berckley, California por sus atinados comentarios y sugerencias a este manuscrito. Así como al dibujante Mario Durán y al fotógrafo Arturo Franco del IFC, UNAM, al fotógrafo Jorge Lodigiani de la UAM-Iztapalapa, por su valiosísima ayuda con las figuras. A la M. en C. Norma López de la UAM-I y al Dr. Alejandro Zentella del IFC de la UNAM por su apoyo.

REFERENCIAS

1. Muller H J (1938) The remaking of chromosomes. Collecting Net *13*:181-195.
2. McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes of *Zea mays*. Genetics *26*:234-282.
3. Blackburn E H y Gall J G (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. J Mol Biol *120*:33-53.
4. Engelhard M y Mertens U M (1998) The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality. Oncol Rep *5*:1043-1052.
5. Li B, Oestreich S y de Lange T (2000) Identification of human Rap1: Implications for Telomere evolution. Cell *101*:471-483.
6. Griffith J D, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R, Bianchi A, Moss H y de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell *97*:503-514.
7. Olovnikov A M (1973) A theory of marginotomy. J Theor Biol *41*:181-190.
8. Hayflick L y Moorhead P S (1961) The serial cultivation of human diploid strains. Exp Cell Res *25*:585-621.
9. Campisi J (2000) Cancer, aging and cellular senescence. In vivo *14*:183-188.
10. Liu J P (1999) Studies of the molecular mechanism in the regulation of telomerase activity. FASEB J *13*:2091-2104.
11. Ducray C, Pommier J-P, Mertins L, Boissin F D y Sabatier L (1999) Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. Oncogene *18*:4211-4223.
12. Prescott J C y Blackburn E H (1999) Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde? Curr Opin Genet Develop *9*:368-373.
13. Bryan T M y Cech T R (1999) Telomerase and the maintenance of chromosomes ends. Curr Opin Cell Biol *11*:318-323.
14. Hsin-Ling H, Gilley D y Chen D J (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. Proc Natl Acad Sci USA *96*:12454-12458.
15. Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, Holt S E, Chio C-P, Morin G B, Harley C B, Shay J W, Lichtsteiner S y Wrigth W E (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science *279*:349-352.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Raúl Covián
Correo E: covianraul@correo.unam.mx

TEMA: Cinética enzimática. Inhibidores fuertemente unidos (pseudo-irreversibles).

La estigmatelina es un inhibidor del complejo bc_1 (quinol: citocromo *c* oxidorreductasa) mitocondrial. Su K_d es inferior a 0.1 nM, por lo que se le considera un inhibidor fuertemente unido. Se determinaron las velocidades iniciales de reducción de citocromo *c* tras incubar a distintos tiempos al complejo bc_1 purificado (1 nM) en presencia de distintas concentraciones de estigmatelina y quinol, de acuerdo con la siguiente tabla:

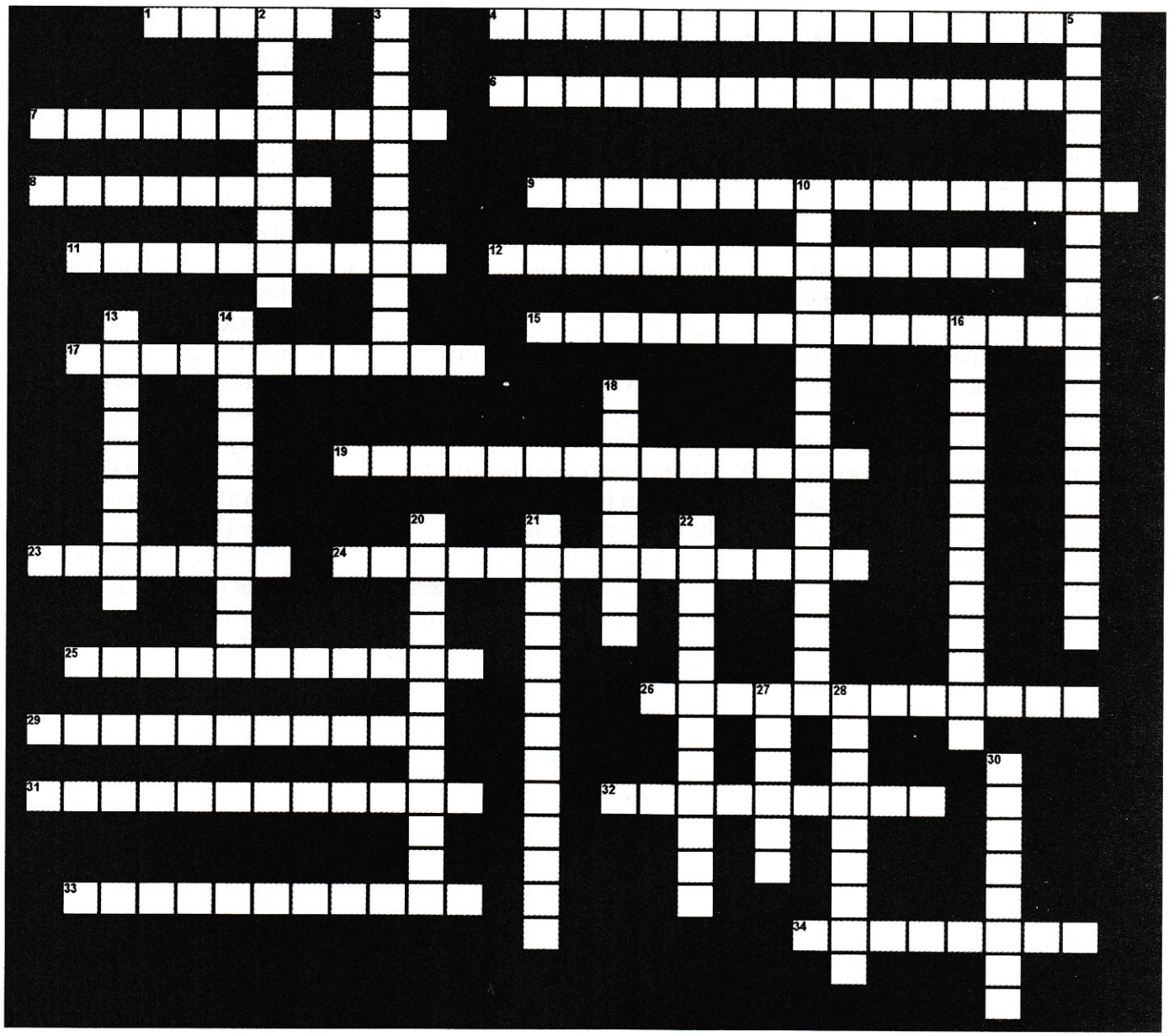
Tiempo (s)	Velocidad inicial (nmol citocromo *c* reducido(nmol bc_1)$^{-1}$(s)$^{-1}$)											
	Quinol (μM)											
	5			10			20			40		
	Estigmatelina (nM)											
	15	22.5	30	20	30	40	30	45	60	40	60	80
0	70	70	70	110	110	110	150	150	150	185	185	185
5	55.6	49.6	44.1	85.7	75.6	66.7	111	95.6	82.3	152	137	124
10	44.2	35	27.9	66.7	52	40.5	82.3	61	45.2	124	102	83.1
15	35.1	24.9	17.6	52	35.7	24.5	61	38.9	24.8	101	75.2	55.7
23	24.3	14.2	8.3	34.8	19.6	11	37.7	18.9	9.5	73.7	46.5	29.4
30	17.6	8.8	4.4	24.5	11.6	5.5	24.8	10.1	4.1	55.7	30.6	16.8

Calcular la constante de velocidad de unión de la estigmatelina (k_{on}), y el tipo de inhibición de este compuesto con respecto al quinol.

CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori

METABOLISMO DEL GLUCÓGENO



HORIZONTALES

1 Enfermedad de _____, hay glucogenosis debida a la deficiencia de amilo alfa-1,4-glucosidasa

4 La adrenalina la activa, por su acción el ATP forma un nucleótido cíclico.

6 Acción de las hormonas que inducen la degradación del glucógeno.

7 Unión presente en di y polisacáridos, participan los carbonos 1-4 y 1-6.

8 Hormona que se libera cuando disminuyen los niveles de glucosa en sangre.

9 Enzima que cataliza el paso de glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato.

11 Hormona hiperglucemiante y glucogenolítica que se libera en estados de estrés.

12 Nombre trivial de la alfa-1,6-glucosidasa.

15 La glucógeno sintasa capta glu-

cosa que está unida a este nucleótido difosforilado.

17 Glucógeno _____, es la enzima que libera glucosa-1-fosfato del polisacárido.

19 Vía catabólica, activada cuando su enzima reguladora se fosforila por una cinasa AMPc dependiente.

23 Órgano en el que el producto final de la glucogenólisis es glucosa-6-fosfato.

24 Enzima que puede activar tanto a la fosforilasa cinasa en la glucogenólisis como a la glucógeno sintasa en la glucogénesis.

25 Junto con el mecanismo de la síntesis del glucógeno, regula el nivel de glucosa en la sangre.

26 Enfermedades ocasionadas por el almacenamiento de glucógeno.

29 Tipo de músculo donde se almacena principalmente el glucógeno.

31 Vía estimulada por la insulina que activa a la proteína fosfatasa 1.

32 Actividad física que estimula la glucogenólisis.

33 Enzima que traslada un bloque de residuos glucosilo de una rama a otra del glucógeno.

34 Hormona que estimula la síntesis de glucógeno tanto hepático como muscular.

VERTICALES

2 Derivado fosforilado de la vitamina B6, participa en la fosforólisis del glucógeno.

3 Proteína reguladora del tamaño de los gránulos de glucógeno.

5 Nucleótido que en su forma cíclica activa a la proteína cinasa tanto el la síntesis como en la degradación del glucógeno.

10 Nucleótido trifosforilado necesario para la incorporación de glucosa al glucógeno.

13 Enzima que hidroliza glucosa-6-fosfato, presente en el hígado pero ausente en músculo y cerebro.

14 Forma en la que se libera el monosacárido después de la fosforólisis.

16 Mecanismo de inactivación de la glucógeno sintasa al pasar de la forma **a** a la **b**.

18 Manera en la que se encuentra la glucosa-1-fosfato luego de desprenderse del glucógeno, esto le impide salir de la célula.

20 Escisión de un enlace mediado por el ortofosfato.

21 Enzima que por hidrólisis del pirofosfato forma dos moléculas ácido fosfórico.

22 Se presenta cuando no hay suficiente degradación del glucógeno hepático.

27 Ión cuya presencia en el citosol activa a la fosforilasa cinasa y estimula a la glucogenólisis.

28 Forma en la que se almacena la glucosa en músculo e hígado.

30 Aminoácido precursor de la adrenalina.

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

La unión de un inhibidor (I) a una enzima (E) puede representarse de la siguiente manera:

$$E + I \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} EI \qquad (1),$$

donde k_{on} es la constante de velocidad de unión del inhibidor, y k_{off} es la constante de velocidad de liberación. Considerando que el valor de K_d para la estigmatelina es muy pequeño (<0.1 nM), k_{off} puede despreciarse. Entonces, la ecuación de velocidad de unión del inhibidor es:

$$v = k_{on}[E]\,[I] \qquad (2)$$

Considerando que $[I] >> [E]$, de manera que $[I]$ permanece constante durante el curso temporal de unión del inhibidor, la ecuación anterior puede expresarse como:

$$v = k^*[E] \qquad (3),$$

donde

$$k^* = k_{on}\,[I] \qquad (4)$$

A medida que el inhibidor se une, el cambio en la concentración de enzima activa $[E_a]$ en función del tiempo se expresa como:

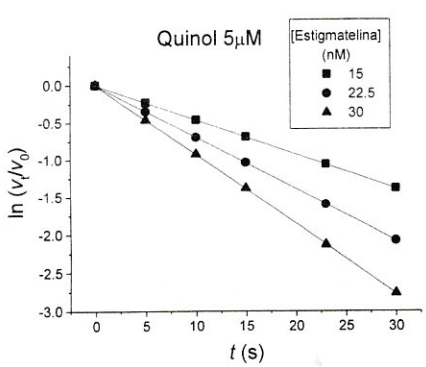
$$-d[E_a]/dt = k^*[E_a] \qquad (5)$$

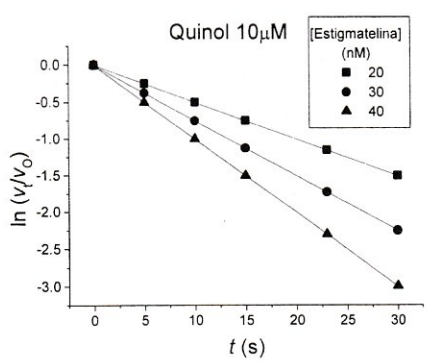
La integración de esta última ecuación con respecto a $[E_a]$ entre los tiempos 0 y t resulta en la siguiente expresión:

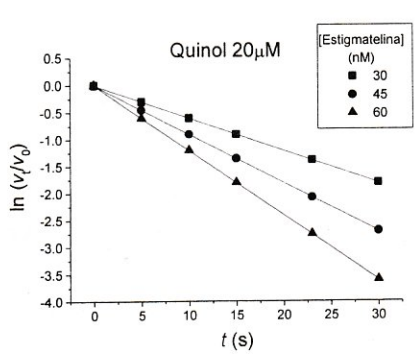
$$\ln ([E_a]_t/[E_a]_0) = -k^*\, t \qquad (6)$$

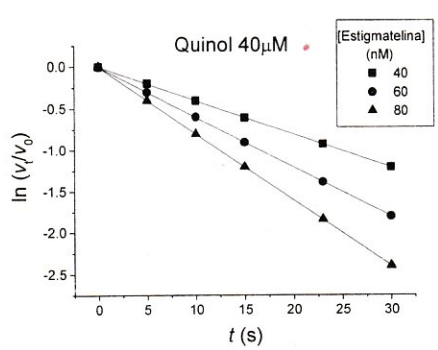
La concentracion de enzima activa puede seguirse midiendo la velocidad inicial de la reacción, como se muestra en la tabla de datos. Podemos entonces sustituir la velocidad inicial al tiempo cero (v_0) en lugar de $[E_a]_0$ y la velocidad inicial a cada tiempo de incubación (v_t) en vez de $[E_a]_t$ en la ecuación 6.

Por lo tanto, se grafica $\ln(v_t/v_0)$ contra tiempo tomando los valores de la tabla de datos, y con una regresión linear se obtiene la pendiente para cada concentración de inhibidor, la cual corresponde a $-k^*$.

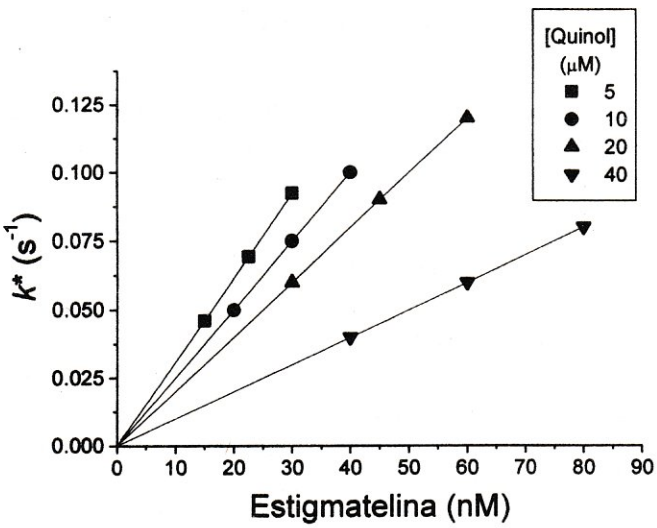








A continuación se grafican los valores de k^* obtenidos de las pendientes contra la concentración de inhibidor para cada concentración de quinol. De acuerdo con la ecuación 4, la pendiente de cada una de las rectas obtenidas corresponde al valor de k_{on} para cada concentración de quinol.



Puede observarse que la pendiente (es decir k_{on}) cambia en función de la concentración de quinol, lo que excluye un tipo de inhibición no competitiva por parte de la estigmatelina respecto al quinol. Esto además indica que para cada concentración de quinol, la pendiente que se obtiene corresponde en realidad a una constante de velocidad de unión aparente (k'_{on}), cuya definición depende de si la estigmatelina es un inhibidor de tipo mixto o competitivo.

Al graficar el inverso de k'_{on} contra la concentración de quinol es posible distinguir entre una inhibición competitiva y una inhibición mixta. En el caso de la competitiva, existe el complejo enzima-sustrato [ES], que se define a partir de su constante de disociación (K_s):

$$K_s = [E][S]/[ES];$$

$$[ES] = [E][S]/K_s \qquad (7)$$

También existe el complejo enzima-inhibidor [EI], cuya formación en este caso se considera irreversible por tratarse de un inhibidor fuertemente unido, por lo que se define basándose en la ecuación 1 como:

$$[EI] = k_{on}\,[E][I] \qquad (8)$$

La fracción de enzima acomplejada con inhibidor [EI]con respecto a la enzima total $[E]_T$ se define como:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{k_{on}[E][I]}{[E] + k_{on}\,[E][I] + \dfrac{[E][S]}{K_s}} \qquad (9)$$

Eliminando [E] y dividiendo numerador y denominador entre k_{on} se llega a la expresión:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{[I]}{\dfrac{1}{k_{on}} + [I] + \dfrac{[S]}{k_{on}K_s}} \qquad (10)$$

Al factorizar en el denominador obtenemos:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{[I]}{\dfrac{1}{k_{on}}\left(1 + \dfrac{[S]}{K_s}\right) + [I]} \qquad (11)$$

Otra manera de expresar la ecuación 11 es:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{[I]}{\dfrac{1}{k'_{on}} + [I]} \qquad (12),$$

donde:

$$\frac{1}{k'_{on}} = \frac{1}{k_{on}} + \frac{1}{K_s k_{on}}[S] \qquad (13),$$

Esta expresión (ec. 13) corresponde a la ecuación de una recta, donde el inverso del valor de la ordenada al orígen corresponde a la constante de velocidad de unión real del inhibidor (en ausencia de sustrato), y el intercepto en el eje de las abscisas corresponde a $-K_s$.

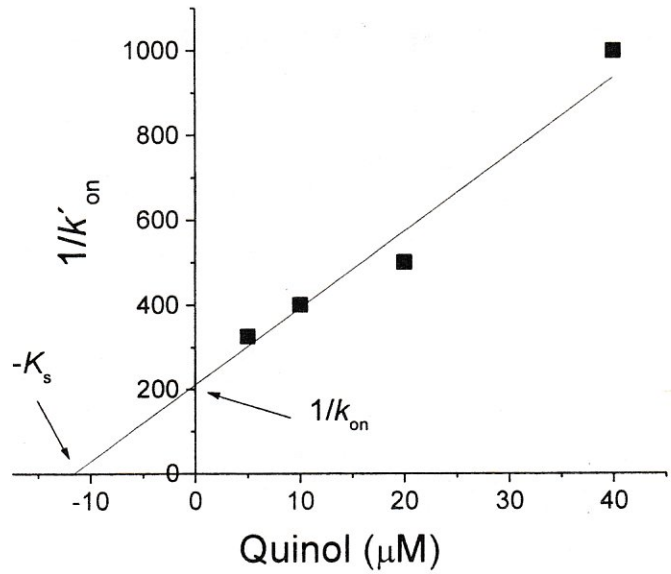
En una inhibición de tipo mixto existe, además de [ES] y [EI], la especie enzima-sustrato-inhibidor [ESI), en cuya definición se contempla un factor α que describe el cambio en afinidad por el sustrato en presencia de inhibidor y viceversa. Una deducción semejante a la mostrada en las ecuaciones 7 a 13 para una inhibición mixta resulta en la siguiente definición:

$$\frac{1}{k'_{on}} = \frac{1}{k_{on}}\left(\frac{1}{1+\frac{[S]}{\alpha K_s}}\right) + \left(\frac{1}{k_{on}}\right)\left(\frac{1}{K_s + \frac{[S]}{\alpha}}\right)[S] \quad (14)$$

La ecuación 14 muestra que al graficar el inverso de k'_{on} contra el sustrato, la pendiente no es una constante, sino una función del propio sustrato, de manera que cuando [S] >>K_s la pendiente tenderá a cero.

Una inhibición mixta, por lo tanto, resulta en una hipérbola que no parte del origen. Ver gráfica de la derecha, donde se muestran los datos del presente ejercicio.

La linearidad en la gráfica indica que la estigmatelina es un inhibidor competitivo pseudoirreversible respecto al quinol. La constante real de velocidad de unión del inhibidor (k_{on}) resultó ser de 4.7 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, y el valor de K_s para el quinol fue de 11.7 μM.

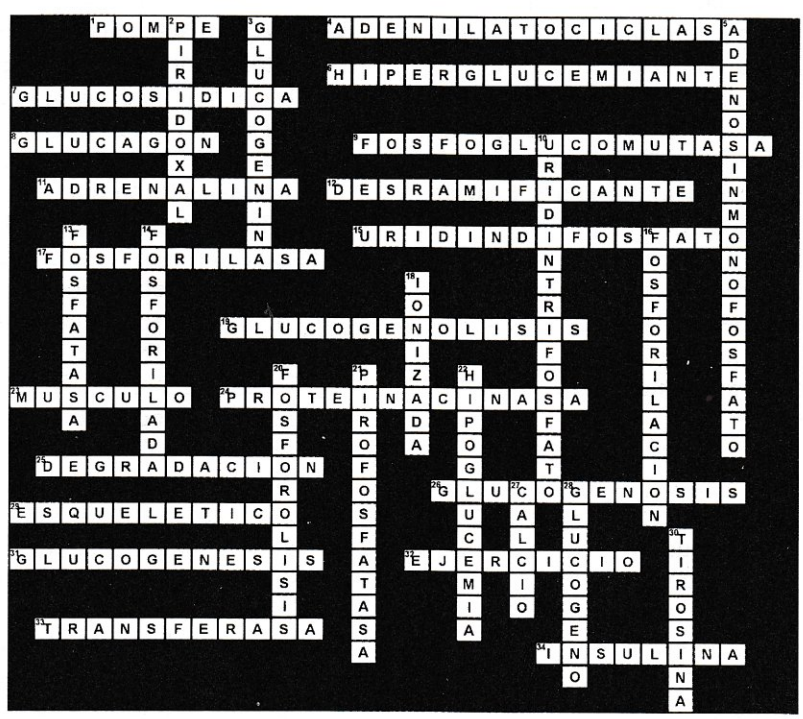


REFERENCIAS

1. Cardemil E (1987) Kinetics of the chemical modification of enzymes. En: Chemical modification of enzymes: active site studies. Editor Eyzaguirre J. John Wiley and Sons, New York, pp. 23-34.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

METABOLISMO DEL GLUCÓGENO



REB 21(1): 64-68

Informe de la Semana de la Educación Bioquímica 2001 (XXVIII Taller de Actualización Bioquímica y IX Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.)

La Semana de la Educación Bioquímica 2001 se realizó en las instalaciones de la Ciudad Universitaria de la UNAM, del 1 al 5 de octubre de 2001. Durante la inauguración del programa académico de la Semana de la Educación Bioquímica 2001, el Dr. Alejandro Cravioto, director de la Facultad de Medicina de la UNAM, destacó la importancia de mantener este tipo de actividades que han permitido una comunicación directa entre los académicos involucrados en la generación de conocimientos, los responsables de transmitirlos y los que diseñan e instrumentan estrategias docentes, proceso en el cual todos los participantes resultan beneficiados. El Comité Organizador del Taller estuvo conformado por los doctores Alicia Cea Bonilla, Patricia del Arenal Mena, Juan Pablo Pardo Vázquez, Enrique Piña Garza y Marco Antonio Juárez Oropeza, mientras que el Comité Organizador del Congreso estuvo constituido por los doctores Alicia Cea Bonilla, Patricia Torres Durán y Marco Antonio Juárez Oropeza, todos ellos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

Los trabajos preparativos para la Semana de la Educación Bioquímica iniciaron en enero de 2001. La difusión del programa de la Semana de Educación Bioquímica se realizó mediante carteles, anuncios en la Gaceta de la UNAM y en el Boletín de Educación Bioquímica, correo postal, electrónico y vía telefónica. Se convocó a profesores y estudiantes de la Bioquímica y materias afines, de diversas instituciones de Educación Media Superior y Superior, tanto del Distrito Federal como del interior de la República. Se registró la asistencia y participación de 116 estudiosos de la Bioquímica: 72 procedentes del Distrito Federal, uno de Israel y 43 del interior del país. El número de asistentes de los diferentes estados fue el siguiente:

Campeche	1	Michoacán	2
Chiapas	1	Morelos	3
Chihuahua	3	Nuevo León	5
Colima	1	Puebla	11
Edo. de México	3	Querétaro	2
Guerrero	1	Sinaloa	1
Hidalgo	1	Sonora	2
Jalisco	1	Tamaulipas	4
		Yucatán	1

Adicionalmente, asistieron sin registrarse más de 20 profesores y/o estudiantes, los cuales solamente permanecieron en las sesiones de trabajo durante uno o dos días, en función de su disponibilidad de tiempo y de su interés particular por algunas conferencias.

El programa de la Semana de la Educación Bioquímica estuvo estructurado en tres tipos de sesiones: las matutinas, que versaron sobre temas de actualización y se presentaron en la forma de conferencias magistrales; las vespertinas, que abordaron aspectos teórico-prácticos de la construcción de material didáctico hipertextual como herramienta de apoyo al proceso de enseñanza-aprendizaje, y finalmente, la sesión de carteles del IX Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., en la que se presentaron los trabajos de investigación docente de diversos grupos de profesores. En ellos se abordaron temas de evaluación de alumnos, de profesores y de metodologías de la enseñanza media superior y superior, tanto del área médica como de la química y la biológica, así como también se presentaron modelos didácticos de apoyo a la enseñanza (método quiromántico, investigación formativa, multimedia del ciclo cardíaco, página Web de Bioquímica y curso de Bioquímica por internet). La presentación formal de los carteles se realizó durante la primera tarde de la Semana de la Educación Bioquímica 2001, pero para una mayor difusión del trabajo de investigación docente, los carteles permanecieron durante 3 días consecutivos.

Los temas y ponentes de las sesiones de la Semana de la Educación Bioquímica fueron los siguientes:

–Avances y retrocesos en el estudio del origen de la vida. Dr. Antonio Lazcano Araujo, de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

–Genes y genomas. Dr. Víctor Valdés López, de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

–Biología genómica computacional, aplicada a la regulación de la transcripción. Dr. Gabriel Moreno Hagelsieb y Dr. Julio Collado Vides, del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.

–Regulación por óxido-reducción: papel esencial en la iniciación del crecimiento celular. Dr. Carlos Gitler, del Weizmann Institute of Science, Israel.

–Fisiología celular y molecular de canales iónicos. Dr. Marcelino Cereijido y Dra. Jacqueline Moreno, ambos del CINVESTAV, IPN.

–Alteraciones Bioquímicas en la enfermedad de Alzheimer. Dra. Clorinda Arias, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

–Control del volumen celular en células nerviosas: fisiología y patología. Dra. Herminia Pasantes, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

–Ruta secretoria y *Entamoeba histolytica*. Dr. Alejandro Alagón, del Instituto de Biotecnología, UNAM.

–Regulación de la transcripción por hormonas esteroides sexuales. Dr. Antonio Cerbón y Dra. Adriana Mendoza, ambos de la Facultad de Química, UNAM.

–*Escherichia coli* patógena, causante de infección intestinal. Dr. Carlos Eslava y Dr. Alejandro Cravioto, ambos de la Facultad de Medicina, UNAM.

–Metaloproteinasas de matriz extracelular, un delicado equilibrio entre daño y reparación. Dra. Annie Pardo, de la Facultad de Ciencias, UNAM.

–El componente genético de la diabetes mellitus tipo 2. Dra. Teresa Tusie Luna, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

–Estrategias docentes en medicina. Lic. Mónica Ramírez, de la Facultad de Medicina, UNAM.

–El aprendizaje basado en la solución de problemas (ABP), una estrategia para la enseñanza de la Bioquímica. Experiencia en la Escuela de Medicina del ITESM. Dr. Enrique Martínez Gómez, del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

–Química básica para estudiantes de carreras "no químicas". Dra. Isabel Raygoza y Mtra. Irma Delfín, de la UAM-Azcapotzalco y de la ENEP-Iztacala, respectivamente.

–La construcción de material didáctico hipertextual como herramienta de apoyo al proceso enseñanza-aprendizaje. Dr. Joel Reyes Méndez, de la UAM-Xochimilco.

Como ha sido costumbre, los ponentes disertaron sobre el tema de su presentación desde un enfoque básico, general e integral, hasta llegar a los aspectos más relevantes y de frontera, los que habitualmente sólo se encuentran en las publicaciones especializadas más recientes. Al final de cada presentación, los profesores y estudiantes asistentes tuvieron la posibilidad de que sus dudas fueran aclaradas por los ponentes, lo que permitió, en muchas ocasiones, un intercambio fructífero de ideas y conocimientos.

Las sesiones teórico-prácticas sobre la construcción de material didáctico hipertextual permitieron que, tanto los profesores con poca experiencia en el uso de esta herramienta metodológica, como aquellos ya versados, pudieran diseñar sus propias páginas web, así como el evaluar la conveniencia didáctica del contenido de la propia página.

El tema de cada ponencia se redactó a manera de monografía. Como ha sido norma y tradición, todas las monografías fueron arbitradas por el Comité Editorial del Mensaje Bioquímico y posteriormente publicadas en su volumen XXV, el cual fue distribuido oportunamente a todos los participantes de la Semana de la Educación Bioquímica 2001.

El programa de actividades académicas de la Semana de la Educación Bioquímica 2001 fue clausurado por la Dra. Ana María López Colomé, Jefa del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, quien agradeció la participación entusiasta de los asistentes, así como de las autoridades universitarias, en particular del Dr. Alejandro Cravioto, por las facilidades proporcionadas para la realización de la Semana de la Educación Bioquímica 2001.

Finalmente, se realizó la sesión de negocios de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. En ella se discutieron aspectos relacionados con los estatutos de la Asociación y se sugirió elaborar una propuesta de modificación de ellos. También se propusieron alternativas para impulsar las actividades Académicas en los diversos Estados de la República. Por otra parte, se comentó la conveniencia de cambiar el nombre del Boletín de Educación Bioquímica por el de Revista de Educación Bioquímica, el cual responde a la madurez alcanzada por nuestra publicación.

Con relación a la evaluación de la Semana de la Educación Bioquímica 2001, los asistentes opinaron sobre la suficiencia y oportunidad de la información recibida para anunciar el programa de actividades, sobre la duración del evento y de las sesiones, así como sobre el interés que les generó cada ponencia para seguir estudiando dicho tema, el conocimiento que les incrementó y la aplicación que tendrá dicho conocimiento dentro de sus actividades docentes.

De las encuestas recibidas (36), se obtuvieron los siguientes datos:

Los participantes fueron académicos de las Escuelas o Facultades de Medicina, Química, Odontología, Agronomía, Biología, Enfermería, Nutrición, Biotecnología, Zootecnia y Farmacia.

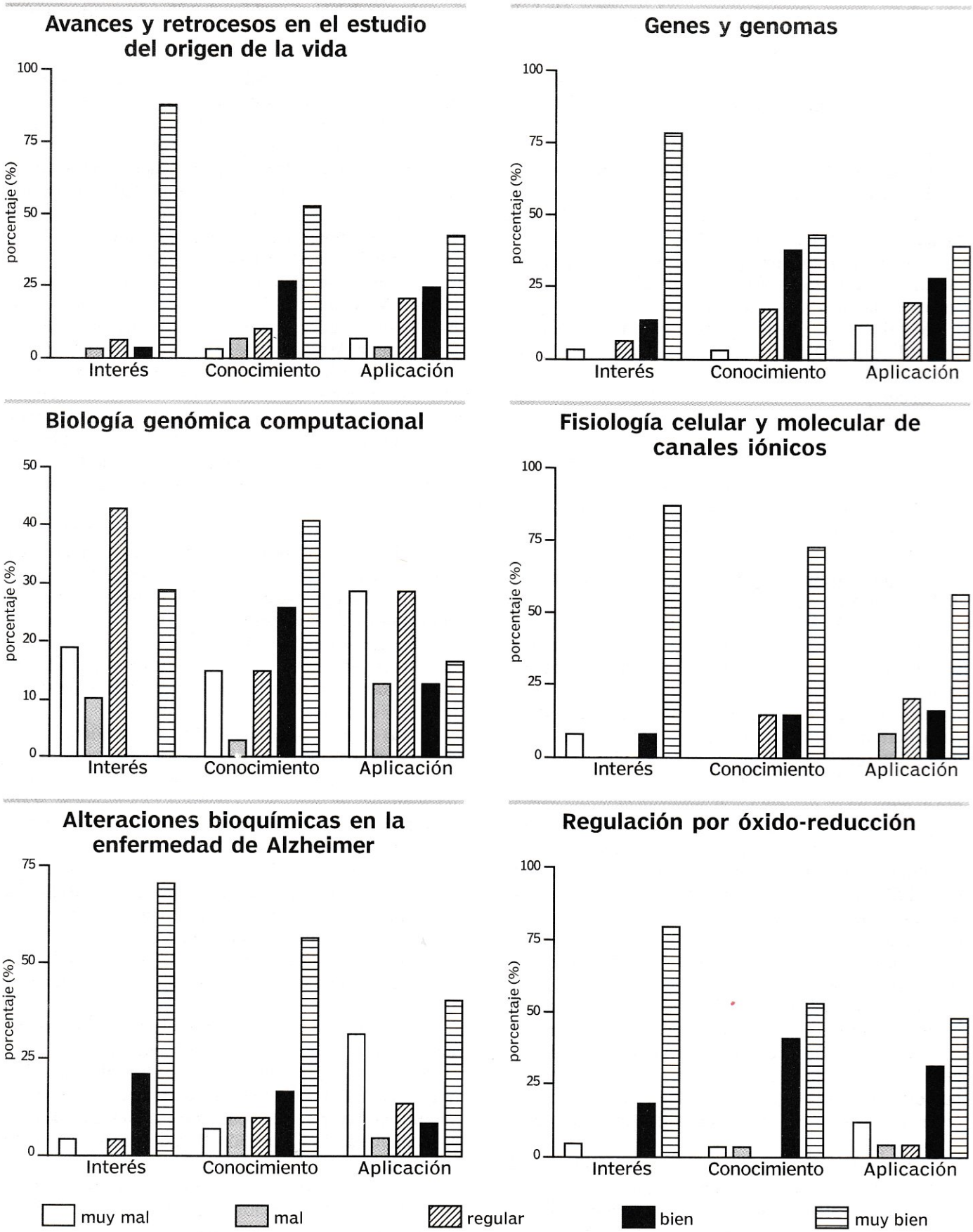
Mientras que el 60% de los participantes ha asistido menos de 6 veces a la Semana de la Educación Bioquímica, el 40% restante ha participado en más de 6 ocasiones.

El 80% de los participantes opinaron que la información del programa académico de la Semana de la Educación Bioquímica fue recibida en forma oportuna y suficiente.

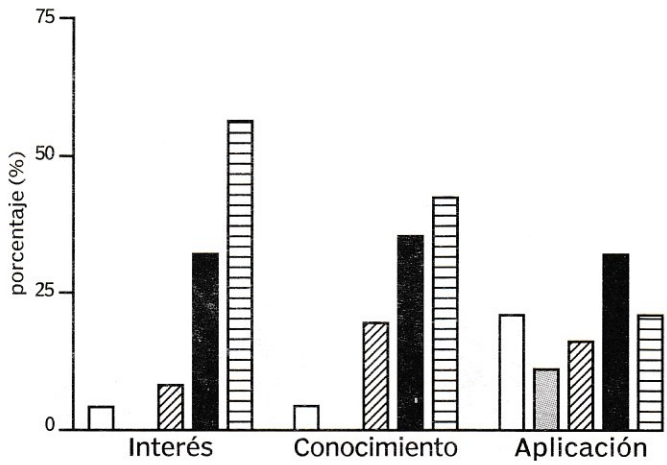
El 80% de los asistentes consideró que la duración del evento y de las sesiones fue adecuada.

Académicos de Chapingo, Jalisco, Hidalgo, Guerrero y D.F. (UAM-X, UNAM-Fac. de Ciencias) mostraron interés en llevar a sus Escuelas o Facultades la sede de la Semana de la Educación Bioquímica en un futuro próximo.

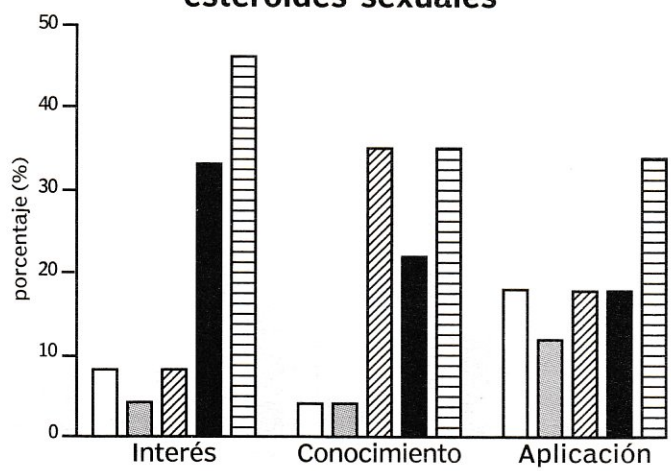
La opinión de los participantes con relación al interés, conocimiento y aplicación de los temas presentados se presenta en las siguientes figuras.


Avances y retrocesos en el estudio del origen de la vida
Genes y genomas
Biología genómica computacional
Fisiología celular y molecular de canales iónicos
Alteraciones bioquímicas en la enfermedad de Alzheimer
Regulación por óxido-reducción
porcentaje (%)
Interés
Conocimiento
Aplicación
muy mal
mal
regular
bien
muy bien

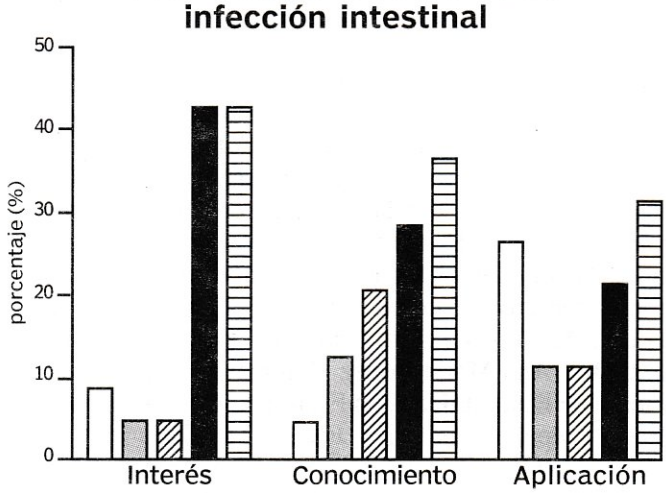
Ruta secretoria y *Entamoeba histolytica*



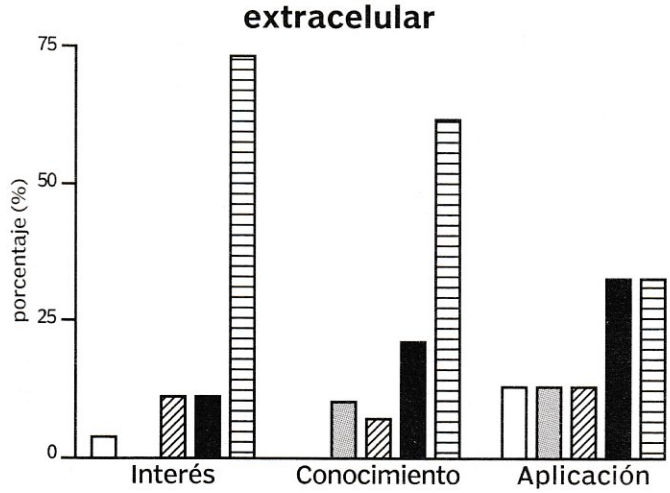
Regulación de la transcripción por hormonas esteroides sexuales



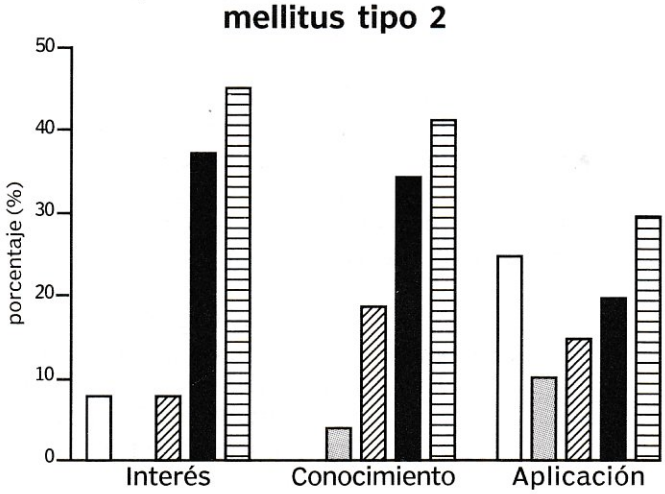
***E. coli* patógena causante de infección intestinal**



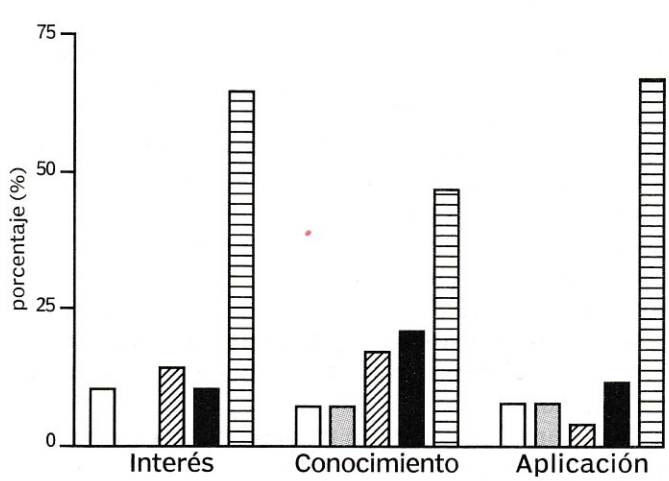
Metaloproteinasas de matriz extracelular



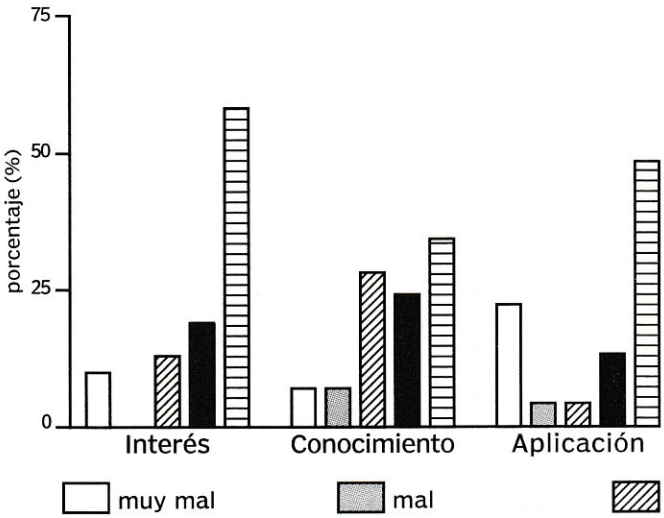
El componente genético de la diabetes mellitus tipo 2



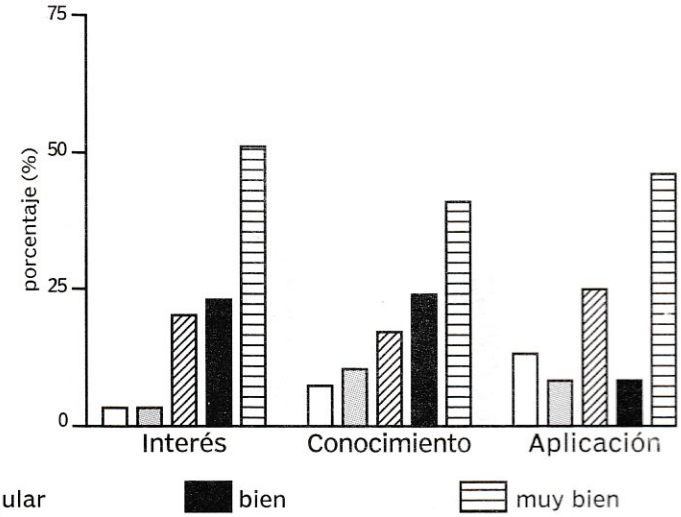
Estrategias docentes en Medicina



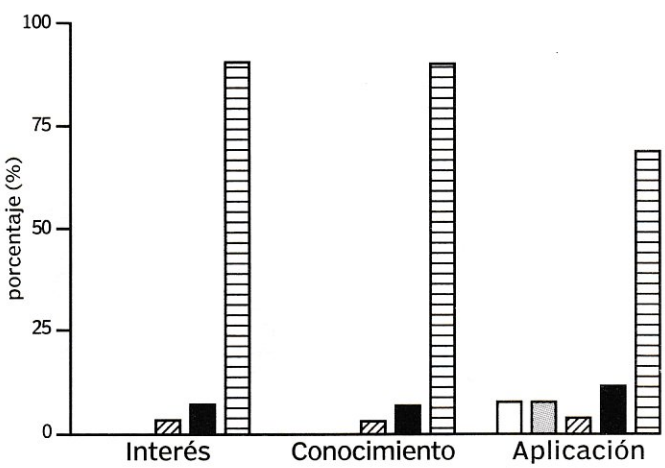
El ABP, una estrategia para la enseñanza



Química básica para estudiantes



Control del volumen celular



Por cambios de última hora, dos de las ponencias programadas inicialmente no pudieron llevarse a cabo, la del Dr. Mauricio Montal "Mitocondria y apoptosis" y la del Dr. José Moreno "Transporte intracelular de proteínas"; no obstante, en el volumen XXV del Mensaje Bioquímico están publicadas las monografías de sus respectivos temas. La ponencia del Dr. Carlos Gitler "Regulación por óxido-reducción-papel esencial en la iniciación del crecimiento celular" y la ponencia de la Dra. Herminia Pasantes "Control del volumen celular en células nerviosas: fisiología y patología", no aparecen publicadas en el Mensaje Bioquímico por la razón antes mencionada.

Por último, es necesario reconocer que en esta ocasión, la Secretaría de Educación Pública (SEP), a través de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., brindó su apoyo al Comité Organizador de la Semana de la Educación Bioquímica 2001 para que un mayor número de profesores, procedentes de Universidades e Institutos de Educación Superior del interior de la República pudieran compartir los frutos de las actividades de esta semana de trabajo. Además, aunque finalmente no se requirió, la Academia Mexicana de Ciencias (AMC) y la Fundación México-Estados Unidos para la Ciencia (FUMEC) ofrecieron su apoyo económico. No olvidamos las facilidades que nos proporcionaron en todo momento las autoridades y funcionarios de la UNAM: Dr. Alejandro Cravioto, Director de la Facultad; Dra. Ana María López Colomé, Jefa del Departamento de Bioquímica de la Facultad, y Dra. Irma Bernal Lugo (Depto. de Química, Facultad de Química), entre otros. A todos ellos, nuestro más reconocido y sincero agradecimiento. En esta semana académica también contamos con la colaboración de las siguientes empresas, a las cuales les agradecemos sinceramente: Sigma-Aldrich, Accesolab, Limusa y McGraw Hill Interamericana. También, reconocemos el apoyo brindado en todo momento por la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Gracias a la participación de los ponentes y asistentes, el Comité Organizador de la Semana de la Educación Bioquímica seguirá retroalimentándose para ofrecer cada vez mejores programas de actividades, acordes con el desarrollo de la Bioquímica.

El Comité Organizador de la
Semana de la Educación Bioquímica 2001:
Dra. Irene Patricia del Arenal Mena
Dra. Alicia Cea Bonilla
Dra. Patricia V. Torres Durán
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Dr. Enrique Piña Garza
Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Premio de la UNESCO para la Doctora Ana María López Colomé

La Dra. Ana María López Colomé, Jefa del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina e investigadora del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, fue designada como una de las cinco mujeres que este año obtuvieron el Premio L'Oréal-UNESCO para las Mujeres en la Ciencia. El premio obtenido por la Dra. López Colomé fue instituido por la Compañía L'Oréal con el apoyo académico de la UNESCO hace cuatro años y se concede anualmente a una investigadora por región geográfica: África, América del Norte, Asia-Pacífico, Europa y Latinoamérica.

El jurado que otorgó el Premio está constituido por investigadores distinguidos de diferentes países del mundo y es presidido por el profesor Christian de Duve, Premio Nobel de Medicina en 1974. En esta ocasión la entrega de premios a estas cinco investigadoras se realizó el 6 de marzo del presente año en la sede de la UNESCO en París, Francia.

Durante 30 años la Dra. López Colomé se ha desarrollado en el campo de la investigación científica. Inicialmente su principal interés fue el conocer cómo se realiza la transmisión de la información entre las células nerviosas tomando como modelo a la retina, ya que se consideraba más fácil estudiar este fenómeno en un sistema relativamente sencillo y accesible como la retina, cuando se compara con otras regiones del sistema nervioso.

Posteriormente su investigación se ha dirigido al estudio relacionado con el funcionamiento de la retina misma, ya que ha encontrado que muchos de los mecanismos básicos de ésta, difieren considerablemente de los del cerebro. Su trabajo está enfocado en conocer cómo las células nerviosas de la retina transmiten los impulsos luminosos que reciben del exterior hacia el cerebro, donde se integran en forma de imágenes. Los fotorreceptores de la retina transforman los estímulos luminosos que reciben del exterior en una señal química –la liberación del neurotransmisor glutamato– que excita a una cadena de células para que finalmente los impulsos nerviosos desemboquen en la corteza óptica del cerebro. Una de las contribuciones de la Dra. López Colomé en colaboración con su grupo de trabajo, es la caracterización de los receptores del glutamato mediante los cuales se transmite el impulso nervioso excitador de la retina y con ello contestar algunas preguntas a saber: ¿cómo son estos receptores?, ¿cuáles son los agentes activadores e inhibidores que los regulan? y ¿qué reacciones se desencadenan en la célula porque el glutamato se une a dichos receptores?

A través de la caracterización de los receptores de glutamato, las vías intracelulares acopladas a su activación y las consecuencias de la misma sobre la expresión de genes específicos, la Dra. López Colomé no sólo ha demostrado que estos mecanismos difieren de los del sistema nervioso central, sino que ha fundamentado la posibilidad de que las células gliales de la retina (células de Müller) pudieran modular la neurotransmisión excitadora, llevada a cabo por las neuronas, en este tejido.

El trabajo de la Dra. López Colomé está orientado a la generación del conocimiento que puede ser de utilidad para otras especialidades y de esta manera participar en el esclarecimiento de algunas patologías; al mismo tiempo la Dra. López Colomé contribuye con la Universidad Nacional Autónoma de México en la formación de estudiantes tanto de licenciatura como de posgrado, así como de investigadores en su laboratorio.

El premio obtenido por la Dra. Ana María López Colomé nos llena de orgullo a los miembros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Leonor Fernández Rivera-Río y
Yolanda Saldaña Balmori
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México

REB 21(1): 70-71

Presentación de la Revista de Educación Bioquímica

Este número es de especial importancia para el comité editorial del hasta ahora llamado Boletín de Educación Bioquímica, ya que a partir de esta fecha se convierte en la Revista de Educación Bioquímica (Rev Educ Bioq) con las abreviaturas de REB. Es éste, un pequeño cambio, en apariencia, pero es en realidad muy importante, ya que representa la consolidación del esfuerzo editorial que a través de 20 años han realizado 27 editores, que han trabajado con total entrega y dedicación, en distintas circunstancias, bajo distintas presiones y en muy diversas condiciones, pero siempre bajo un mismo criterio y buscando cumplir los más altos objetivos de la revista: La enseñanza de la bioquímica y la difusión de los conocimientos.

Este paso nos permite entrar a la siguiente etapa de la revista con un espíritu renovado, conservando una importante y valiosa herencia e integrando nuevos conceptos que exige la enseñanza actual de la bioquímica. Aun cuando estamos satisfechos por esta etapa, que ahora vive la revista, no es suficiente y seguimos trabajando para realizar los cambios que dicta la nueva realidad, que cada vez es más evidente y que impone nuevos enfoques en la enseñanza, en la investigación, en la bioquímica, en la medicina, en las ciencias, en las artes y en la educación. Esta también es una oportunidad para renovar los compromisos adquiridos por el comité editorial de la ahora REB y los tomamos con una gran responsabilidad y deseos de servicio, como ha caracterizado a los comités editoriales que nos antecedieron y que seguramente será la norma que perdure en los siguientes.

En este contexto hemos pedido a la Dra. Yolanda Saldaña, actualmente editora de la revista y editora fundadora de la misma, que nos exprese algunas ideas al respecto de esta celebración que compartimos con nuestros lectores. Asimismo, anexamos al final una lista de los editores que han formado parte de los diferentes comités editoriales a lo largo de estos 20 años, para rendir así un pequeño pero significativo reconocimiento a su desinteresada labor.

Dr. José Víctor Calderón Salinas,
Editor en Jefe

Boletín y Revista de Educación Bioquímica (BEB-REB)

En marzo de 1982 se inició la publicación trimestral del Boletín de Educación Bioquímica (BEB), un órgano de comunicación, difusión y servicio entre los que nos dedicamos a la bioquímica; el cuerpo editorial fue constituido por un grupo de profesores de bioquímica con representación de algunas instituciones educativas: del Instituto Politécnico Nacional, la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados; de la Universidad Nacional Autónoma de México, las Facultades de Química y Medicina y los Institutos de Investigaciones en Fisiología Celular y de Investigaciones Biomédicas, y el Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez".

El BEB surge como un reclamo de algunos profesores de bioquímica de universidades del interior del país ya que desde 8 años atrás, el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM les había estado convocando anualmente al Taller de Actualización Bioquímica y los profesores asistentes a tal reunión instaron repetidamente en que ellos necesitaban una comunicación más frecuente que la que el Departamento de Bioquímica les ofrecía. Desde su constitución el BEB es un órgano independiente que se echa a andar sólo con la voluntad de los que trabajamos en su elaboración, sin apoyo oficial institucional pero con mucho entusiasmo. El Dr. Enrique Piña, principal promotor del BEB, logró conseguir apoyos económicos dentro de la UNAM ya sea del Departamento de

Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Dirección de la Facultad de Medicina, de la Secretaría General de Rectoría, de la Coordinación de Investigación Científica y del Sistema de Universidad Abierta.

No todo el tiempo corrimos con tan buena suerte, vinieron tiempos difíciles, pero logramos sacarles provecho ya que eso fue la razón que nos obligó a pensar en generar nuestros propios recursos y así el 18 de agosto de 1989 se declara fundada la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. en donde el órgano de comunicación es el Boletín de Educación Bioquímica.

Independientemente de otras actividades a las que la Asociación está comprometida como es el organizar el Congreso Anual, conectar a profesores de las diferentes universidades, servir a aquellos asociados que requieren alguna información para un mejor servicio docente, difundir noticias de las actividades relacionadas con nuestra disciplina, etc., el BEB es el representante trimestral de nuestra Asociación.

Sin entrar en competencia con revistas internacionales de investigación el BEB ha sido desde su inicio, una publicación especializada con artículos originales y con ello cumple su aspiración de servir de vehículo de difusión y comunicación; función que por 20 años ha venido desarrollando entre aquellos que han respondido al llamado y todos los que hemos trabajado en este proceso en el cual creemos, al cual queremos y que sabemos que es útil.

El trabajo de edición realizado durante sus primeros 20 años se resume en la siguiente lista

NOMBRE	**AÑO**
Guillermo Alvarez Llera	1984-marzo 1987.
José Víctor Calderón Salinas	1996-la fecha.
Alfonso Cárabez Trejo	1982-1993.
Guillermo Carvajal Sandoval	1982-1994.
Edmundo Chávez Cosio	1995-1998
Socorro C. Durán Vargas	2000-la fecha
Alberto Hamabata Nishimuta	1982-jun. 1993.
José Antonio Holguín Hueso	1982-marzo 1987.
Albert Huberman Wajsman	1989-1998.
Marco Antonio Juárez Oropeza	2000-la fecha.
Carlos Larralde Rangel	1989-1993.
Jesús Manuel León Cázares	1982-1999.
Federico Martínez Montes	2000-sept. 2000 y 2002-la fecha.
Jaime Mas Oliva	1993-1998
Graciela Meza Ruiz	sept. 2000-la fecha.
Fernando Montiel Aguirre	1995-jun. 2001.
Rafael Moreno Sánchez	2000-la fecha.
Rosario A. Muñoz Clares	jun. 2001-la fecha.
Enrique Piña Garza	1982-1993.
Jorge Joel Reyes Méndez	2000-la fecha.
Manuel L. Robert	1982.
Emilio Rojas del Castillo	2000-la fecha.
Rocío Salceda Sacanelles	sept. 2000-la fecha.
Yolanda Saldaña Balmori	1982-la fecha.
Sergio Sánchez Esquivel	1982-1999.
Saúl Villa Treviño	1982-marzo 1983.
Alejandro Zentella Dehesa	1995-la fecha.

Nota: Cuando no se menciona el mes de inicio es marzo y el de término es diciembre.

La evolución y madurez que se ha logrado a través del tiempo, del trabajo de los diferentes participantes, del número y calidad de los artículos que son sujetos al trabajo editorial, nos ha encaminado dentro el proceso natural de la evolución (Saldaña de Delgadillo Y. Historia natural del BEB. BEB 10(14):29-30,1991) a un cambio tanto del título como de la presentación de nuestro órgano de comunicación, a partir de marzo de 2002 el Boletín de Educación Bioquímica (BEB) se torna Revista de Educación Bioquímica (REB).

A través de estas líneas nos dirigimos a los lectores de la Revista de Educación Bioquímica para pedirles nos hagan llegar sus comentarios acerca del trabajo que realizamos, sus opiniones ayudarán a reforzar nuestro deseo de servir o en su caso a corregir la ruta.

Yolanda Saldaña Balmori,
Editora Fundadora

REB 21(1): 72

CONVOCATORIA

REGISTRO DE CANDIDATOS PARA OCUPAR LA PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C., DURANTE EL BIENIO 2002-2004

Con base en el Artículo Noveno de los Estatutos de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., el Consejo Directivo de la Asociación convoca a sus asociados a postular candidatos para ocupar la Presidencia de la Asociación durante el bienio 2002-2004, a partir de septiembre de 2002.

Los asociados numerarios deberán postular por escrito a sus candidatos y cada candidato postulado deberá entregar la siguiente documentación:

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

Las cartas de postulación de los Asociados y la documentación de cada candidato deberán ser entregadas en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, antes del lunes 15 de julio de 2002. Los documentos requeridos podrán ser entregados personalmente o enviados por correo postal. El envío de la documentación por medios electrónicos (fax o correo electrónico) sólo tendrá validez hasta recibir los documentos originales.

Con base en el 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 X Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., programada para agosto de 2002.

Ningún candidato podrá ser registrado después del 15 de julio de 2002, después de lo cual el Consejo Directivo analizará todas las propuestas para generar una lista de candidatos elegibles, misma que presentará durante la sesión regular de negocios de la Asociación, que se realizará en agosto durante el X Congreso de la Asociación.

Entrega de documentos: Sra. Marivel Rojas García. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-281, 04510, México, D.F. Correo E: beb@bq.unam.mx Tel.: 5623-2170, Fax: 5616-2419

Consejo Directivo de la
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2002

XXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

y

X CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

Del 27 al 30 de agosto de 2002.

En las instalaciones de la Facultad de Medicina, UNAM
Ciudad Universitaria, México, D.F.

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina, UNAM

Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A.C.

Visite nuestra página: http://laguna.fmedic.unam.mx/%7Eevazquez/tab/

CUOTAS DE INSCRIPCIÓN A LA SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA:

Antes del 30 de mayo $350.00 M.N. Inscripción posterior al 30 de mayo $500.00 M.N.
Profesores que pertenecen a la AMPB, A.C. y estudiantes $350.00 M.N.
Se recuerda a los miembros de la AMPB, A.C. que la renovación de su membresía (2002) es de $150.00 M.N.

MAYORES INFORMES: Srita. Rosa Ma. López para el XXIX TAB y con Marivel Rojas para el X Congreso. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Tel.: 01(55) 56-23-21-75. Fax: 01(55) 56-16-24-19. Horario de oficina.

REB 21(1): 74

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA, AGOSTO DE 2002

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Programa de Actividades

Se llevará a cabo en las Instalaciones de la Facultad de Medicina, UNAM

HORA	MARTES 27	MIÉRCOLES 28	JUEVES 29	VIERNES 30
9:00 a 10:45		**Dr. Wilhelm Hansberg** **IFC, UNAM** **Biología de las especies reactivas de oxígeno**	**Dr. Alejandro Fernández-Velasco** **Fac. Med., UNAM** **Enfermedades relacionadas con el plegamiento de proteínas**	**Dr. Arturo Rojo** **UAM-Iztapalapa** **Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas pequeñas. Aplicación al diseño de fármacos**
RECESO				
11:00 a 12:45		**Dra. Nancy Carrasco** **Albert Einstein College of Medicine, Nueva York** **La zaga del transportador de yodo: de la identificación molecular a sus aplicaciones clínicas**	**Dr. Julio Reyes Leyva** **Depto. de Inmunología Unidad Biomédica de Oriente. IMSS, Puebla** **Mecanismos moleculares de la patogenia viral**	**Dr. Salomón Bartnicki García** **Centro de Inv. Científica y de Educación Sup., Ensenada, B. C.** **Importancia de la biofísica en la morfogénesis de los hongos**
RECESO				
13:00 a 14:30		**Congreso AMPB, A. C.**	**Congreso AMPB, A. C.**	**Dr. Salomón Bartnicki García** **CICESE** ***Taller de demostración*** Modelos cibernéticos para simular el desarrollo celular
COMIDA				
16:00 a 17:30	**INSCRIPCIONES**	**TALLER SOBRE EDUCACIÓN A DISTANCIA** **Dr. Manuel Aguilar. UAEM** **Imágenes del conocimiento**		
17:45 a 20:00	**Dr. Xavier Soberón** **IBT, UNAM** **La ingeniería genética y sus campos de aplicación: la biocatálisis y la industria química limpia**			

ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

X CONGRESO

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2002 (27 al 30 de agosto de 2002)
Facultad de Medicina, U.N.A.M. Ciudad Universitaria, México.

OBJETIVO:
El Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., tiene como objetivo el que los profesores de Bioquímica y áreas afines de las licenciaturas y posgrados del país tengan un foro en donde puedan compartir sus experiencias, propuestas y trabajos de investigación docente, en un ambiente crítico y académico.

PARTICIPANTES:
Se invita a profesores, instructores de laboratorio y estudiantes de bioquímica y áreas afines, de diferentes carreras de licenciatura y posgrado del país, así como a investigadores de distintas áreas interesados en la enseñanza. Se aceptará un máximo de dos trabajos por ponente.

TEMAS:
Las presentaciones deberán ser incluidas dentro de los siguientes temas:

- Análisis sobre la efectividad y/o aplicación de planes de estudios ya en marcha.
- Aplicación de sistemas de enseñanza mediada por computadora.
- Efectividad de diferentes sistemas de evaluación.
- Estudios poblacionales sobre índices de aprobación y/o deserción.
- Desarrollo de modelos bioquímicos y/o fisiológicos para la docencia.
- Instrumentación y/o innovación de prácticas de laboratorio.
- Otros: experiencia docente, presentación o comentarios de planes de estudio, exámenes y otros instrumentos de evaluación, el uso de técnicas motivacionales y/o material didáctico y juegos empleados en clase, propuestas didácticas de la aplicación de temas de investigación de estudiantes de posgrado.

Los resúmenes deberán ser escritos con letra Times New Roman de 10-12 puntos, con una extensión máxima de una hoja cuartilla, a espacio sencillo y con 2.5 cm de margen por lado. Se deberá especificar: título (a mayúsculas), autores y adscripción, introducción, objetivo, hipótesis y/o justificación, métodos y/o técnicas empleadas, resultados, discusión o aplicación didáctica y conclusiones. El resumen podrá tener un esquema, figura o tabla. Le pedimos cuidar su presentación y ortografía, pues los resúmenes serán publicados en las memorias que se elaborarán en ocasión del X Congreso tal y como se envíen. El original de su trabajo, el cual no deberá tener borrones ni tachaduras, se enviará sin doblar, junto con tres copias por correo postal. No se aceptan envíos por Fax. Se sugiere que la presentación del resumen se apegue al siguiente ejemplo:

INFLUENCIA DE LA EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR SOBRE EL ÍNDICE DE APROBACIÓN DEL CURSO DE BIOQUÍMICA.
(renglón libre)
José Luis Vázquez Esquivel, María Angélica López Fernández, Antonio Martínez Colín. Universidad Independiente de Santa Cruz, Departamento de Evaluación Educativa. México, D.F., 04510, México.
(renglón libre)

RESUMEN....

Favor de enviar hoja de registro, originales del resumen y tres copias de cada uno de ellos a la Sra. Marivel Rojas García, Apartado Postal 70-281, Código postal 04510, México, D. F., MÉXICO.

Fecha límite para la entrega de resúmenes:
21 de junio de 2002.

ORGANIZADORES:

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Correo Electrónico: majo@servidor.unam.mx y majo@bq.unam.mx

M. en C. Patricia V. Torres Durán
Correo Electrónico: pati@bq.unam.mx

M. en C. Alicia Cea Bonilla
Correo Electrónico: aliciac@servidor.unam.mx y acea@bq.unam.mx

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
Apartado Postal 70-159, 04510 México, D. F.
Teléfono: 01(55)5623-2169 y 01(55)5623-2178 y Fax: 01(55)5616-2419

INFORMES:
Marivel Rojas García, Correo Electrónico: beb@bq.unam.mx
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
Apartado Postal 70-281, 04510 México, D. F., Teléfono: 01(55)5623-2170, Fax: 01(55)5616-2419
http://laguna.fmedic.unam.mx

X CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

FORMA DE REGISTRO

DATOS PERSONALES
NOMBRE(S) _____ APELLIDOS _____

MIEMBRO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA:

☐ **SI** ☐ **NO**

NOMBRAMIENTO
TIEMPO COMPLETO _____
MEDIO TIEMPO _____
POR HORAS _____

CARRERA EN LA QUE IMPARTE BIOQUÍMICA O MATERIA AFÍN _____

ADSCRIPCIÓN
UNIVERSIDAD _____
FACULTAD O ESCUELA _____ DEPARTAMENTO _____

DIRECCIÓN
CALLE Y NÚMERO _____
COLONIA _____ CIUDAD _____
ENTIDAD FEDERATIVA _____ CÓDIGO POSTAL (Apartado Postal) _____
TELÉFONO: _____ FAX: _____
CORREO ELECTRÓNICO: _____

TRABAJOS ENVIADOS AL CONGRESO
NÚMERO DE RESÚMENES ENVIADOS: _____

_____ Análisis sobre la efectividad y/o aplicación de planes de estudios ya en marcha
_____ Aplicación de sistemas de enseñanza mediada por computadora
_____ Efectividad de diferentes sistemas de evaluación
_____ Estudios poblacionales sobre índices de aprobación y/o deserción
_____ Desarrollo de modelos bioquímicos y/o fisiológicos para la docencia
_____ Instrumentación y/o innovación de prácticas de laboratorio
_____ OTROS: _____

INVITACIÓN

Estimado Profesor

PRESENTE

Por medio de la presente nos dirigimos a usted para invitarlo a participar en la **Semana de Educación Bioquímica 2002**. Esta actividad se desarrolla anualmente en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en México D.F., y este año estará constituida por el XXIX Taller de Actualización Bioquímica y el X Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Los ponentes en este evento son prestigiados investigadores mexicanos que laboran tanto en Instituciones nacionales como del extranjero y participarán impartiendo una plática de excelencia en español sobre innovadores temas bioquímicos. En esta ocasión, además, un experto impartirá un taller sobre educación a distancia, para aprender a utilizar herramientas novedosas en la enseñanza de nuestra disciplina.

Por otra parte, queremos hacer de su conocimiento que dado que el Taller sobre Educación a Distancia se impartirá en un aula de cómputo, habrá un cupo limitado de participantes, por lo que lo exhortamos a inscribirse a la brevedad posible.

Para consultar el programa, los costos del evento, así como las fechas e información suplementaria, tenemos una página electrónica a su disposición en la siguiente dirección (http://laguna.fmedic.unam.mx/%7Eevazquez/tab/).

Esperando contar con su asistencia a este evento, quedamos de usted

Por el comité organizador

Dr. Edgar Vázquez-Contreras.

e-mail: comitetab@.bq.unam.mx
http://laguna.fmedic.unam.mx/%7Eevazquez/tab/
INFORMES:
Srita. Rosa Ma. López
Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM Tel. 01(55) 56-23-21-75.
Fax: 01(55) 56-16-24-19. HORARIO DE OFICINA.

REB 21(1): 78

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

Nombre completo: _____

Asociado: NUMERARIO ☐ ESTUDIANTE ☐

Cuota cubierta: $300.00 ☐ $150.00 ☐

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 o estado: _____

Código postal: _____

Teléfono: ( ) ____ - ____ - ____

Correo electrónico: _____

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor de la REB y vives fuera de la Ciudad de México, te invitamos a que seas corresponsal de nuestra revista en el sitio donde radiques.

Nos interesa contar con corresponsales adscritos a las Instituciones de Educación Superior en todos los estados de la República, así como en lugares de Centro y Sudamérica, España y otros sitios en donde la REB sea leída.

También nos interesa conocer y publicar las noticias más significativas que en nuestro campo ocurran en los diferentes lugares, ya sean seminarios, cursos, congresos, talleres, publicaciones, etc.

En el documento Normas del Comité Editorial, que es el que nos rige, hay un apartado para esta actividad, mismo que a continuación se transcribe:

5. DE LOS CORRESPONSALES

5. a) Los corresponsales de la REB son profesores y/o investigadores, que sin formar parte del Comité Editorial, coadyuvan en las actividades de la revista. El corresponsal debe ser un miembro sobresaliente de la comunidad académica local o regional. Es deseable un corresponsal en cada una de las Instituciones de Educación Superior de la República Mexicana, Centroamérica, Sudamérica y otras regiones de habla hispana.

5. b) Uno de los editores se encargará de la coordinación de los corresponsales y de la comunicación con ellos para lograr que los objetivos se cumplan. El puesto será rotatorio y se cambiará cada dos o cuatro años, de acuerdo con el Comité Editorial.

5. c) La proposición de corresponsales se hará, mediante documento firmado por cuando menos dos de los editores, que se acompañará con el *Curriculum Vitae* del candidato propuesto.

5. d) La discusión del ingreso de un corresponsal deberá realizarse después de que el Coordinador de Corresponsales haya circulado la información correspondiente y con la asistencia en pleno del Comité Editorial.

5. e) Para ser aceptado, el candidato deberá contar con la aprobación por consenso de los miembros del Comité Editorial.

5. f) En caso de ser admitido, se le hará una invitación formal a la que se anexarán estas normas. Iniciará sus actividades como corresponsal, al recibir el Editor en Jefe la aceptación escrita del candidato.

5. g) El Comité Editorial dará el crédito correspondiente a los corresponsales en la revista en el formato que el propio Comité decida.

5. h) La salida de un corresponsal puede ser por renuncia voluntaria, presentada por escrito, o bien por acuerdo del Comité Editorial, después de la evaluación de sus actividades.

5.1 RESPONSABILIDADES DE LOS CORRESPONSALES

5.1.a) Envío a través del Coordinador de Corresponsales de al menos una contribución propia o de su comunidad al año y de las noticias relevantes de su localidad o región.

5.1.b) Mantenimiento del archivo de los suscriptores de la REB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.

5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución de la REB entre los miembros de su comunidad.

5.1.d) Colaboración en las promociones de financiamiento económico de la revista.

5.1.e) Elaboración y envío anual de un informe de sus labores que a través del Coordinador de Corresponsales se hará llegar al Comité Editorial junto con una crítica a los números correspondientes.

Por favor, dirige tu correspondencia a la Coordinadora de Corresponsales, Comité Editorial de la REB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MÉXICO, o bien al Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.
email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori
Coordinadora de Corresponsales de la REB.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

La REB 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 revisen algunos de los últimos números de esta publicación para que vean estilo, tipos de abreviaturas, etc., así como 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. 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 última 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 1999. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá dársele el crédito correspondiente u obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse así (Fig. X) numerándolas con arábigos. Las tablas siempre llevarán la inicial a mayúscula y se numerarán con romanos.

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, comentarios o erratas de artículos publicados previamente, etcétera.

2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.

3) El trabajo deberá enviarse igual que como se específica 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 en un lapso no mayor de dos meses. 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 a la Revista de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal de la REB en su localidad.