

# REB 2004

---

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la  
**Asociación Mexicana de  
Profesores de Bioquímica, A.C.**

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
UNAM



Facultad de Medicina  
UNAM



Sociedad Mexicana de  
Bioquímica, A.C.

---

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 23

No. 2

JUNIO 2004

# 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

**CARLOS CERVANTES VEGA**  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**SOCORRO CONCEPCIÓN DURÁN VARGAS**  
Instituto Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México

**MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA**  
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

**ROCÍO SALCEDA SACANELLES**  
Instituto de Fisiología Celular  
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

**EVA IRMA VEJAR RIVERA**  
Facultad de Química  
Universidad de Sonora

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

**KATERINA LIRA RÚAN**  
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno  
Universidad Nacional Autónoma de México

**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, C. P. 04510, México, D. F. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de  
Contenido: 8397 No. de expediente 1/432"2"/15792; Reserva al título en derecho de autor No. 04-2002-030616225500-102. Diseño: Ruth Carolina  
Castañeda Cortes; Tiraje 750 ejemplares. Impresión: Departamento de Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM, Distribuidor: Servicio Postal  
Mexicano, Reg. No. PP09-1001; 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 las del Comité Editorial.

## CONTENIDO

### COMITÉ EDITORIAL

### EDITORIAL

LA PILDORA ANTICONCEPTIVA  
DE EMERGENCIA  
Ma. del Carmen Cravioto y Fernando Larrea.....57

### ARTÍCULOS

EL ESPLAICEOSOMA: CORTE Y  
EMPALME DEL PRE-ARNm  
Ernesto Jiménez-García, Juana Virginia  
Tapia-Vieyra y Jaime Mas-Oliva.....59

SMAC/DIABLO Y SU PAPEL EN LA  
REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS  
Moisés Martínez Velázquez , Julio Morán  
Andrade , Vilma Maldonado Lagunas y  
Jorge Meléndez Zajgla.....64

MECANISMOS DE REPLICACIÓN  
DE LOS PLÁSMIDOS BACTERIANOS  
Pedro D. Loeza Lara, Juan J. Valdez Alarcón,  
Victor M. Baizabal Aguirre y Joel E.  
López Meza .....71

### OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO.  
MECANISMO CINÉTICO PROPUESTO PARA  
LA ASPARAGINA SINTETASA A  
Marcela Lilián Varela-Gómez.....79

CRUCIBIOQ.  
BIOENERGÉTICA  
Yolanda Saldaña Balmori.....80

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO  
Marcela Lilián Varela-Gómez.....82

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ  
Yolanda Saldaña Balmori.....84

### CONVOCATORIAS

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....85

XII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN  
MEXICANA DE PROFESORES DE  
BIOQUÍMICA, A.C. ....86

XXI TALLER DE ACTUALIZACIÓN  
BIOQUÍMICA  
Departamento de Bioquímica, Facultad  
de Medicina UNAM.....91

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE  
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....92

INSTRUCCIONES PARA LOS  
COLABORADORES DE LA REVISTA DE  
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....93

# EDITORIAL

## LA PILDORA ANTICONCEPTIVA DE EMERGENCIA

En 2004 se cumplirán 30 años de haberse publicado las primeras experiencias clínicas con la administración poscoital de la formulación de anticonceptivos orales combinados (ACO) que en la actualidad se conoce como píldora anticonceptiva de emergencia (PAE)(1). Coincidentemente, en este mismo año la PAE se incluyó por primera vez en la Norma Oficial Mexicana de los Servicios de Planificación Familiar de nuestro país (2), hecho que originó un importante debate a nivel nacional motivado principalmente por la idea equívoca de que el método actúa induciendo abortos tempranos. En oposición a este concepto hay que señalar que la comunidad científica internacional ha incluido a la PAE dentro de la gama de métodos anticonceptivos que previenen que el embarazo se produzca. Más aún, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha manifestado en forma explícita que la PAE no sería efectiva en aquellas mujeres que la tomaran estando ya embarazadas, aunque tampoco sería de esperar que su administración en dichas condiciones resultara dañina para la salud de la mujer o del producto, o para el desarrollo del embarazo(3). Frente a esta situación quienes durante varios años hemos trabajado en el estudio de los mecanismos de acción de la PAE nos hemos planteado la posibilidad de que la información que nuestra sociedad tiene acerca de PAE (y quizá de otros métodos anticonceptivos) sea insuficiente y por ende dé lugar a confusiones y a debate, innecesario en algunos aspectos. Así, es posible que se confunda con otros métodos que sí son abortifascientes como la mifepristona o RU-486, que no existe en nuestro país, o bien que el solo hecho de que la PAE se administre después del coito lleve a pensar que ésta interrumpirá un embarazo ya establecido. Con el objeto de contribuir en algo al conocimiento general del tema y por ende a la resolución de algunos conflictos, a continuación resumimos la información más relevante acerca de PAE.

Para empezar hay que señalar que en la actualidad existen dos esquemas de PAE. El esquema de Yuzpe, que lleva el nombre del investigador que lo describió por primera vez en 1974, contiene dos hormonas sintéticas que son el etinil-estradiol (EE) y el levonor-

gestrel (LNG). Ambas hormonas son utilizadas en los AOC de uso común, pero en la PAE las dosis requeridas son mayores: 200µg de EE y 100µg de LNG, como dosis total. El segundo esquema de PAE es más nuevo y a diferencia del de Yuzpe no contiene estrógenos, incluye sólo LNG que es la hormona de acción progestacional, a la dosis total 1500µg. En ambas modalidades la dosis total se administra en forma fraccionada en 2 tomas, con intervalo de 12 h. En este punto es importante resaltar que si bien la ventana de administración de la PAE abarca hasta 72 h después del coito, la efectividad es mayor mientras menor sea el tiempo transcurrido entre el coito y la toma de la primera dosis. En un estudio realizado por la OMS se demostró que la efectividad anticonceptiva de los regímenes de LNG solo y Yuzpe o combinado, respectivamente, fue de 95% y 77% cuando la administración se hizo dentro de las primeras 24 h postcoito, 85% y 36% entre 24 y 48 h y 58% y 31% entre 49 y 72 h (4). Por ello el título de “píldora del día siguiente” es inadecuado y puede dar lugar a que erróneamente se difiera el inicio de la PAE hasta un día después del coito.

Otro aspecto que ha preocupado a la sociedad es el relacionado con los efectos secundarios que la PAE puede ocasionar. En el mismo estudio antes citado, la OMS documentó que la náusea y el vómito son los problemas que más frecuentemente se presentan, siendo la frecuencia de náusea de 23.1% y 50.5% y de vómito de 5.6% y 18.8%, para el LNG solo y Yuzpe, respectivamente. Pese a que las dosis de hormonas utilizadas en la PAE son mayores que las que se usan en los AOC regulares no hay evidencias de que la PAE produzca trombosis u otros problemas mayores. Es más, la OMS considera que cualquiera de los dos esquemas puede utilizarse para prevenir el embarazo en mujeres que padecen enfermedades cardiovasculares (3).

Como mencionamos al inicio el punto de mayor interés se refiere al mecanismo de acción de la PAE. En realidad ésta puede actuar a través de varios mecanismos: inhibiendo o retardando la ovulación, alterando varias funciones de los espermatozoides como son su movilidad, su capacidad de trasladarse desde la vagina hasta las trompas de Falopio y

su capacidad de fecundar al óvulo(5). También se ha planteado un tercer mecanismo que implica que la PAE podría actuar a nivel del endometrio, modificando el tejido al grado de que la implantación de un óvulo fecundado (cigoto) no pudiera realizarse. Hay consenso general de que la PAE no tiene efectos post-implantación.

La posibilidad de que la PAE modifique el endometrio impidiendo la implantación constituye el punto medular del debate, ya que bajos criterios no médicos ello podría ser equivalente a aborto. Afortunadamente los estudios más adecuados y recientes, incluyendo los de nuestro grupo, han demostrado que durante la "ventana de implantación" las características histológicas, morfológicas, ultramicroscópicas y bioquímicas del endometrio de mujeres estudiadas antes y después de la administración de la PAE son similares (6-8).

Las evidencias que indican lo contrario provienen de estudios antiguos cuyas limitaciones metodológicas los

hacen inválidos en la actualidad (1). Otro estudio más reciente ha documentado alteraciones importantes, pero utilizando dosis 4-6 veces superiores a las necesarias (9). Por lo tanto consideramos que las evidencias científicas actuales no apoyan el concepto de que la PAE induzca alteraciones endometriales que impidan la implantación del óvulo fecundado, y por lo tanto que los efectos sobre la ovulación y el espermatozoide constituyen sus principales mecanismos de acción. Se requerirán más estudios para ampliar nuestro conocimiento sobre otros posibles mecanismos.

Para concluir mencionaremos que la PAE es un método cuyo uso correcto e informado permitirá mejorar la calidad de los servicios de planificación familiar.

Ma. del Carmen Cravioto y Fernando Larrea  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
"Salvador Zubirán"

#### REFERENCIAS

1. Yuzpe A A, Thurlow H J, Ramzy I y Leyshon J I (1974) Post coital contraception pilot study. *J Reprod Med*; 13: 53-58.
2. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana de los Servicios de Planificación. NOM-002 SSA2 1993.
3. Department of Reproductive Health and Research. Medical eligibility criteria for the initiation and continuation of contraceptive methods. [Http://www.who.int/reproductive-health/publications/World Health Organization](http://www.who.int/reproductive-health/publications/World Health Organization).
4. Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation (1998) Randomized controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. *Lancet* 352: 428-433.
5. Croxatto H B, Ortiz M E y Müller A L (2003) Mechanisms of action of emergency contraception. *Steroids* 68:1095-1098
6. Raymond E G, Lovely L P, Chen-Mok M, Seppala M, Kurman R J, Lessey B A. (2000) Effect of the Yuzpe regimen of emergency contraception on markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 15:2351-2355
7. Durand M, Cravioto M C, Raymond E G, Durán-Sánchez O, Cruz-Hinojosa M L, Castell-Rodríguez A, Shiavon R y Larrea F. (2001) On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 64: 227 - 234.
8. Marions L, Hultenby K, Lindell I, Sun X, Stabi B y Gemzell Danielsson K. (2002) Emergency contraception with mifepristone and levonorgestrel: mechanism of action. *Obstet Gynecol* 100:65 - 71.
9. Ugocsai G, Rozsa M y Ugocsai P (2002) Scanning electron microscopic (SEM) changes of the endometrium in women taking high doses of levonorgestrel as emergency postcoital contraception. *Contraception* 66:433 - 437.

# EL ESPLAICEOSOMA: CORTE Y EMPALME DEL Pre-ARNm\*

ERNESTO JIMÉNEZ-GARCÍA, JUANA VIRGINIA TAPIA-VIEYRA Y JAIME MAS-OLIVA

## RESUMEN

El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) eucariota se transcribe íntegramente del gen estructural como precursor del ARNm, para después sufrir algunas modificaciones. En su extremo 5' se adiciona el grupo 7-metilguanosa trifosfato (Cap) y al extremo 3' se agrega un polinucleótido de adenina llamado "cola de adenina". Después se eliminan los intrones, los exones que los flanquean se unen para generar el ARNm maduro. Este proceso recibe el nombre de corte y empalme (splicing), el cual es catalizado por el esplaiceosoma o empalmosoma, un complejo formado por cinco ARNs nucleares pequeños (ARNsn): U1, U2, U4, U5, U6, y varias proteínas denominadas factores de corte y empalme. Las secuencias consenso en el ARNm son reconocidas por estos componentes y el complejo se ensambla para intervenir eficientemente en el proceso. Este ensamblaje es muy importante ya que puede afectarse por mutaciones en los genes que codifican sus componentes proteicos. Este es el caso observado con alteraciones en los factores de procesamiento del pre-ARNm PRP3, PRP8 y PRP31 las cuales, por ejemplo, pueden ocasionar el desarrollo de enfermedades como la retinitis pigmentosa.

**PALABRAS CLAVE:** ARNm, reacción de corte y

**ABREVIATURAS:** mRNA, ácido ribonucleico mensajero; Cap, guanosintrifosfato; snRNA, ácido ribonucleico nuclear pequeño; PRP, factor de procesamiento del pre-mRNA.

## ABSTRACT

Formation of eukaryotic messenger ribonucleic acid (mRNA) starts with the transcription of the whole structural gene, including introns and exons forming a pre-mRNA. This pre-mRNA is modified in its 5' and 3' ends, its introns eliminated and exons joined in order to generate a mature mRNA. This process is known as splicing and it is catalyzed by the spliceosome, a complex formed by five small nuclear RNAs: U1, U2, U4, U5, U6 and several proteins known as splicing factors. In order for this reaction to take place, the consensus sequences have to be recognized by these elements and the complex is assembled. The assembly of the spliceosome may be affected by mutations in the genes coding for protein components that constitute the complex. This is the case with mutations of the processing factors: PRP3, PRP8 and PRP31 which for instance might lead to the development of retinitis pigmentosa.

**KEY WORDS:** mRNA, splicing reaction, spliceosome, introns, exons.

## INTRODUCCIÓN

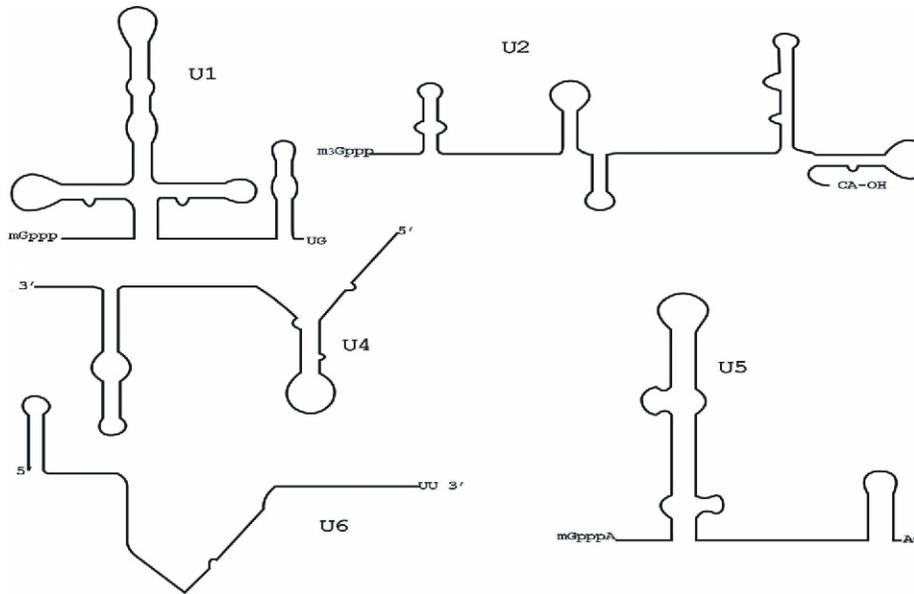
La producción del ARNm involucra dos etapas: la transcripción íntegramente del gen estructural y su posterior procesamiento para generar al ARNm maduro. Esto último implica modificaciones del pre-ARNm, las cuales consisten en la adición en el extremo 5' de la 7-metilguanosa trifosfato denominado Cap, la que es una modificación esencial para la unión al ribosoma del extremo 5' del ARNm, paso inicial durante la traducción. La mayor parte

de las veces el pre-ARNm se modifica en su extremo 3' por la adición de una secuencia de aproximadamente 50 a 250 nucleótidos de adenina llamada cola de poli(A), lo que constituye el extremo 3' del ARNm maduro.

La mayoría de los genes de eucariotes contienen secuencias codificantes o exones y secuencias intercaladas no codificantes o intrones. Las regiones del pre-ARNm correspondientes a los intrones son eliminados en el núcleo durante el proceso de maduración; una vez formado el ARNm maduro se

transporta al citoplasma en donde participa en la traducción. La eliminación de las secuencias intercaladas o intrones del pre-ARNm se realiza por el proceso de corte y empalme (splicing), paso esencial en la expresión de los genes de eucariotes (1). En primer término, se eliminan los intrones escindiéndolos del pre-ARNm; posteriormente, se unen los exones para dar lugar a un ARNm maduro. Químicamente el proceso de corte y empalme consiste en dos reacciones sucesivas de trans-

\* Recibido: 20 abril 2004    Aceptado: 28 mayo 2004



**Figura 1.** Arreglo estructural de los ARNs nucleares pequeños (ARNsn) U1- U6, que forman el esplaiceosoma.

esterificación (2-4). Esta reacción de corte y empalme es dependiente de la hidrólisis de ATP y es catalizada por un gran complejo de ribonucleoproteínas llamado esplaiceosoma o empalmosoma. Este está formado por cinco ARNs nucleares pequeños (ARNsn), los cuales han sido denominados U1, U2, U4, U5 y U6, debido a que estas secuencias son ricas en uridina, junto con un grupo adicional de factores de corte y empalme (2, 5, 6) constituido por una serie de proteínas necesarias en el adecuado ensamblaje del esplaiceosoma (7). El ARNsn U3 participa en el procesamiento del ARN ribosomal (8). Algunas mutaciones descritas en los genes que codifican factores de corte y empalme han sido asociadas al desarrollo de diferentes enfermedades (7).

## COMPOSICIÓN DEL ESPLAICEOSOMA

### Los ácidos ribonucleicos nucleares pequeños

Los ARNsn son moléculas relativamente estables que están presentes en el núcleo eucariota, tienen un tamaño variable de entre 60 y 300 nucleótidos, y poseen una estructura poco usual trimetilada en la región 5' terminal

(Fig. 1). Estas secuencias de nucleótidos específicas son transcritas del ADN por diferentes ARN polimerasas; por ejemplo, el ARNsn U6 es transcrito por la ARN polimerasa III, mientras que los ARNsn U1, U2, U4 y U5 son transcritos por la ARN polimerasa II (9).

### Los factores de corte y empalme

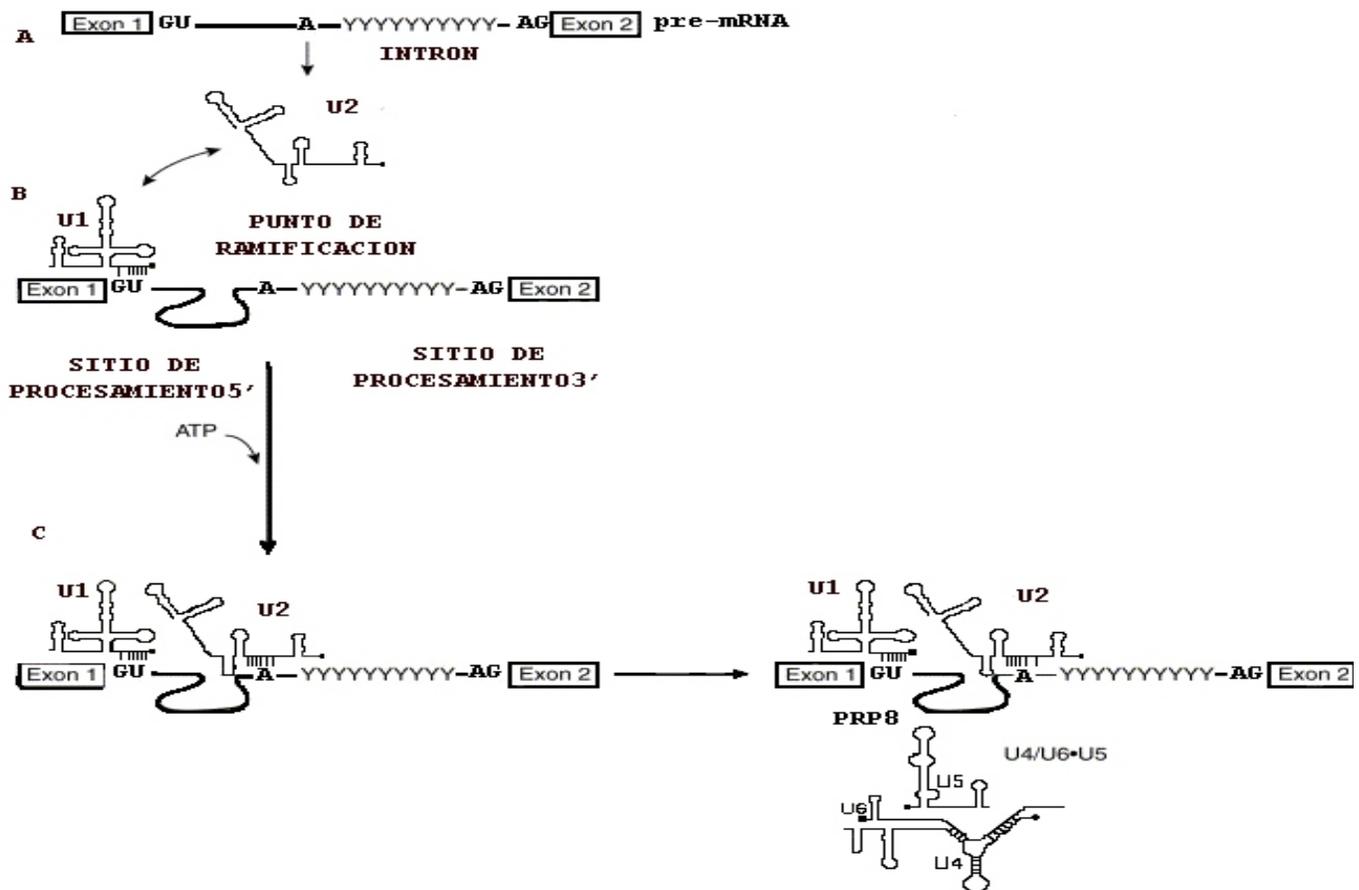
El ensamblado del esplaiceosoma no sólo involucra a estos cinco ARNsn sino que también está relacionado con más de 150 proteínas conocidas (2-4) (Tabla I), clave en el ensamblado del esplaiceosoma y de entre las cuales destaca la molécula PRP8. Esta proteína es altamente conservada en los eucariotes, presenta una secuencia de 2300 residuos de aminoácidos, que se muestra específicamente asociada a los ARNsn U4, U5 y U6 (10, 11). PRP8 interactúa con el pre-ARNm en los sitios 5' y 3' del exón para efectuar la unión entre los exones (2, 9). La importancia de PRP8 se dilucidó mediante experimentos de inactivación por calor y por reconocimiento con anticuerpos específicos, eventos que eliminan la función de PRP8 *in vitro*, corroborando su requerimiento para la formación estable del complejo constituido por los ARNsn U4, U5 y U6. Además la ausencia de PRP8 *in vivo* provoca una disminución en los niveles de U4, U5 y U6 (12-14). Más aún, la proteína PRP8 ha sido involucrada en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans* (15). La alteración de su estructura molecular puede ser causa de algunas enfermedades en humanos como la retinitis pigmentosa, relacionada con

**TABLA I**

### ALGUNAS PROTEÍNAS COMPONENTES DEL ESPLAICEOSOMA DE LEVADURA.

U1	U2	U4	U5	U6	U4/U6	U4/U5/U6
Sm B-G 70K/Snp1	Sm B-G A'/Lea1	Sm B-G <b>Prp3</b>	Sm B-G Dib1/Snu16	Lsm 2-8 Prp24	Prp6 <sup>a</sup> <b>Prp31<sup>a</sup></b>	Prp38 <sup>a</sup> Snu23 <sup>a</sup>
A/Mud1 C/Yhc1 Luc7	B"/Yib9/Msl1 Cus1 Cus2	Prp4 Snu13	<b>Prp8</b> Prp28 Prp44/Brr2			Snu 66 <sup>a</sup> Spp381 <sup>a</sup> (Prp18) <sup>a</sup>
Nam8/Mud15 Prp39 Prp40	Hsh49 Hsh155 Prp9		Snu40 Snu114			
Prp42/Mud16	Prp11					
Snu56/Mud10 Snu71	Prp21 Rse1 Snu17					

<sup>a</sup> Estas proteínas sólo son encontradas formando estos complejos. Negritas: proteínas implicadas en algunas enfermedades. Tomada de referencia 14.



**Figura 2.** Ensamblado del esplaiceosoma. A) pre-ARNm, B) Reconocimiento de los sitios de procesamiento 5' y el punto de ramificación por U1 y U2, respectivamente, C) Asociación de (U4/U5/U6) al pre-ARNm, formando así el esplaiceosoma completo.

mutaciones en el exón 42 del gen que codifica a PRP8 (7).

## FORMACIÓN DEL ESPLAICEOSOMA

El procesamiento del pre-ARNm durante la formación del esplaiceosoma involucra por cada sitio dos exones; exón-1 y exón-2, los cuales son interrumpidos por un intrón (Fig. 2A). El esplaiceosoma es inicialmente formado por la interacción del ARNsn U1 con el sitio de procesamiento 5' del exón 1 del pre-ARNm, seguido por el reconocimiento del punto de ramificación en el intrón del pre-ARNm por el ARNsn U2, formando el pre-esplaiceosoma (Fig. 2B). Este es finalmente armado por la subsiguiente asociación de los ARNsns U4, U6 y U5, formando así un esplaiceosoma maduro (8, 16-18) (Fig. 2C).

De esta forma, la unión de U1 y U4 se desestabiliza y el esplaiceosoma es activado para llevar a cabo su catálisis (17).

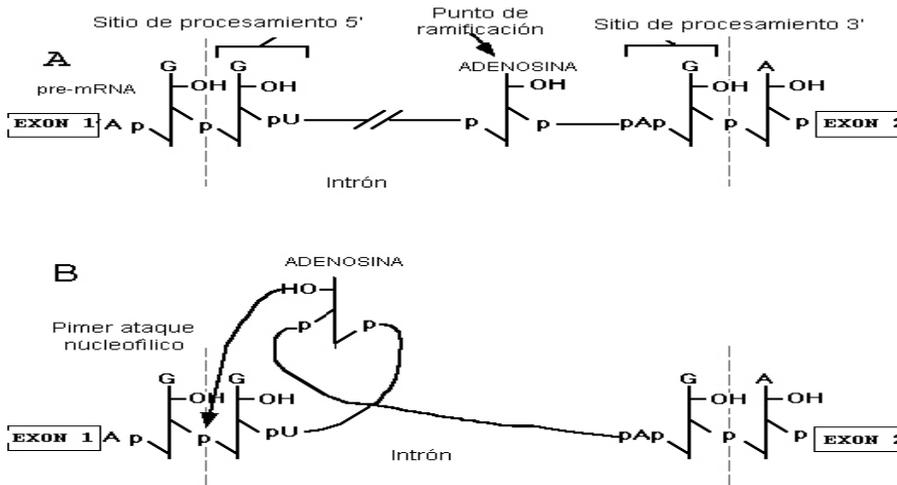
Estudios *in vitro* realizados con sustratos sintéticos del pre-ARNm marcados radioactivamente e incubados con extractos de células HeLa, demuestran que los intrones son eliminados del pre-ARNm en dos pasos distintos, en los cuales intervienen un sitio de procesamiento 5', un sitio de ramificación y un sitio de procesamiento 3' (8) (Fig. 3A). La reacción, que es iniciada por un ataque nucleofílico (Fig. 3B), conocida como una sustitución nucleofílica 2 (SN2) del grupo OH de la posición 2' de una adenosina que se encuentra en la secuencia del intrón, conocida como sitio de ramificación sobre el enlace fosfodiéster que une al exón-1 en la posición 5' del intrón, también

llamado sitio de procesamiento 5'. Esto resulta en la liberación del exón-1 y la formación de un intermediario en forma de lazo, el intrón 3'-exón-2. El siguiente paso de la reacción se lleva a cabo con un segundo ataque nucleofílico del 3' OH del exón libre (exón 5') sobre el enlace fosfodiéster del exón 3', conocido como sitio de procesamiento 3' (Fig. 3C), dando como resultado la liberación del intrón y la unión de los dos exones (5, 9,14) (Fig. 3D).

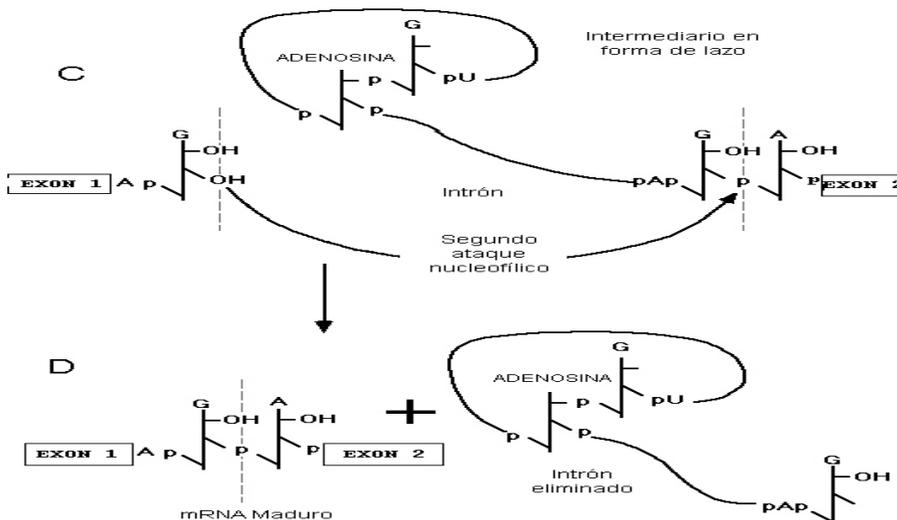
## Reconocimiento del sitio de procesamiento 5' por los ARNsns

El reconocimiento del sitio de procesamiento 5' por U1 está dado en la primera porción del intrón, donde el ARNsn U1 contiene una

### Primera reacción de trans-esterificación



### Segunda reacción de trans-esterificación



**Figura 3.** Reacciones de trans-esterificación que intervienen en el corte y empalme del pre-ARNm. A) Se muestra el pre-ARNm y los sitios de corte y empalme. B) Primer ataque nucleofílico en la región 5' del exón por parte del OH de la adenosina que forma parte del sitio de procesamiento 5'. C) Segundo ataque nucleofílico en la región 3' del exón que forma parte del intermediario en forma de lazo, por parte del OH del exón cortado en la primera reacción. D) Se muestran los dos exones unidos formando de esta forma el ARNm maduro, siendo eliminando el intrón.

secuencia que es complementaria a este sitio (Fig. 2B). Este apareamiento involucra los primeros seis nucleótidos del intrón (8). A continuación, el ARNsn U2 se une al punto de ramificación del intrón (Fig. 2C). La consiguiente asociación entre U1 y U2 favorece el acercamiento entre los sitios de procesamiento 5' y 3' del pre-ARNm. La asociación de U2 con el pre-ARNm es independiente de ATP y requiere una conformación específica

de esta molécula.

El ensamblaje previo de las tres moléculas U4, U5 y U6 para que el esplaiceosoma se complete, se lleva a cabo mediante un apareamiento extensivo de aproximadamente 20 bases entre los ARNsn U4 y U6.

La función del ARNsn U5 en el esplaiceosoma ha sido gradualmente esclarecida con una convergencia de datos genéticos y bioquímicos provenientes de varios sistemas. Una

comparación filogenética nos revela que U5 contiene una secuencia invariable de nueve nucleótidos dispuestos en un lazo de 11 nucleótidos. Algunos datos genéticos y bioquímicos en células de mamífero y levaduras dan lugar a un modelo funcional para ARNsn U5, en el cual uno de sus lazos interactúa con secuencias del exón en el sitio de procesamiento 5' y 3'. Los datos muestran que los contactos existentes entre U5 y la parte 5' del exón-1 son estables en el pre-ARNm y persisten a través de ambos pasos catalíticos (18). Una vez incorporados los cinco ARNsn, se completa el esplaiceosoma, sin embargo, para que éste tenga actividad catalítica, aún debe sufrir varios cambios conformacionales (5). Uno de ellos es la interrupción de la interacción U4-U6 y una secuencia motivo en U6 sustituye a U1 en el sitio de procesamiento 5'. La ruptura del apareamiento entre U4 y U6 permite la activación catalítica de este último, determinando así la primera fase del corte y empalme. De esta manera ARNsn U4 actúa como un inhibidor que protege a U6 hasta que estén alineados los centros específicos de empalme. A continuación, U6 es liberado de U4 y se aparea con las secuencias conservadas del intrón en el sitio de procesamiento 5'. Posteriormente U6 queda apareado con U2, el cual a su vez está apareado con el punto de ramificación del intrón. Probablemente, los ARNsn U2 y U6 forman el centro catalítico del esplaiceosoma (18).

### CONCLUSIONES

La mayoría de los genes de eucariotes consisten en una secuencia de ADN cuyo propósito es el de codificar para una proteína. Sin embargo, existen casos en los que una secuencia simple de ADN codifica para más de una proteína, esto implica el solapamiento de genes para la generación de proteínas funcionales. Para que lo anterior se lleve a cabo, se requiere del corte de intrones y empalme de exones. Este proceso es llamado constitutivo cuando se mantiene el

mismo sitio de corte y empalme para una secuencia determinada y se produce sólo una proteína, y alternativo cuando el corte y empalme se lleva a cabo en diferentes sitios a tiempos distintos en una misma secuencia de un gen, produciendo una familia de proteínas. Para que este proceso de corte y empalme se lleve a cabo se

requiere de la formación del esplai-ceosoma, por lo que se ha hecho hincapié en la importancia de la formación de este complejo dinámico, necesario para la maduración del pre-ARNm y de sus propios factores de corte y empalme. Uno de estos factores es la proteína PRP8, importante en la estabilización del centro

catalítico del esplai-ceosoma. El estudio de los diferentes factores de procesamiento del pre-ARNm sin duda permitirá la identificación de los diferentes sitios de regulación de la expresión génica, lo que será de gran utilidad en el estudio de desórdenes relacionados, por ejemplo, con la proliferación celular.

## REFERENCIAS

- Luo H R, Moreau G A, Levin N, Moore M J (1999) The human Prp8 protein is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes. *RNA* 5: 893-908.
- Jurica M S, Moore J M (2002) Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* 28: 336-345.
- Collins C A, Guthrie C (2000) The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol* 7: 850-854.
- Nagai K, Muto Y, Pomeranz D A, Kambach C, Ignjatovic T, Walke S, Kuglstatter A (2001) Structure and assembly of the spliceosomal snRNPs. *Biochem Soc Trans* 29: 15-26.
- Hamm J, Lamond A I (1998) Spliceosome assembly: The unwinding role of DEAD- box proteins. *Curr Biol* 8: 532-534.
- Maniatis T, Reed R (1987) The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 325: 673-678.
- Jurica MS, Moore J M (2003) Pre mRNA splicing: Awash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12: 5-14.
- Takahashi A, Muramatsu H, Takagi S, Fujisawa H, Miyake Y, Muramatsu T (2001) A splicing factor, Prp8: preferential localization in the testis and ovary in adult mice. *J Biochem (Tokyo)* 129: 599-606.
- Mougin A, Torterotot F, Branlant C, Jacobson M R, Huang Q, Pederson T (2002) A 3'-terminal minihelix in the precursor of human spliceosomal U2 small nuclear RNA. *J Biol Chem* 277:23137-23142.
- Lossky M, Anderson G J, Jackson S P, Beggs J D (1987) Identification of a yeast snRNP protein and detection of snRNP-snRNP interactions. *Cell* 51: 1019-1026.
- Pinto A L, Steitz J A (1989) The mammalian analogue of the yeast PRP8 splicing protein is present in the U4/5/6 small nuclear ribonucleoprotein particle and the spliceosome. *PNAS-USA* 86: 8742-8746
- Lin R J, Newman A J, Cheng S C, Abelson J, (1985) Yeast mRNA splicing in vitro. *J Biol Chem* 260:14780-14792.
- Brown J D, Beggs J D (1992) Roles of PRP8 protein in assembly of splicing complexes. *EMBO J.* 11:3721-3729.
- Brow D A (2002) Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36: 333-360.
- Achsel T, Ahrens K, Brahm H, Teigelkamp S, Luhrmann R (1998) The human U5-220kD protein (hPrp8) forms a stable RNA-free complex with several U5-specific proteins, including an RNA unwindase, a homologue of ribosomal elongation factor EF-2, and a novel WD-40 protein. *Mol Cell Biol* 18: 6756-6766.
- Krämer A (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* 65: 367-409.
- Teigelkamp S, Newman A J y Beggs J D (1995) Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J* 14: 2602-2612.
- Newman A J (1997) The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing. *EMBO J* 16: 5797-5800.

# SMAC/DIABLO Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS\*

MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ<sup>1</sup>, JULIO MORÁN ANDRADE<sup>2</sup>,  
VILMA MALDONADO LAGUNAS<sup>1</sup> Y JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA<sup>1</sup>

## RESUMEN

La apoptosis juega un papel central en el desarrollo y homeostasis de todos los organismos multicelulares. Este proceso es iniciado tanto por la vía extrínseca como por la vía intrínseca. Estas vías inducen finalmente actividades proteolítica y/o nucleolítica asociadas a la muerte celular. Durante la apoptosis la actividad proteolítica es efectuada por miembros de la familia de las caspasas, las cuales cortan múltiples sustratos celulares. Esta actividad está sujeta a la inhibición por los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis. La inhibición de la actividad de las caspasas mediada por las proteínas inhibidoras de apoptosis es removida por la proteína proapoptótica Smac/Diablo. Hasta el momento se han descrito cuatro isoformas de Smac/Diablo, generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero; dos citosólicas y dos mitocondriales. Estas últimas se liberan de la mitocondria al citosol después de un estímulo apoptótico. Smac/Diablo utiliza su extremo N-terminal para interactuar con las proteínas inhibidoras de apoptosis e inhibir su función. El objetivo de este artículo es presentar la información más relevante con respecto a los mecanismos de regulación conocidos para Smac/Diablo, así como sus implicaciones terapéuticas al actuar como sensibilizador de apoptosis.

**PALABRAS CLAVE:** Smac/Diablo, caspasas, proteínas inhibidoras de apoptosis, apoptosis.

## ABSTRACT

Apoptosis plays a central role in the development and homeostasis of all multicellular organisms. Apoptotic cell death is triggered by extrinsic, receptor-mediated, or intrinsic, mitochondria-mediated, signaling pathways that induce death-associated proteolytic and/or nucleolytic activities. The mechanism of apoptosis is executed by a family of cysteine proteases that cleave after an Asp residue in their substrates, hence the name caspase. Caspases are synthesized as latent proenzymes; once activated they cleave a wide range of molecules that eventually result in the dismantlement of cells. Active caspases can be specifically inhibited by the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). IAP proteins are counteracted by Smac/Diablo. Four Smac/Diablo isoforms generated by alternative splicing have been described so far. Upon receiving proapoptotic signals, Smac/Diablo is released from mitochondria into the cytosol where it interacts with IAPs and abrogates their caspase-inhibitory activity. Smac/Diablo interacts with IAPs *via* its N-terminal IAP-binding motif. This motif is indispensable and sufficient for counteracting IAP's inhibition of caspases. The aim of this paper is to review the most outstanding knowledge regarding to several known regulatory aspects for Smac/Diablo, as well as its potential therapeutic implications by acting as apoptotic sensitizer.

**KEY WORDS:** Smac/Diablo, caspases, IAPs, apoptosis.

## INTRODUCCIÓN

La apoptosis juega un papel central en el desarrollo y homeostasis de todos los organismos multicelulares (1). Se presenta en procesos tan diversos como la embriogénesis, el recambio normal en tejidos adultos y en la atrofia de órganos. Este proceso es también fundamental para la regulación y operación de

procesos fisiopatológicos como la respuesta inmune, la inflamación y la eliminación de células que presentan alteraciones genéticas. En los humanos, la apoptosis excesiva o insuficiente puede tener severas consecuencias patológicas. La supresión de la maquinaria apoptótica causa enfermedades autoinmunes y es un sello caracte-

rístico en el cáncer (2). Por otra parte, la apoptosis en exceso contribuye al desarrollo de enfermedades neurológicas y al SIDA (3).

La capacidad de una célula para experimentar apoptosis en respuesta a una señal de muerte, está relacionada con su estado proliferativo, posición dentro del ciclo

\* Recibido: 13 abril 2004    Aceptado: 28 mayo 2004

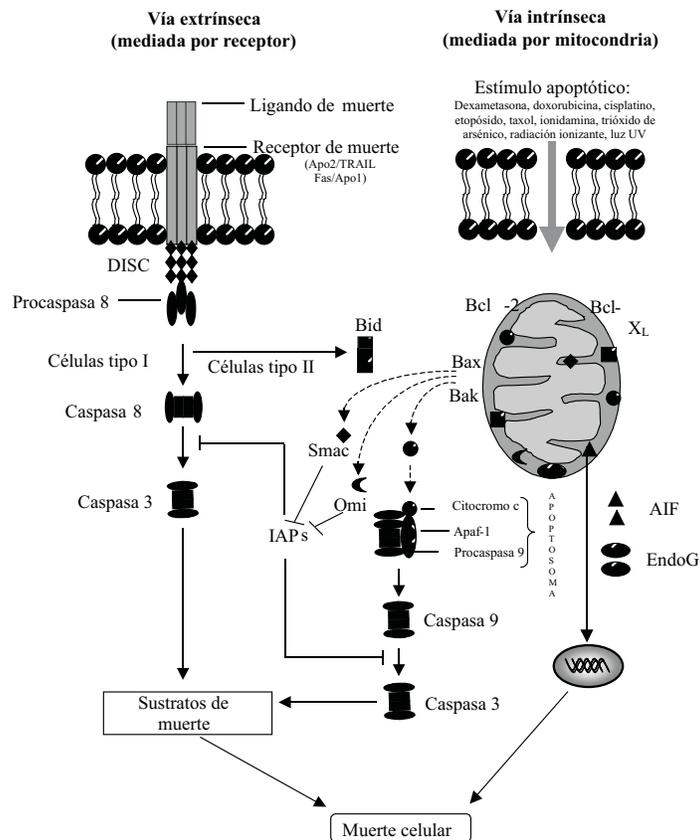
<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando 22, Tlalpan, 14080, D.F., México. Tel. (+52)(55) 56280439. Fax: (52)(55) 56280432. Correo E: moyocoyo\_98@yahoo.com, vilaml@yahoo.com, jorgezajgla@hotmail.com. <sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F. Tel. (52-55) 56225616. Fax: (52-55) 56162282 Correo E: jmoran@ifisiol.unam.mx.

celular, tipo celular, estímulo apoptótico y la expresión de varios factores que modulan el programa de muerte. Debido a esto, el tiempo de inicio de la apoptosis es variable. Sin embargo, una vez activada, los cambios celulares observados son rápidos, con duración de minutos. En la apoptosis ocurren cambios coordinados en el núcleo, el citoplasma y la superficie celular (4). Las células pierden contacto con sus vecinas y adquieren una forma redondeada. Posteriormente se presenta una pérdida de volumen, debida a la salida de agua e iones, con la consecuente compactación de los organelos y el aumento en la densidad celular. El núcleo se condensa y la cromatina se concentra en la membrana nuclear. A continuación, en la superficie celular se forman protuberancias y el núcleo se rompe en varios fragmentos que conservan la membrana íntegra y la célula se fragmenta en múltiples cuerpos apoptóticos, los cuales contienen a los organelos intactos. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas o por macrófagos, sin generar una reacción inflamatoria en el organismo (5).

La muerte celular apoptótica es iniciada tanto por la vía extrínseca (mediada por un receptor), como por la vía intrínseca (mediada por las mitocondrias). En la vía de receptor de muerte, los receptores como TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 o DR-5, interactúan con sus respectivos ligandos. Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas. En la vía mitocondrial, una señal determinada de muerte (tal como drogas antineoplásicas, luz UV, radiación ionizante, etc.) induce la liberación del citocromo c del

espacio intermembranal de la mitocondria. El citocromo c liberado se une a Apaf-1 para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa-9. La caspasa 9 activada a su vez activa a las procaspasas 3 y 7. Aunque estas vías pueden activarse de manera independiente, puede existir una intercomunicación entre ellas. La caspasa 8 que participa en la vía de receptor de muerte, puede cortar a Bid, un miembro proapoptótico de la

familia de Bcl-2. Bid cortado se transloca del citosol a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol. De esta manera se conectan las vías extrínseca e intrínseca. La actividad proteolítica de las caspasas proporciona las bases bioquímicas para el fenotipo apoptótico (Fig. 1).



**Figura 1. Vías de muerte celular.** En la vía extrínseca (mediada por receptor) la unión de un ligando a su receptor de muerte es seguida por la formación del DISC (complejo de señalización inducible por muerte), lo que resulta en la activación de la procaspasa 8. En las células tipo I la caspasa 8 activa a la procaspasa 3, la cual corta a proteínas blanco, conduciendo a apoptosis. En las células tipo II, la caspasa 8 corta a Bid, el cual induce la translocación, oligomerización e inserción de Bax y/o Bak en la membrana externa mitocondrial. Esto es seguido por la liberación de varias proteínas del espacio intermembranal mitocondrial, incluyendo a Smac/Diablo, Omi y citocromo c. Este último forma un complejo citosólico (apoptosoma) con Apaf-1 y la procaspasa 9. Esto resulta en la activación de la procaspasa 9, la cual activa a la procaspasa 3. En la vía intrínseca (mediada por mitocondria), las señales de muerte inciden directa o indirectamente en la mitocondria, resultando en la formación del apoptosoma. Esta vía de muerte celular es controlada por proteínas de la familia de Bcl-2. La vía intrínseca puede funcionar a través de mecanismos independientes de caspasas, implicando la liberación desde la mitocondria y la translocación hacia el núcleo de AIF y endonucleasa G. Se ha comprobado que todos los estímulos apoptóticos mostrados inducen la liberación de Smac/Diablo de la mitocondria.

## CASPASAS

La apoptosis es un proceso conservado en la evolución que es ejecutado por una familia de proteasas de cisteína (caspasas), las cuales cortan después de un residuo de ácido aspártico contenido en sus sustratos. En mamíferos se han identificado catorce caspasas, de las cuales al menos ocho participan en la regulación del proceso apoptótico (6). Las caspasas implicadas en la apoptosis se dividen generalmente en dos categorías: las caspasas iniciadoras, que incluyen a la caspasa 2, 8, 9 y 10, y las caspasas efectoras, que incluyen a la caspasa 3, 6 y 7. Una caspasa iniciadora se caracteriza por tener un prodominio N-terminal extendido (>90 aminoácidos) importante para su activación, mientras que una caspasa efectora contiene de 20-30 residuos en la secuencia del prodominio. Todas las caspasas se producen en las células como zimógenos catalíticamente inactivos y deben experimentar activación proteolítica durante la apoptosis. La activación de una caspasa efectora es realizada por una caspasa iniciadora a través del corte en un residuo específico interno de Asp que separa a la subunidad grande de la pequeña. En cambio, las caspasas iniciadoras son autoactivadas. Estas últimas contienen invariablemente uno de dos dominios de interacción proteína-proteína: el CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) o el DED (dominio efector de muerte). Estos dominios interactúan con dominios similares presentes en proteínas adaptadoras oligomerizadas y de esta manera se reclutan caspasas iniciadoras que al estar en estrecho contacto unas con otras facilitan su autoactivación (6). Una vez activadas, las caspasas efectoras son responsa-

bles del corte proteolítico de un amplio espectro de blancos celulares, conduciendo finalmente a la muerte celular. Los sustratos celulares conocidos incluyen componentes estructurales (como actina y la lámina nuclear), proteínas regulatorias (como la DNA-PK (proteína cinasa activada por DNA)), inhibidores de desoxirribonucleasa (como ICAD (inhibidor de la DNAsa activada por caspasa)) y otras proteínas proapoptóticas y caspasas.

## PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE APOPTOSIS (IAPs)

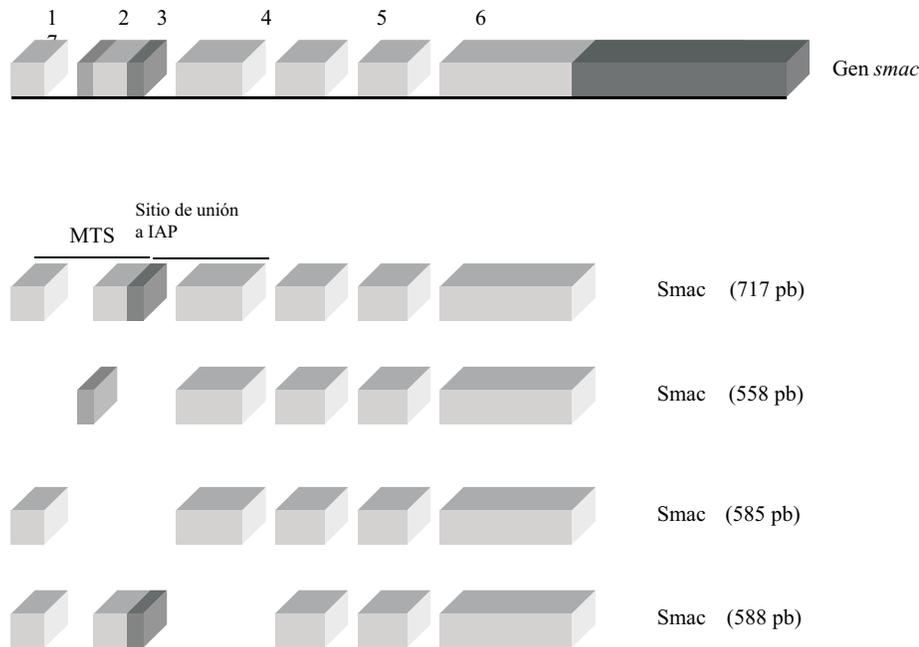
La actividad de las caspasas está sujeta a la inhibición por los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) (7). Las IAPs fueron originalmente identificadas en baculovirus por su capacidad de suprimir la apoptosis en células infectadas del hospedero. Se ha sugerido que la acción de estas moléculas ocurre por medio de una interacción directa con las caspasas. En mamíferos se han identificado ocho distintas IAPs, siendo las más estudiadas la XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivina y ML-IAP/Livina. La unidad funcional en las IAPs es el repetido IAP baculoviral (BIR por Baculoviral IAP Repeat), el cual contiene ~80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen tres dominios BIR cada una, exhibiendo cada dominio funciones diferentes. En estas IAPs el dominio BIR3 inhibe potentemente la actividad de la caspasa 9 procesada, mientras que la región de unión entre los dominios BIR1 y BIR2 inhibe selectivamente a las caspasas 3 y 7 (8).

## SMAC/DIABLO Y SUS

## ISOFORMAS

La inhibición de las caspasas mediada por las IAPs es removida por la proteína proapoptótica Smac/Diablo, lo que conduce a la apoptosis. Esta proteína fue descubierta paralelamente por dos grupos de investigación. Por una parte, Du *et al* (9) aislaron una fracción a partir de extractos de membrana mitocondrial de células HeLa, relacionada con la activación de caspasa 3. De esta fracción purificaron una proteína de aproximadamente 25 kDa que denominaron Smac (del inglés second mitochondria-derived activator of caspase). Por otro lado, Verhagen *et al* (10), mediante ensayos de coimmunoprecipitación con XIAP-Flag transfectada en células 293T, aislaron una proteína de 23 kDa con un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 5.3 que se unía a la XIAP. La secuencia peptídica de esta proteína fue usada para hacer una búsqueda en la base de datos de secuencias expresadas de DNA, ESTs (del inglés Expressed Sequence Tag) y se encontró un alineamiento idéntico con secuencias de humano y de ratón. La clona de cDNA EST de ratón elegida codificaba una proteína de 26.8 kDa, la cual fue nombrada Diablo (del inglés direct IAP binding protein with low pI).

Smac/Diablo se expresa de manera diferencial en varios tejidos de humano adulto. Presenta una expresión elevada en testículo, corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario y una baja expresión en cerebro, pulmón, timo y leucocitos. Diablo/Smac presenta un patrón similar de expresión en tejidos de ratón adulto. Este patrón de expresión diferencial sugiere que Smac/Diablo se encuentra bajo



**Figura 2.** Estructura del gen *smac/diablo* y las diferentes isoformas generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero. El gen *smac/diablo* presenta siete exones. El exón 2 es un exón críptico que permite la generación de la isoforma . La MTS (señal de localización mitocondrial) es codificada por los exones 1 y 3. *Smac/Diablo* y son mitocondriales (presentan una MTS intacta), mientras que *Smac/Diablo* y son citosólicas (no tienen MTS).

control transcripcional en los diferentes tejidos del organismo.

El RNA mensajero de Smac/Diablo codifica una proteína de 239 aminoácidos. La región amino terminal (55 aminoácidos) representa una típica señal anfipática de localización mitocondrial (MTS), la cual es cortada una vez que Smac/Diablo se importa a la mitocondria. En condiciones normales Smac/Diablo reside en el espacio intermembranal. Después de un estímulo apoptótico (dexametasona, radiación ionizante, luz UV, Apo2L/TRAIL, Fas/Apo1, doxorubicina, cisplatino, etopósido, taxol, ionidamina, trióxido de arsénico), Smac/Diablo se libera de la mitocondria al citosol, en donde se une a varias IAPs, antagonizando su función. Se sabe que Smac/Diablo puede interactuar con XIAP, c-IAP1, cIAP2, survivina y la IAP baculoviral OpIAP. Sólo la proteína Smac/Diablo

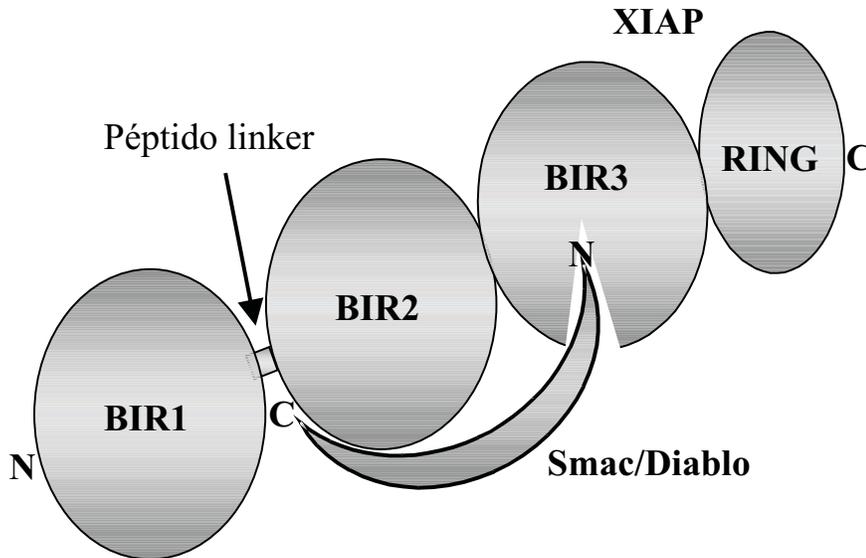
madura tiene la capacidad de promover la activación de caspasas, mientras que el precursor con la señal de localización mitocondrial no posee tal capacidad. Smac/Diablo por lo tanto requiere de un proceso de maduración dentro de la mitocondria antes de presentar su actividad apoptótica (9).

El gen *smac/diablo* se localiza en el humano en el cromosoma 12q y está compuesto de siete exones. Han sido reportadas cuatro isoformas de Smac/Diablo, generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero, a las cuales se les denominó , , y (esta última también llamada Smac3) (Fig. 2). Smac/Diablo y son mitocondriales mientras que Smac/Diablo y son citosólicas debido a que no presentan una MTS. Se ha encontrado que Smac/Diablo , generada por un procesamiento

alternativo que integra un exón críptico, se expresa en todas las líneas celulares probadas incluyendo: HeLa, Jurkat, 293, THP1, MCF-7, A431 y 697, aunque en una cantidad menor que Smac/Diablo (11, 12). Por su parte, Smac/Diablo (Smac3) es generada por el procesamiento alternativo del exón 4. Esta isoforma particular posee una MTS, por lo cual se dirige a la mitocondria una vez sintetizada. Su expresión, al igual que Smac/Diablo , es diferencial en tejidos de humano adulto. De igual forma se expresa en las líneas celulares: MCF-7, HeLa, 293T, Jurkat y HEK293 (13). La isoforma es la menos estudiada y se desconoce casi todo de ella.

## MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LAS IAPs POR SMAC/DIABLO.

Smac/Diablo madura se comporta como un dímero en solución y utiliza su región N-terminal para interactuar con las IAPs e inhibir su función. Smac/Diablo se une a los dominios BIR2 y BIR3 de la XIAP, pero no al BIR1. La unión a cada BIR es mutuamente excluyente. Se ha demostrado que las mutantes monoméricas de Smac/Diablo interactúan fuertemente con el BIR3, pero no forman un complejo estable con el BIR2. Estas mutantes tienen menor capacidad para promover la activación de la procaspasa 3 (14). Smac/Diablo se une al BIR3 de la XIAP a través de sus primeros cuatro residuos de aminoácidos N-terminales AVPI (Fig. 3). La sustitución de cualquiera de estos residuos elimina la capacidad de unión, probablemente debida a una pérdida de interacciones hidrofóbicas (15). Smac/Diablo , por otro



**Figura 3.** Mecanismo de inhibición de las IAPs por Smac/Diablo. La proteína Smac/Diablo madura inhibe a la XIAP a través de su región N-terminal AVPI. Dada la similitud que existe en la secuencia primaria de las diferentes IAPs, es probable que Smac/Diablo inhiba a los BIRs de esas IAPs a través de un mecanismo similar al mostrado aquí. BIR, Baculovirus IAP Repeat. RING, Dominio con actividad de ligasa de ubiquitina E3. N, extremo amino. C, extremo carboxilo.

lado, interactúa con los dominios BIR1 y BIR2 de la XIAP, pero no con el BIR3. Smac/Diablo promueve principalmente la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7, aunque en todos los casos presenta una actividad promotora de caspasas menor que Smac/Diablo. Esta diferencia puede explicarse en parte porque los primeros residuos N-terminales de Smac/Diablo (MKSDFY) son diferentes a los de Smac/Diablo (AVPI), siendo estos últimos indispensables para la unión al BIR3 de la XIAP (12). Más aun, Roberts *et al* (12) demostraron que Smac/Diablo no es capaz de interactuar con XIAP, c-IAP1 ni c-IAP2 *in vivo*. Ellos proponen que 20 aminoácidos del N-terminal de Smac/Diablo son procesados intracelularmente. Sorprendentemente, esta forma de la proteína es capaz de potenciar la apoptosis inducida por diversos estímulos al mismo nivel que

Smac/Diablo. Como Smac/Diablo no posee los aminoácidos necesarios para la interacción con las IAPs, se postula que el (los) dominio(s) para la función proapoptótica reside(n) en el fragmento C-terminal y que la unión de Smac/Diablo a la XIAP es únicamente una función secundaria. Smac/Diablo madura interactúa con los dominios BIR2 y BIR3 de la XIAP a través del tetrapéptido N-terminal AVPI, promoviendo la activación de la caspasa 3 (13).

### MECANISMOS DE REGULACIÓN DE SMAC/DIABLO.

Smac/Diablo está sujeta a regulación a distintos niveles. El mecanismo de regulación más evidente para Smac/Diablo y es la translocación desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol durante la apoptosis. Este evento es regulado por miembros de la familia de Bcl-2, la sobreex-

presión de Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> inhibe la translocación, mientras que Bid truncado la favorece, al parecer es necesaria la activación de la vía de JNK (quinasas del N-terminal de c-Jun) para tal translocación (16). Una vez en el citosol, las mismas proteínas IAPs regulan la concentración y la actividad de Smac/Diablo. Por una parte, se ha demostrado que XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 tienen actividad de ligasa de la proteína ubiquitina (E3), a través de su dominio RING, sobre la proteína Smac/Diablo. Se requiere tanto de la asociación de las IAPs con Smac/Diablo como de la presencia del dominio RING para la ubiquitinación. Esta actividad promueve la rápida degradación de Smac/Diablo liberada de la mitocondria y proporciona un mecanismo por el cual las IAPs inhiben la muerte celular, dirigiendo a moléculas proapoptóticas a la degradación mediada por el proteosoma (17, 18). Sin embargo, la proteína Smac/Diablo también tiene la capacidad de promover la autoubiquitinación de la proteína XIAP. Esta actividad, la cual no presenta Smac/Diablo, requiere la asociación de Smac/Diablo con la XIAP y el dominio RING intacto de esta última, aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual Smac/Diablo acelera la autodestrucción de la XIAP (13).

Por otro lado, los diversos miembros de la familia de las IAPs pueden cooperar entre ellos para inhibir la apoptosis. Se sabe, por ejemplo, que XIAP, pero no survivina, puede unirse a caspasa 9. Sin embargo, XIAP y survivina sí pueden unirse a Smac/Diablo. Existe al menos un reporte en el cual se muestra que XIAP se une a la caspasa 9, mientras que sobrevivi-

na se une a Smac/Diablo y de esta forma evita que Smac/Diablo inhiba a XIAP. En este modelo la apoptosis se inhibe ya que la survivina mantiene secuestrada a Smac/Diablo, en tanto que XIAP inhibe la función de la caspasa 9 (19). Aparentemente Smac/Diablo es regulada intracelularmente por proteólisis. La pérdida de sus 20 aminoácidos N-terminales, crea una proteína incapaz de interactuar con las IAPs, conservando sin embargo su actividad promotora de apoptosis. Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual esta isoforma induce apoptosis, sin la necesidad de interactuar con las IAPs (12).

Por su parte, el gen *smac/diablo* es regulado a nivel transcripcional. Existen varios estímulos apoptóticos capaces de inducir la expresión del mensajero de Smac/Diablo.

La deprivación de suero en células HeLa induce un incremento en la expresión del RNAm de Smac/Diablo (resultados de nuestro laboratorio). El tratamiento de fibroblastos de origen humano GM701, con el compuesto de ácido hidroxámico BMD188, induce de igual forma un incremento en la expresión de Smac/Diablo (20). Finalmente, el tratamiento de una línea de células B inmaduras, derivadas de ratón WEHI 279, con IFN- $\gamma$ , induce un aumento en los niveles de expresión endógenos del mensajero de Diablo/Smac. Este incremento sensibiliza a estas células a experimentar apoptosis (21).

## IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Desde el descubrimiento de la proteína Smac/Diablo se conoce que su sobreexpresión hace más sensibles a las células a experimentar apoptosis (9, 10). En células

saludables, Smac/Diablo exógena de longitud completa, se acumula en la mitocondria, mientras que Smac/Diablo exógena sin MTS se acumula en el citosol, sin que estas sean capaces de inducir apoptosis por sí solas. Intentando sacar ventaja de esta particularidad, se han propuesto varios métodos para sobreexpresar a Smac/Diablo intracelularmente y potenciar el efecto de agentes terapéuticos conocidos. Inicialmente se diseñaron vectores que codificaban la forma completa de Smac/Diablo la cual se dirige a la mitocondria. El inconveniente es que la salida de Smac/Diablo de la mitocondria puede ser bloqueada por Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Actualmente la estrategia ha sido no dirigir a la proteína a la mitocondria sino expresarla en el citosol. Los métodos desarrollados incluyen: 1) fusión de los primeros 4-8 aminoácidos N-terminales de Smac/Diablo al péptido acarreador penetratina antennapaedia de *Drosophila*, 2) fusión de Smac/Diablo madura al dominio de transducción de proteínas de la proteína TAT del VIH-1, 3) fusión de los primeros siete aminoácidos N-terminales de Smac/Diablo a poliarginina para generar un péptido permeable a las células, 4) construcción de un vector de adenovirus citomegalovirus (CMV)-Smac/Diablo madura y 5) fusión de Smac/Diablo madura a ubiquitina. Todos estos métodos han dado resultados positivos. La sobreexpresión de Smac/Diablo o sus péptidos ha permitido la sensibilización de un amplio espectro de tipos celulares a experimentar apoptosis, después de la aplicación de estímulos inductores de muerte igualmente diversos.

## PERSPECTIVAS A FUTURO

El estudio de moléculas reguladoras de la muerte celular es un campo que sigue en expansión. Día a día aparecen nuevas proteínas moduladoras de este proceso y las redes intracelulares son cada vez más complejas. A pesar de que la función proapoptótica de la proteína Smac/Diablo ha sido claramente demostrada, los mecanismos utilizados para ejercer dicha función aun no son completamente entendidos. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> inhibe la salida de Smac/Diablo y citocromo c de la mitocondria. Sin embargo, el tratamiento con dexametasona induce solamente la salida de Smac/Diablo, pero no de citocromo c. Esta observación indica que Smac/Diablo puede promover la apoptosis en una vía independiente de citocromo c/Apaf-1/caspasa 9 y además genera una pregunta interesante: ¿Smac/Diablo utiliza una ruta de salida diferente a la utilizada por citocromo c? Por otra parte, hasta el momento se desconocen los mecanismos por los que Smac/Diablo promueve la apoptosis sin la necesidad de interactuar con las proteínas IAPs. De igual forma, no se sabe cómo Smac/Diablo acelera la auto-ubiquitinación y la destrucción de XIAP. En cuanto a las isoformas de Smac/Diablo, resultados preliminares de nuestro laboratorio apuntan hacia la existencia de más isoformas que las cuatro hasta ahora descritas, por lo que la función y efectos de esta proteína pueden ser mucho más complicados de lo que actualmente se conoce. Las regiones regulatorias del gen *smac/diablo* son igualmente desconocidas y se ignoran los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión diferencial de Smac/Diablo en los diferentes tejidos del organismo.

## REFERENCIAS

1. Jacobson M D, Weil M y Raff M C (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
2. Hanahan D y Weinberg R A (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
3. Yuan J y Yankner B A (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
4. Arends M J y Wyllie A H (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-254.
5. Evan G I, Wyllie A H, Gilbert C S, Littlewood T D, Land H, Brooks M, Waters C M, Penn L Z y Hancock D C (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69:119-128.
6. Earnshaw W C, Martins L M y Kaufmann S H (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
7. Deveraux Q L y Reed J C (1999) IAP family protein suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
8. Shi Y (2001) A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* 8:394-401.
9. Du Ch, Fang M, Li Y, Li L y Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
10. Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, Silke J, Connolly L M, Reid G E, Moritz R L, Simpson R J y Vaux D L (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
11. Srinivasula S M, Datta P, Fan X J, Fernandes-Alnemri T, Huang Z y Alnemri E S (2000) Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275:36152-36157.
12. Roberts D L, Merrison W, MacFarlane M y Cohen G M (2001) The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol* 153:221-227.
13. Fu J, Jin Y y Arend L J (2003) Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of XIAP. *J Biol Chem* 278: 52660-52672.
14. Chai J, Du C, Wu J W, Kyin S, Wang X y Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855-862.
15. Liu Z, Sun C, Olejniczak E T, Meadows R P, Betz S F, Oost T, Herrmann J, Wu J C y Fesik S W (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408:1004-1008.
16. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S y Anderson K C (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein Smac during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 278:17593-17596.
17. MacFarlane M, Merrison W, Bratton S B y Cohen G M (2002) Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* 277:36611-36616.
18. Hu S y Yang X (2003) Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278:10055-10060.
19. Song Z, Yao X y Wu M (2003) Direct interaction between survivin and Smac is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during Taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278:23130-23140.
20. Chandra D, Liu J W y Tang D G (2002) Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis. *J Biol Chem* 277:50842-50854.
21. Yoshikawa H, Nakajima Y y Tasaka K (2001) IFN- $\gamma$  induces apoptosis of WEHI 279 and normal pre-B cell lines by expressing direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pI. *J Immunol* 167:2487-2495.

# MECANISMOS DE REPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS BACTERIANOS\*

PEDRO D. LOEZA LARA, JUAN J. VALDEZ ALARCÓN,  
VÍCTOR M. BAIZABAL AGUIRRE Y JOEL E. LÓPEZ MEZA

## RESUMEN

Los plásmidos bacterianos son moléculas de ADN extracromosómico que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a diferentes ambientes, ya que promueven la transferencia de genes entre estos microorganismos. Se conocen tres mecanismos principales de replicación de los plásmidos circulares: a) el mecanismo de replicación asimétrico por el círculo rodante, b) el mecanismo tipo *theta* y, c) el mecanismo por desplazamiento de la cadena. Estudios recientes relacionan el mecanismo de replicación de los plásmidos con su capacidad para colonizar diferentes hospederos. El establecimiento de un plásmido en diferentes hospederos puede tener implicaciones biotecnológicas importantes, ya que estas moléculas con frecuencia son útiles en el diseño de herramientas moleculares.

**PALABRAS CLAVE:** Plásmido, replicación, círculo rodante, mecanismo *theta*, desplazamiento de la cadena.

## ABSTRACT

Bacterial plasmids are extrachromosomal DNA molecules which play important roles for bacterial environmental adaptation due to their ability to transfer genes among bacterial populations. Three mechanisms for circular plasmid replication have been described: a) the rolling circle asymmetric mode, b) the *theta* mechanism and, c) the strand displacement mechanism. Recent studies have related the plasmid replication mechanism with the enormous ability of these replicons to colonize different hosts. Establishment of a plasmid in different hosts may have important biotechnology implications, because plasmids are often useful as molecular tools.

**KEY WORDS:** Plasmid, replication, rolling circle, *theta* mechanism, strand displacement.

## INTRODUCCIÓN

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se han encontrado esencialmente en todos los tipos de bacterias estudiadas hasta la fecha. Dependiendo de su tamaño pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas. Sin embargo, raramente codifican productos esenciales para el crecimiento celular, tales como ARN polimerasas o enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos. En cambio, los productos de sus genes generalmente dan a las bacterias una ventaja selectiva sólo bajo ciertas condiciones. La resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y kanamicina; la nodulación de raíces de leguminosas; y la producción de antibióticos

como la bacteriocina (activa contra otras especies bacterianas), son algunas características fenotípicas codificadas por los plásmidos (1, 2).

Los plásmidos varían ampliamente en tamaño, desde miles a cientos de miles de pares de bases (un tamaño comparable al cromosoma bacteriano) y son, con mayor frecuencia, moléculas circulares de ADN de doble cadena. Sin embargo, algunas bacterias poseen plásmidos de estructura lineal, la cual no es una característica común en los plásmidos bacterianos por lo que no serán discutidos en esta revisión. Estos elementos juegan un papel crucial en la evolución y adaptación bacterianas, ya que son mediadores del intercambio de material genético entre estas poblaciones. La transferencia de la información

genética contenida en el plásmido de una bacteria donadora a una receptora se conoce con el nombre de conjugación. Este proceso requiere de la expresión de genes y de la presencia de regiones en el ADN del plásmido necesarios para su movilización. El plásmido se moviliza a través de un puente de conjugación entre las células (2).

La transferencia de ADN de la bacteria tumorigénica *Agrobacterium tumefaciens* a la planta hospedera ocurre por un mecanismo semejante a la conjugación. Además, algunos plásmidos se recombinan de manera dinámica entre sí o con el genoma, constituyendo una fuente de diversidad genética importante para las bacterias (2, 3).

\* Recibido: 9 diciembre 2003    Aceptado: 27 mayo 2004

TABLA I

## PLÁSMIDOS UTILIZADOS COMO HERRAMIENTAS IMPORTANTES EN ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS.

Plásmido	Aplicaciones	Algunas Características
pBR322	Vector de clonación	Origen de ColE1, <i>bla</i> , <i>tet</i> selección de recombinantes por color
pTrcHis A	Vector de expresión; purificación de proteínas recombinantes	Origen de pBR322, <i>bla</i> , <i>trc</i> Promotor, histidinas, péptido señal
pGV2260	Generación de plantas transgénicas; transformación con <i>A. tumefaciens</i>	Contiene los bordes del T-DNA del plásmido Ti y secuencias de pBR322
pKM101	Plásmido conjugativo	<i>Ori T</i> , <i>tra</i> , <i>eex</i>
pTn5 <i>cat</i>	Plásmido multifuncional con características de transposón, para mutagénesis, identificación de promotores y conjugación	Plásmido: <i>tet</i> , <i>tnp</i> ; Transposón: origen de ColE1, <i>cat</i> (sin promotor), <i>neo</i> , región Mob
BAC's, YAC's	Plásmidos con elementos del cromosoma para conferir estabilidad mitótica en bacterias (BAC) y levaduras (YAC)	BAC's: <i>OriS</i> , <i>repE</i> , <i>parA,B y C</i> YAC's: <i>Ori</i> , <i>ARS1</i> , <i>Amp</i> , <i>TRP1</i> , <i>CEN4</i>

*Bla*, -lactamasa (resistencia a ampicilina); *tet*, resistencia a tetraciclina; *trc*, promotor de triptofano; *oriT*, origen de transferencia; *tra*, genes que codifican funciones de transferencia; *eex*, genes que previenen la entrada de otros plásmidos; *tnp*, transposasa; *cat*, resistencia a cloranfenicol; *neo*, resistencia a kanamicina; Mob, región necesaria para la conjugación; *OriS*, origen basado en el factor F para clonación de fragmentos mayores de 350 kpb; *repE*, helicasa, *parA,B y C*, facilitan la división exacta del plásmido; *Ori*, origen de replicación de ColE1; *ARS1*, secuencia de replicación autónoma; *Amp*, resistencia a ampicilina; *TRP1*, auxotrofia sobre triptofano; *CEN4*, secuencia permite una segregación eficiente del cromosoma entre células hijas.

Desde los puntos de vista básico y aplicado, los plásmidos han servido como herramientas importantes en estudios de Biología Molecular y Biotecnología. La Tabla I muestra algunos ejemplos del uso de los plásmidos como herramientas biotecnológicas y algunas de sus características. En este sentido, la mayoría de los plásmidos naturales no son vectores de clonación o de expresión convenientes. Sin embargo, pueden ser modificados para su uso como tales. Para lograr el diseño y construcción de vectores de clonación de amplio rango de hospederos (vector que tiene la capacidad de replicarse en otras bacterias), vectores binarios (vectores "shuttle", con dos orígenes de replicación distintos), es necesario conocer las características o factores moleculares que les permiten

a estos plásmidos colonizar y mantenerse en diferentes hospederos; de ahí la importancia de estudiar los mecanismos de replicación. Otro ejemplo de vectores que se pueden replicar en bacterias y otros hospederos, por contener un origen de replicación bacteriano y elementos que contribuyen a la estabilidad de los cromosomas, lo constituyen los cromosomas artificiales de bacterias, levaduras y mamíferos (BAC's, YAC's y MAC's, respectivamente), elementos ampliamente utilizados en la caracterización de los genomas de diversos organismos por su capacidad de contener fragmentos de ADN muy grandes (~300, ~2000 y más de 1000 kpb, respectivamente).

Los plásmidos se replican de manera autónoma con respecto al

cromosoma, ya que codifican elementos propios que controlan su replicación. La Tabla II muestra una breve comparación de algunas características y factores involucrados en la replicación de los plásmidos y el cromosoma bacteriano (1). Algunos plásmidos se replican en pocas especies bacterianas y se dice que poseen un rango de hospederos reducido. Un segundo grupo de plásmidos se replica en un amplio rango de hospederos y se les denomina promiscuos (4). Existen diversos factores que influyen en la capacidad de los plásmidos para colonizar diferentes hospederos; una replicación eficiente es el paso más crítico y es el resultado de una interacción adecuada entre el plásmido y el hospedero. Esta interacción plásmido-hospedero se ha estudiado con detalle debido a las implicaciones básicas y de aplicación biotecnológica que representa (5).

Los primeros estudios sobre la replicación de estos elementos fueron realizados con plásmidos de *Escherichia coli* como ColE1, pSC101, R6K, R1, RK2 y F, que tienen como una característica común que replican su material genético por el mecanismo tipo *theta* (1). Recientemente se ha caracterizado un gran número de plásmidos pequeños (2-15 kb) que se replican por mecanismos diferentes al anterior. Estos son: a) el mecanismo del círculo rodante, originalmente observado en bacteriófagos de ADN de cadena sencilla (ADNcs) de *E. coli*; b) el mecanismo llamado por desplazamiento de la cadena, cuyos plásmidos representativos son elementos promiscuos asociados a la familia IncQ (plásmidos del grupo de incompatibilidad Q) cuyo prototipo es el plásmido RSF1010 de *E. coli* (1, 6).

En esta revisión se presenta un análisis de los diversos mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos, y se mencionan las ventajas y desventajas de cada mecanismo con relación a sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

### CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN POR EL

**TABLA II**  
**COMPARACIÓN DE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS Y FACTORES INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS BACTERIANOS Y EL CROMOSOMA.**

Característica	Mecanismo de replicación			
	Círculo rodante	<i>Theta</i>	Desplazamiento de la cadena	Cromosoma bacteriano
<b>Proteína iniciadora</b>	Rep (endonucleasa)	Rep y/o RNAP (helicasa)	Rep (helicasa)	DnaA (helicasa)
<b>Función de la proteína iniciadora</b>	Corta una de las cadenas de ADN	Apertura de la doble hélice	Apertura de la doble hélice	Apertura de la doble hélice
<b>Proteína iniciadora codificada por:</b>	Plásmido	Rep: plásmido ARNp: hospedero	Plásmido	Hospedero
<b>Intermediarios de ADNcs</b>	Genera intermediarios	No genera intermediarios	**	No genera intermediarios
<b>Simetría en el mecanismo de replicación</b>	Asimétrico	Simétrico	**	Simétrico
<b>Grupos de incompatibilidad</b>	Ausentes	Presentes	Presentes	Ausentes

\*\* Existen ambas características en diferentes plásmidos dentro del mismo grupo. ARNp = ARN polimerasa

### MECANISMO DEL CÍRCULO RODANTE

La mayoría de los plásmidos de bacterias Gram positivas con un número grande de copias se replican por un mecanismo asimétrico llamado círculo rodante o RC (por sus siglas en inglés "rolling circle"). La replicación de estos plásmidos denominados RC, se realiza en dos etapas bien definidas, la síntesis de la cadena temprana y la síntesis de la cadena tardía. Este mecanismo no está restringido a plásmidos de bacterias Gram positivas y se han incrementando los reportes de plásmidos RC caracterizados en bacterias Gram negativas y *Arqueas* (7).

Para que ocurra la replicación de un plásmido RC se requieren tres módulos estructurales: (i) El gen *rep* que codifica la proteína iniciadora de

la replicación (Rep) de la cadena temprana y sus elementos regulatorios; (ii) el origen de replicación de la doble cadena (*dso*), el cual es reconocido por la proteína Rep; y (iii) el origen de la cadena sencilla (*sso*), reconocido por factores del hospedero (ARN polimerasa). En los plásmidos RC pueden estar presentes otros módulos no esenciales para la replicación, como el gen *mob*, el cual codifica una proteína involucrada en la movilización de diversos plásmidos (de manera natural, algunos plásmidos poseen estos genes *mob* cuyo producto participa en la transferencia de ADN), o bien los genes de resistencia a antibióticos (Fig. 1a) (1, 4).

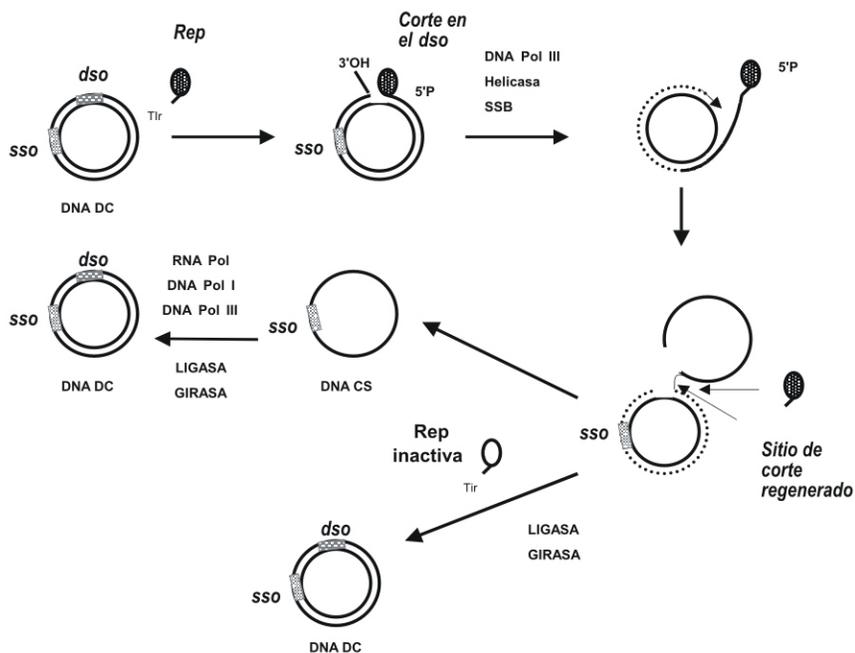
La proteína Rep posee actividad de endonucleasa (enzima que se une al ADN y corta una de las cadenas en un sitio específico), ya que se une al

origen de replicación del plásmido (función equivalente a la de la proteína DnaA en el origen de replicación del cromosoma bacteriano), con lo que libera la tensión generada por la separación de las cadenas al inicio de la replicación (3). Por otra parte, el origen *dso* posee dos regiones importantes para la replicación, una involucrada en la unión de la proteína Rep y otra que contiene el sitio de corte para la actividad de endonucleasa específica de Rep. La región de ADN a la cual se une Rep incluye secuencias repetidas invertidas, las cuales tienen la capacidad de formar estructuras de tallo y asa, importantes para el inicio de la replicación, ya que el sitio de corte de Rep se encuentra en el asa de la horquilla (Fig. 1b). El origen *sso* también tiene la capacidad de formar estructuras secundarias debido a las secuencias repetidas invertidas que posee. Se ha postulado que la formación de dichas estructuras es importante para el reconocimiento de los factores del hospedero (como la ARN polimerasa), los cuales son esenciales para el inicio de la síntesis de la cadena tardía (Fig. 1c) (3, 8).

### REPLICACIÓN POR EL MECANISMO DEL CÍRCULO RODANTE

El primer evento durante el inicio de la replicación RC involucra una interacción entre la proteína Rep y la región del *dso*, específicamente en el sitio denominado "*bind*". Posteriormente, Rep elabora un corte de una hebra, o "nick", en una región específica del ADN, el asa, lo cual genera extremos 5'P y 3'OH libres. La proteína Rep se une al extremo 5'P con lo cual se inicia la síntesis de la cadena temprana por medio de la extensión del extremo 3'OH libre, el cual es reconocido por la ADN polimerasa III. La extensión procede hasta que la cadena temprana es completamente desplazada. Posteriormente, Rep realiza un segundo corte en el límite entre la nueva cadena y la original, donde se ha regenerado el sitio de corte. Con esto se producen dos moléculas, una de ADN





**Figura 2.** Modelo de la replicación de los plásmidos RC mediante un intermediario de cadena sencilla. Se representa el mecanismo asimétrico de la replicación, la síntesis de la cadena temprana y la generación del intermediario de cadena sencilla. Los detalles del modelo se explican en el texto. Tir = residuo de tirosina. Abreviaturas como en la figura 1 (Modificado de referencial 2).

procariótico (9). Algunos plásmidos han adquirido diversas secuencias, con lo cual han logrado intensificar su diseminación y han ampliado su rango de hospederos.

Ciertos plásmidos tienen varios *ssso*, cada uno funcional en diferentes hospederos, mientras que otros poseen elementos de transposición, de tal manera que su composición modular y su presencia ubicua pueden ser facilitados por el amplio rango de hospederos y por los sistemas de transferencia horizontal de ADN. Por otra parte, los plásmidos RC carecen de grupos de incompatibilidad (incompatibilidad de plásmidos: fenómeno que se presenta cuando dos plásmidos no pueden coexistir en la misma célula, ya que comparten el mismo mecanismo de control de la replicación) por lo que permiten la replicación simultánea de otros plásmidos corresidentes (Tabla II) (1, 9).

Las características de los plásmidos RC son también importantes desde el punto de vista biotecnológico, ya que los plásmidos con distribución

amplia representan herramientas muy útiles en el diseño de vectores de clonación o de expresión (7). Existen varios ejemplos sobre el diseño y uso de vectores binarios a partir de plásmidos RC, entre ellos el plásmido pPP8-1 de *Pseudomonas putida* caracterizado por Holtwick y col en 2001. Una de las limitantes del uso de estos plásmidos como vectores es que algunos de ellos poseen sólo un sitio *ssso*, el cual es reconocido de manera eficiente únicamente por los factores de su hospedero natural. Lo anterior trae como resultado la acumulación de multímeros de alto peso molecular (ADNcs), los cuales no pueden ser convertidos a ADN de doble cadena cuando se replican en otro hospedero.

#### CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN POR EL MECANISMO TIPO *theta*

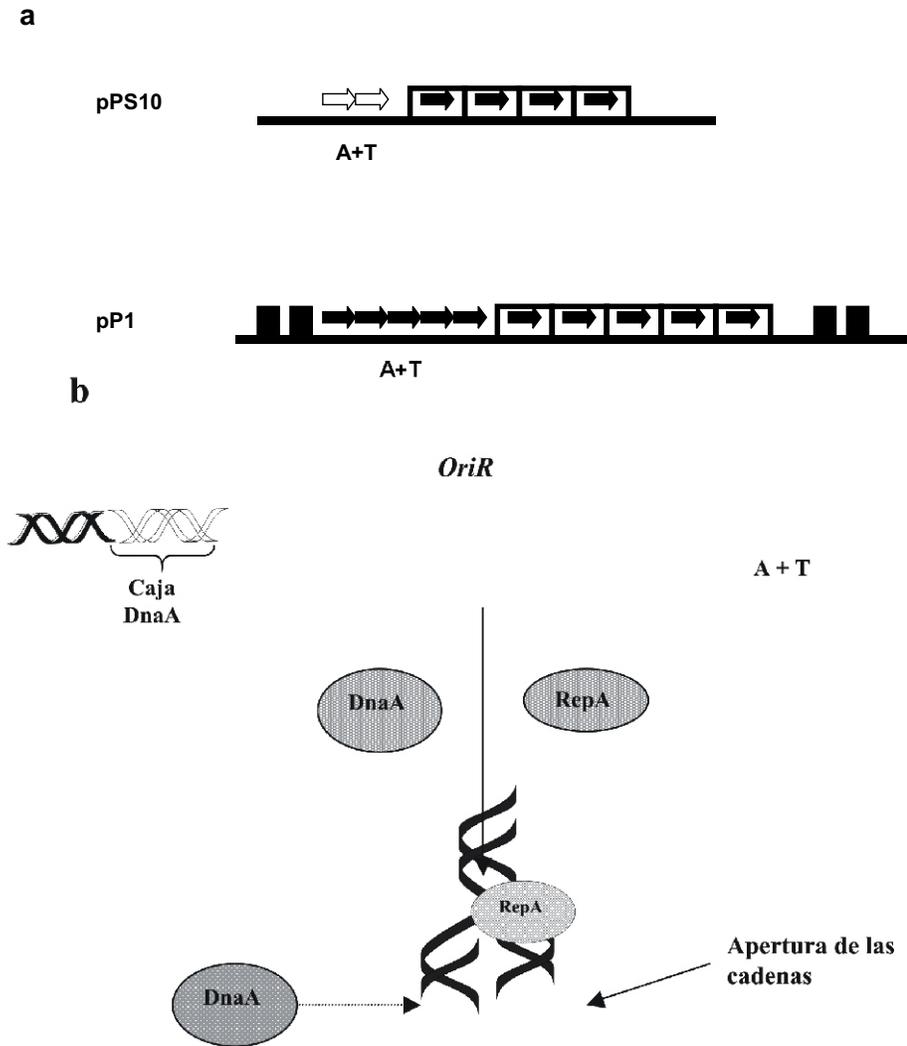
La replicación por el mecanismo tipo *theta* (llamado así por la similitud de los intermediarios con la letra griega  $\theta$ ) está distribuida ampliamente entre plásmidos de bacterias Gram negativas

y Gram positivas. Este mecanismo de replicación requiere de dos módulos estructurales: (i) el gen que codifica la proteína Rep y sus elementos reguladores, y (ii) el origen de la replicación. Es importante resaltar que existen algunas excepciones para este mecanismo, ya que la replicación de algunos plásmidos se inicia de manera independiente de la proteína Rep, la cual es sustituida en su función por la ARN polimerasa del hospedero (8). El proceso consiste, de manera general, en la apertura de las cadenas de ADN en el origen de replicación y el ensamblaje secuencial de las proteínas involucradas en el inicio de la replicación, incluida la síntesis y extensión de los oligonucleótidos de ARN que funcionan como iniciadores (10).

Los orígenes de replicación poseen secuencias específicas características de cada plásmido, con las cuales interactúa la proteína Rep; estas secuencias poseen una región rica en A+T y uno o más sitios donde se une la proteína iniciadora DnaA del hospedero. En muchos casos el origen de replicación posee secuencias repetidas directas, llamadas iterones, las cuales son los sitios de unión de la proteína Rep y tienen otras funciones en el control de la replicación (Fig. 3a) (11).

#### REPLICACIÓN POR EL MECANISMO TIPO *theta*

Se han descrito dos mecanismos de replicación tipo *theta*: el primero es dependiente de factores de inicio codificados por el plásmido, como ocurre en los plásmidos de *E. coli* pSC101, R6K y R1. Este tipo de replicación requiere de las proteínas Rep codificadas por el plásmido y DnaA, del hospedero, para el inicio de la síntesis de ADN. La proteína Rep se une a los iterones formando un complejo de preiniciación; este complejo incluye a proteínas del hospedero como las helicasas DnaA, DnaB y DnaC, la ADN polimerasa III y la primasa. La replicación se inicia cuando Rep y DnaA interactúan con la región rica en A+T, en donde se inicia la apertura de las



**Figura 3.** Características de la replicación por el mecanismo *theta*. a) Orígenes de replicación de los plásmidos pPS10 y pP1 que se replican por el mecanismo *theta*. Se muestran los iterones (flechas sólidas encerradas en cajas), las regiones ricas en A+T que contienen repetidos directos (flechas), las regiones de unión de la proteína DnaA (rectángulos sólidos). b) Modelo de la replicación por el mecanismo tipo *theta* dependiente de los factores del hospedero. Los detalles del modelo se explican en el texto (Modificado de referencia 8).

cadena del ADN. DnaB y DnaC auxilian en esta apertura, seguida por la primasa la cual sintetiza un oligonucleótido de RNA iniciador, mismo que se extiende por la ADN polimerasa III hasta lograr la replicación completa de ambas cadenas (Fig. 3b) (12).

El segundo mecanismo de replicación tipo *theta* es independiente de factores iniciadores codificados por el plásmido. El replicón mejor caracterizado es el plásmido ColE1 de *E. coli*, cuya replicación involucra la actividad

consecutiva de la RNA polimerasa y DNA polimerasas I y III, entre otras proteínas. La RNA polimerasa del hospedero sintetiza un oligonucleótido para iniciar la replicación de la cadena temprana. La síntesis se inicia por la ADN polimerasa I, la cual incorpora aproximadamente 400 nucleótidos de la cadena temprana para posteriormente ser reemplazada por la ADN polimerasa III, la cual posee mayor capacidad de incorporación de nucleótidos. El cambio entre las ADN polimerasas I y III se favorece por proteínas unidas

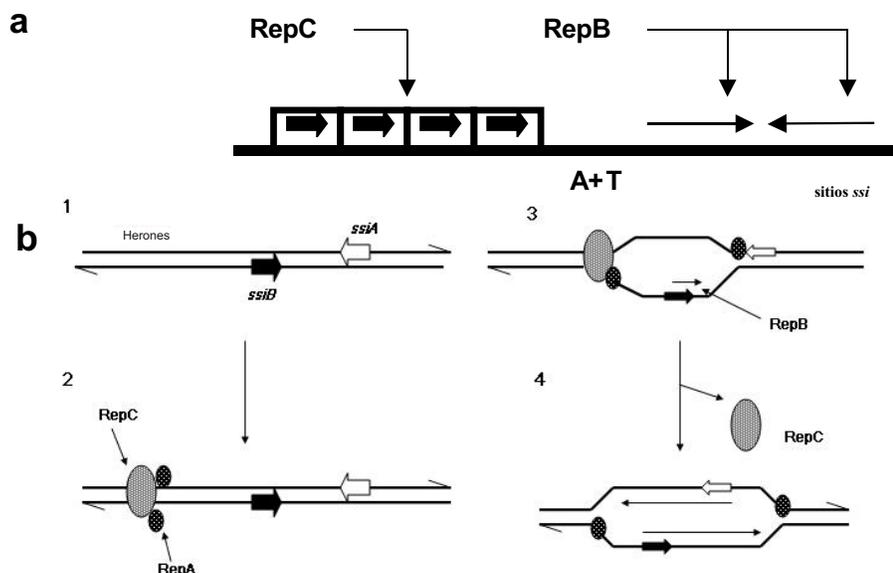
a la cadena temprana (13).

La mayor parte de los plásmidos que se replican por el mecanismo tipo *theta* posee un rango de hospederos reducido; sin embargo, algunos de estos plásmidos presentan un amplio rango de hospederos, de manera similar que los plásmidos RC. Se ha establecido que algunos de los iterones son capaces de ejercer incompatibilidad, ya que presentan similitud con los iterones de otros plásmidos que se replican por el mismo mecanismo (Tabla II). Por otra parte, la mayoría de los plásmidos que se replican a través del mecanismo *theta* poseen un tamaño superior a 15 kb y se han utilizado para construir vectores de clonación; por ejemplo: los vectores pBR322, pUC19, pBluescript y pGEM son derivados de estos replicones. Estos vectores además han servido como base para el diseño de una gran variedad de nuevos vectores de clonación o de expresión, muchos de ellos disponibles de manera comercial (Tabla I).

### CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN POR EL MECANISMO DE DESPLAZAMIENTO DE LA CADENA

Los ejemplos mejor conocidos de los plásmidos que se replican por el mecanismo de desplazamiento de la cadena son los elementos promiscuos asociados a la familia IncQ; por ejemplo: los plásmidos RSF1010 de *E. coli* (6) y pTC-F14 de *Acidithiobacillus caldus* (14). Los miembros de esta familia requieren para su replicación de tres proteínas codificadas por el plásmido. Estas proteínas promueven el inicio de la replicación, en el origen del plásmido, mediante la apertura de las cadenas de ADN en una región rica en A+T y la síntesis de oligonucleótidos de ARN como iniciadores de la replicación (14).

El origen de replicación incluye tres iterones idénticos de 20 pb (pares de bases), una región rica en



**Figura 4.** Características de la replicación por el mecanismo de desplazamiento de la cadena. a) Origen de replicación y regiones importantes en la replicación del plásmido pRSF1010 de *E. coli*. Se muestran las regiones de unión de la proteína Rep C (iterones); los sitios de interacción de Rep B (repeticiones invertidas ssi) y la región rica en A+T. b) Replicación por el mecanismo de desplazamiento de la cadena (Modelo propuesto en referencia 6). Los detalles del modelo se explican en el texto.

G+C de 28 pb y un segmento rico en A+T de 31 pb. Otras regiones importantes dentro del origen son los sitios *ssiA* y *ssiB*, los cuales son repetidos invertidos localizados en cadenas opuestas (Fig. 4a). Los iterones y la región rica en A+T facilitan la apertura de la doble cadena, mientras que los sitios *ssiA* y *ssiB* favorecen la formación de estructuras de tallo y asa, las cuales son específicamente reconocidas por la primasa (RepB), codificada por el plásmido, que sintetiza el oligonucleótido iniciador (15).

El proceso de replicación se lleva a cabo por la acción concertada de las proteínas RepA, RepB y RepC. También se requieren la ADN polimerasa III y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB). La primera etapa de este proceso involucra la unión de RepC a los iterones del origen de replicación. Posteriormente RepA, que muestra actividad de helicasa, se une a la región rica en A+T con lo cual se separan las cadenas de ADN activando los sitios *ssi* (Fig. 4b; etapas 1 a 2).

El inicio de la replicación puede

ocurrir de manera independiente en cualquiera de los sitios *ssi*, de tal manera que la replicación procede de forma continua con la helicasa RepA facilitando el desplazamiento de la cadena original no replicada. Se ha observado que una replicación continua en ambos sitios *ssi* en direcciones opuestas origina una estructura de ADN de doble cadena semejante a la formada en la replicación tipo theta (Fig. 4b; etapas 3 a 4). Por otra parte, puede ocurrir la síntesis desacoplada de ambas cadenas, lo cual permitiría la generación de moléculas de ADN superenrollado de doble cadena y de intermediarios de ADNs. Estas moléculas de cadena sencilla pueden corresponder a cualquiera de las cadenas y por lo tanto podrían contener las secuencias *ssiA* o *ssiB*. La replicación de estos monómeros se inicia en el origen *ssi* expuesto, con lo que se sintetiza la cadena complementaria y los monómeros son convertidos a ADN de doble cadena. Debido a las actividades de las tres proteínas Rep codificadas por el plásmido, su replicación es independiente de los factores del

hospedero que participan en las primeras etapas del proceso, como la ARN polimerasa y las proteínas DnaA, DnaB y DnaC, entre otras (15).

Los plásmidos que se replican por el mecanismo de desplazamiento de la cadena, de manera similar a los plásmidos RC, son capaces de replicarse en una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de transferirse de manera eficiente. Como resultado del amplio rango de hospederos y de su movilidad, estos plásmidos son considerados promiscuos. Algunos vectores de clonación con estas características se han obtenido a partir de los plásmidos conjugativos RSF1010 y RP4, los cuales se replican en bacterias Gram negativas. Sin embargo, se ha establecido que los plásmidos de la familia IncQ y otros relacionados, muestran similitud en las secuencias de los iterones, con lo cual se han formado grupos de incompatibilidad (Tabla II). Esto trae como consecuencia una disminución en el número de copias o la segregación o curación de los plásmidos que tienen elementos de su maquinaria de replicación en común. Lo anterior representa un inconveniente para el uso de estos plásmidos en el diseño de vectores de clonación (14).

## CONCLUSIONES

Los estudios sobre la replicación de los plásmidos bacterianos han revelado una variedad de factores, algunos codificados por el plásmido y otros por el hospedero, que son importantes para este proceso. El análisis de la replicación de estos elementos genéticos provee, por lo tanto, una ventana muy amplia para obtener información concerniente a la interacción entre el plásmido y el hospedero, y de esta manera entender la capacidad de algunos plásmidos para colonizar diferentes hospederos. Lo anterior puede tener implicaciones biotecnológicas importantes, por ejemplo, en la

búsqueda y caracterización de vectores de clonación de amplio rango de hospederos o vectores binarios, así como vectores de expresión con nuevas propiedades o

con características más eficientes.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Carlos Cervantes Vega los comentarios y

sugerencias realizadas al manuscrito. Pedro D. Loeza recibe beca de la UMSNH para estudios de doctorado. El trabajo de los autores está financiado por el CONACYT (38746-B).

### REFERENCIAS

- Khan S A (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 442-455.
- Romero D y Palacios R (1997) Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet* 31: 91-111.
- Khan S A (2000) Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol* 37: 447-484.
- López-Meza J E (2001) Biología molecular de los plásmidos RC y su función en *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Nicolaita* 29: 23-30.
- Del Solar G, Alonso J C, Espinosa M y Diaz-Orejas R (1996) Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol* 21: 661-666.
- Scherzinger E, Haring V, Lurz R y Otto S (1991) Plasmid RSF10: DNA replication *in vitro* promoted by purified pRSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res* 19: 1203-1211.
- Holtwick R, Wallbrunn V A, Keweloh H y Meinhardt F (2001) A novel rolling-circle-replication plasmid from *Pseudomonas putida* P8: molecular characterization and use as vector. *Microbiology* 147: 337-344.
- Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echeverría M, Espinosa M y Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 434-464.
- Andrup L, Jensen G B, Wilcks A, Smidt L, Hoflack L y Mahillon J (2003) The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid* 49: 205-232.
- Vocke C y Bastia D (1983) DNA-protein interaction at the origin of DNA replication of the plasmid pSC101. *Cell* 35: 495-502.
- Filutowicz M, Dellis S, Levchenko I, Urh M, Wu F y York D (1994) Regulation of replication in an iteron-containing DNA molecule. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 239-273.
- Bramhill D y Kornberg A (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54: 915-918.
- Marians K J (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61: 673-719.
- Gardner N M, Deane M S y Rawlings D E (2001) Isolation of a new broad-host-range IncQ-like plasmid, pTC-F14, from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the plasmid replicon. *J Bacteriol* 183: 3303-3309.
- Sakai H y Komano T (1996) DNA replication of the IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 377-382.

# PROBLEMA BIOQUÍMICO

## MECANISMO CINÉTICO PROPUESTO PARA LA ASPARAGINA SINTETASA A

La asparagina sintetasa A cataliza la reacción de amidación del aspartato para formar el aminoácido no esencial asparagina mediante la hidrólisis de ATP a pirofosfato (PPi) y AMP. Se han hecho experimentos de velocidad inicial y de inhibición por producto, entre otros, para determinar el mecanismo cinético de la asparagina sintetasa A de *Escherichia coli* (1).

En las siguientes tablas se muestran los patrones gráficos de los experimentos de velocidad inicial entre los sustratos y los patrones de inhibición por producto, tanto los determinados experimentalmente para esta enzima trirreactante como aquellos pronosticados para un mecanismo con una reacción parcial ordenada (1).



TABLA I.  
PATRONES GRÁFICOS DE DOBLES RECÍPROCOS (LINEWEAVER-BURK: LB) OBTENIDOS DE LOS EXPERIMENTOS DE VELOCIDAD INICIAL.

Sustrato variable	Sustrato fijo variable	Patrón gráfico (LB)
NH <sub>3</sub>	Aspartato	Paralelas
NH <sub>3</sub>	MgATP	Paralelas
MgATP	Aspartato	Intersectantes
MgATP	NH <sub>3</sub>	Paralelas
Aspartato	MgATP	Intersectantes
Aspartato	NH <sub>3</sub>	Paralelas

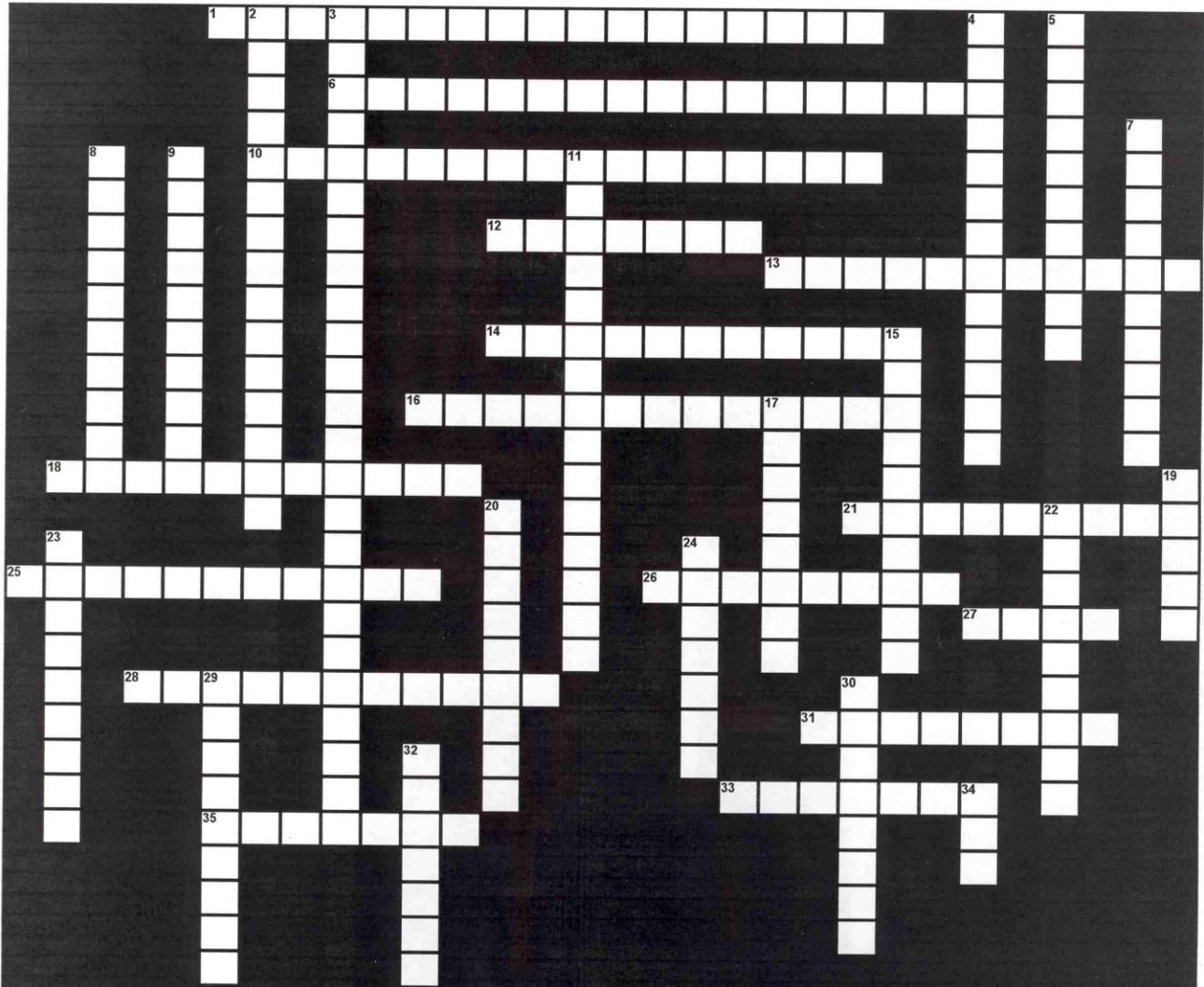
TABLA II.  
PATRONES DE INHIBICIÓN POR PRODUCTO.

Producto	Sustrato variable no saturante	Pronosticado	Experimental
AMP	NH <sub>3</sub>	Incompetitivo	No competitivo
AMP	MgATP	Competitivo	Competitivo
AMP	Aspartato	No competitivo	No competitivo
PPi	NH <sub>3</sub>	Competitivo	Competitivo
PPi	MgATP	No competitivo	No competitivo
PPi	Aspartato	No competitivo	No competitivo
Asparagina	NH <sub>3</sub>	No competitivo	No competitivo
Asparagina	MgATP	Incompetitivo	No competitivo
Asparagina	Aspartato	Incompetitivo	Competitivo

Con los datos de las Tablas I y II diseña en un diagrama de Cleland el mecanismo cinético de la asparagina sintetasa de *E. coli*.

# CRUCIBIOQ

## BIOENERGÉTICA



### HORIZONTALES

- 1 Metabolito fosforilado de la vía glucolítica posee un alto contenido energético, su  $\Delta G^\circ$  de hidrólisis es de -61.9 kJoules por mol.
- 6 Producto de la eliminación de un grupo fosfato a una molécula trifosforilada, esta reacción le genera a la célula aproximadamente 30 kJoules por mol.
- 10 En este grupo de enzimas quedan incluidas todas las que participan como transportadoras de electrones.
- 12 Grupo químico presente en la mayoría de los metabolitos con alto contenido energético.
- 13 Así se llaman a la reacción en las que los productos poseen mayor cantidad de energía libre que los sustratos.
- 14 Reacción que para que se pueda realizar se le necesita proporcionar energía, tiene un valor de  $\Delta H$  positivo.
- 16 Ciencia que estudia que el calor resulta del movimiento desordenado de las moléculas ya que tienen triple movimiento (traslación, vibración y rotación).
- 18 Se llama así al conjunto de procesos exergónicos mediante el cual los seres vivos obtienen energía

- proveniente de los alimentos ingeridos.
- 21 Tipo de energía que se utiliza en la transmisión nerviosa.
  - 25 Llamadas así a las reacciones que liberan energía.
  - 26 Tipo de energía mediante la cual las luciérnagas activan su luciferina por la presencia del ATP.
  - 27 Producto final de la transferencia de protones y electrones desde el primer sustrato hasta el oxígeno.
  - 28 Se produce además del AMP cuando el ATP se hidroliza ( $\Delta G^\circ = -35.9 \text{ kJoules por mol}$ ).
  - 31 Contenido calórico de un sistema, sus cambios se representan por  $\Delta H$ , en el caso de la oxidación de la glucosa es de aproximadamente 2,800 kJoules por mol.
  - 33 La primera ley de la termodinámica, llamada también ley de la conservación de la \_\_\_\_\_, dice que aunque hay transformaciones, la energía de un sistema es constante.
  - 35 Cantidad de energía necesario para pasar un gramo de agua, de 15 a 16° C.

## VERTICALES

- 2 Tipo de reacción en la cual se realiza la transducción de la energía en las células mediante el flujo de electrones.
- 3 Coenzima que interviene en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en una reacción de oxidorreducción, tiene un valor  $E^\circ$  de -0.219 V.
- 4 Es parte de la termodinámica, que estudia los intercambios de energía en los seres vivos.
- 5 Se liberan cuando un compuesto o elemento reducido se oxida, por ejemplo cuando  $\text{Fe}^{2+}$  pasa a  $\text{Fe}^{3+}$ .
- 7 Proteínas con el grupo hemo, participan como transportadores electrónicos en la respiración celular.
- 8 Así se conoce a una reacción que libera calor y tiene un valor de  $\Delta G$  negativo.
- 9 Llamada también coenzima Q, participa como transportador electrónico en la cadena respiratoria; su reducción completa se realiza en dos pasos, un metabolito intermedio es un radical libre.
- 11 Enzimas que participan en reacciones de oxidorreducción eliminando pares de hidrógenos de los sustratos.
- 15 Proceso endergónico mediante el cual se lleva a cabo la síntesis de metabolitos.
- 17 Forma de energía que permite a los seres vivos desplazarse o contraer un músculo.
- 19 Ante la oxidación de los alimentos es la forma de energía que participa en la regulación de la temperatura.
- 20 Tipo de fosforilación en la que está acoplada la generación de ATP con la transferencia de electrones, desde los sustratos hasta el oxígeno.
- 22 En una reacción química de este tipo es cuando hay pérdida de oxígeno o bien ganancia de átomos de hidrógeno.
- 23 Reacción en la que se gana oxígeno o bien se pierden átomos de hidrógeno.
- 24 Forma de energía que permite que las moléculas se transformen; si los productos tienen menor cantidad de energía que los sustratos, el excedente se libera en forma de calor.
- 29 Las sustancias deben estar de esta forma para que al oxidarse se pueda realizar la fosforilación a nivel de sustrato.
- 30 Es la medida del desorden de un sistema y se basa en la segunda ley de la termodinámica dice que el óptimo equilibrio se obtiene con el máximo desorden.
- 32 Es electrofílico, altamente oxidante y tiene gran avidez por electrones.
- 34 Siglas de molécula que en los sistemas biológicos participa en la transferencia de energía entre reacciones exergónicas y endergónicas.

# RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

De acuerdo con la Tabla I, el MgATP y aspartato tienen un mecanismo cinético secuencial entre ellos. Los mecanismos al azar y ordenado se clasifican como mecanismos secuenciales debido a que es necesario que los dos sustratos (en el caso de una enzima birreactante) estén unidos a la enzima de manera consecutiva formando un complejo ternario para poder llevar a cabo la catálisis. Estos mecanismos secuenciales pueden tener diferentes subtipos de acuerdo a la relación entre los valores de  $k_{cat}$  y  $k_{-1}$  de cada uno de ellos, ya que puede ser un mecanismo en equilibrio rápido ( $k_{cat} \lll k_{-1}$ ) o en estado estacionario ( $k_{cat} \approx k_{-1}$ ). Los mecanismos secuenciales en general tienen una ecuación de velocidad inicial de la siguiente forma (1):

$$\frac{V[A][B]}{K_{ia} K_b K_A B K_B A A B}$$

Donde  $V$  es la velocidad inicial, A y B son las concentraciones de los sustratos,  $V$  es la constante cinética de velocidad máxima,  $K_A$  es la constante de disociación del sustrato A,  $K_B$  y  $K_{ia}$  son las constantes de Michaelis-Menten para los sustratos A y B respectivamente.

En el caso del  $NH_3$ , respecto a los otros dos sustratos, MgATP y aspartato, el patrón gráfico de velocidad inicial es paralelo, lo cual es diagnóstico de un mecanismo Ping Pong. El mecanismo Ping Pong está clasificado como mecanismo cinético no secuencial. Es no secuencial debido a que no es requisito que los dos sustratos estén unidos al mismo tiempo a la enzima para que se lleve a cabo la catálisis (1). Estas evidencias sugieren que en este mecanismo cinético Ter-Ter, existen dos reacciones parciales; sin embargo, para determinar el orden de unión de los sustratos y el de liberación de los productos es necesario analizar los patrones de inhibición por producto. En el caso de los patrones de inhibición por producto pronosticados por un mecanismo parcial ordenado (Tabla II), estos sugieren un mecanismo cinético ordenado entre MgATP y aspartato y una liberación del mismo tipo entre AMP y asparagina. Esta conclusión se obtuvo a partir de analizar que el AMP es un inhibidor competitivo respecto al ATP, lo cual sugiere que se unen a la misma forma de la enzima y sólo podrían hacerlo si A es MgATP y R el AMP (ambos se unen a la enzima libre: E), o si fueran C y P, respectivamente, y se unieran a la forma F modificada (Ver esquema 1). Sin embargo, la última opción queda completamente descartada porque el AMP proviene directamente del MgATP y no es posible entonces que

primero se libere P (AMP) y luego se una C (MgATP) en la reacción "forward". Asimismo, el PPI muestra un patrón de inhibición de tipo competitivo respecto al  $NH_3$ , indicando que se unen a la misma forma de la enzima, por lo que este par corresponde a P y C respectivamente. Si efectivamente el AMP es el último producto en liberarse, entonces la inhibición de este producto con respecto al aspartato debería ser no competitiva debido a que se unen a diferentes formas de la enzima y están interconectados por pasos reversibles (1). Bajo estas circunstancias se esperaría una inhibición incompetitiva del AMP con respecto a C, debido a que se unen a diferentes formas de la enzima y existe un paso de liberación de producto intermedio entre ellos. En este caso, B y Q serían aspartato y asparagina y se esperaría que la asparagina tuviera una inhibición de tipo no competitivo respecto a C (probablemente  $NH_3$ ) e incompetitivo respecto a los otros dos sustratos (aspartato y MgATP).

De acuerdo con todo el análisis anterior, el patrón de inhibición esperado corresponde con el siguiente esquema de Cleland.

A	B	P	C	Q	R			
E	EA	EAB	FP	F	FC	EQR	ER	E

**Esquema 1.** Diagrama de Cleland del mecanismo cinético basado en los patrones de inhibición predichos para la asparagina sintetasa. Donde : A = MgATP, B = aspartato, C =  $NH_3$ , P = PPI, Q = asparagina y R = AMP.

Respecto a los patrones obtenidos experimentalmente, estos no concuerdan con aquellos predichos para un mecanismo con una reacción parcial en la que los sustratos y los productos se unen de manera ordenada. Las principales diferencias se encuentran en que los patrones de inhibición incompetitiva que se predecían no se presentan y experimentalmente son no competitivos o competitivos. Otra diferencia notoria es el patrón de inhibición competitiva que existe entre los pares AMP/MgATP, asparagina/aspartato y PPI/ $NH_3$ . De acuerdo con las reglas generales para predecir patrones de inhibición por producto (1, 2), la inhibición competitiva se observa cuando el sustrato y el producto son mutuamente excluyentes. La mutua exclusión entre moléculas puede deberse a que ambas se unen a la misma forma de la enzima o a que comparten el mismo sitio de unión dentro de la enzima.

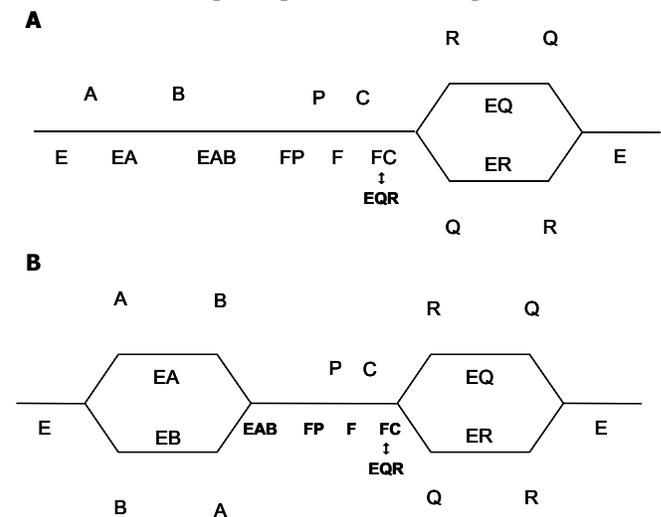
De acuerdo con los patrones de inhibición determinados experimentalmente para la asparagina

sintetasa, las inhibiciones competitivas entre AMP/MgATP y asparagina/aspartato se deben a que estas moléculas tienen el mismo sitio de unión dentro de la enzima, lo cual es posible aún a pesar de unirse a diferentes formas de la enzima de acuerdo al mecanismo cinético. Por otra parte, la inhibición competitiva entre el P<sub>Pi</sub> y NH<sub>3</sub> se mantiene tanto en el patrón predicho como en el determinado experimentalmente y puede explicarse como que ambas moléculas se unen a la misma forma de la enzima y no necesariamente a que las dos ocupen el mismo sitio dentro de ella, como es el caso de las moléculas estructuralmente semejantes (como AMP/ATP y asparagina/aspartato).

Finalmente, la inhibición incompetitiva entre asparagina/MgATP, asparagina/aspartato y AMP/NH<sub>3</sub> no se observó experimentalmente. Estos patrones incompetitivos constituyen el diagnóstico de un paso intermedio de liberación de producto dentro de la reacción que involucra al par de moléculas que se está analizando (1), confirmándose de esta manera que el mecanismo cinético predicho correspondía a la liberación ordenada de la asparagina y AMP. Los patrones de inhibición no competitivos determinados para los pares asparagina/MgATP y AMP/aspartato, sugieren que la asparagina y el AMP se liberan al azar (esquema 2A), ya que ambos presentan el mismo tipo de inhibición respecto a los sustratos MgATP y aspartato.

Con estos datos, no se puede distinguir si los sustratos A y B se unen a la enzima de manera ordenada como se planteó en el esquema 1 o al azar (esquema 2B). Sin embargo, de acuerdo con los datos experimentales

interpretados, existen dos posibles mecanismos cinéticos que pueden ser evaluados posteriormente utilizando otra serie de herramientas cinéticas (por ejemplo: intercambio isotópico, formación de complejos sin salida, ensayos cinéticos con combinaciones de productos y/o sustratos, etc.) para determinar el verdadero mecanismo cinético de la enzima. De hecho, se ha propuesto (3) que la enzima tiene un mecanismo cinético como el que se presenta en el esquema 2A.



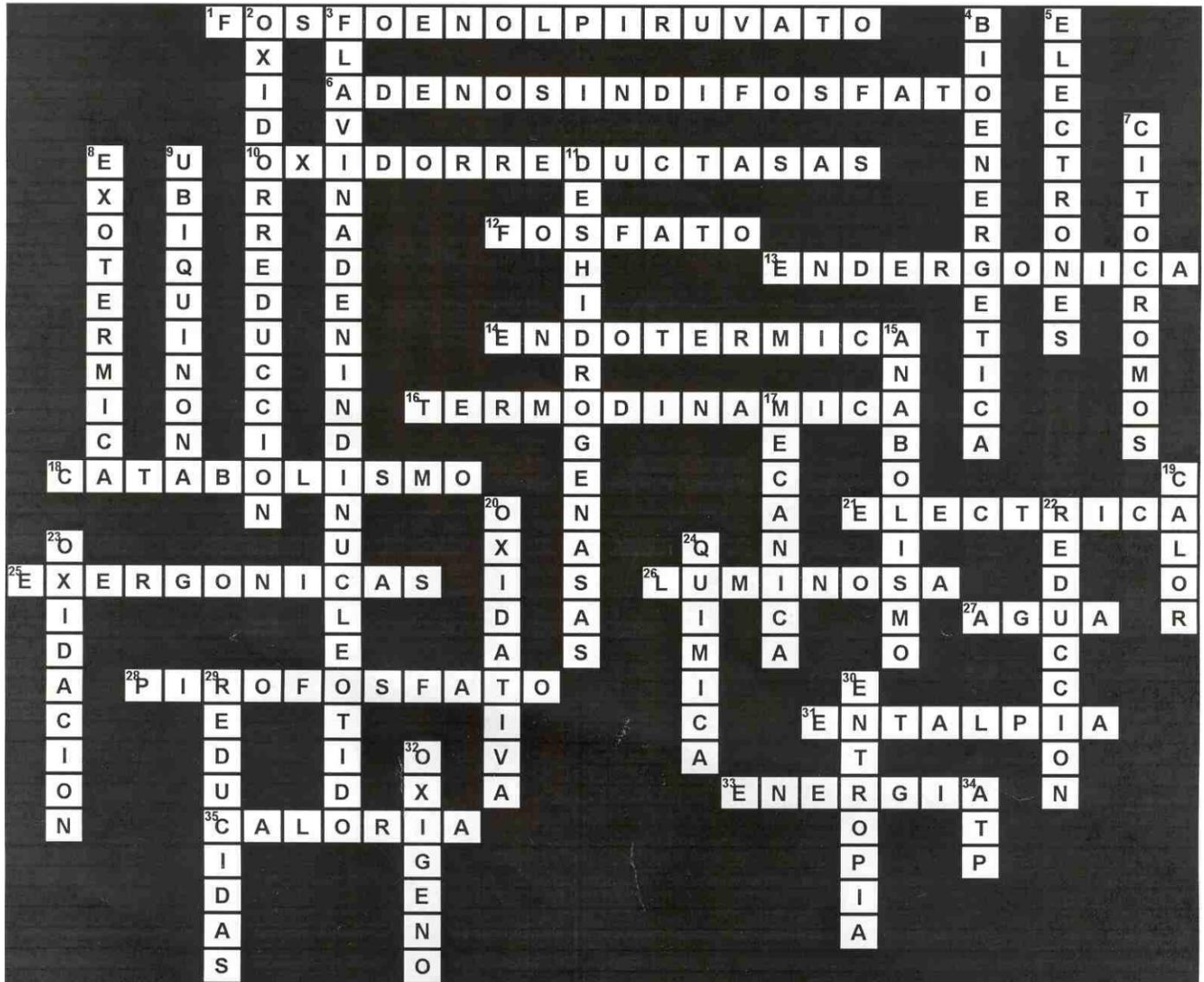
**Esquema 2.** Diagramas de Cleland de las diferentes posibilidades de mecanismos cinéticos basados en los datos experimentales mostrados en la Tabla II para la asparagina sintetasa.

## REFERENCIAS

1. Cleland W W (1970) Steady State Kinetics En: The enzymes Vol. 2. Editor: Boyer P D Academic Press. pp. 1-65.
2. Segel H I (1975) Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York, NY, USA pp. 342-344.
3. Varela-Gómez M (2003) Cinética Enzimática: Inhibición por producto. REB 22 : 155, 158-160.

# SOLUCIÓN CRUCIBIOQ

## BIOENERGÉTICA



# SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2004

## XII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A. C.

y

## XXXI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA,

Organizado por el Departamento de Bioquímica,  
Facultad de Medicina, U. N. A. M.

Fecha: del 9 al 13 de agosto de 2004

Lugar. Auditorio Raoul Fournier, Facultad de Medicina, U. N. A. M.

Informes e inscripciones:

Teléfonos: (55)5623-2170, (55)5623-2175 y Fax (55)5616-2419

Sra. Marivel Rojas García

XXXI TAB: [comitetab@bq.unam.mx](mailto:comitetab@bq.unam.mx)

XII Congreso: [reb@laguna.fmedic.unam.mx](mailto:reb@laguna.fmedic.unam.mx)

Visite nuestra página: <http://bq.unam.mx/%7Eevazquez/tab/>

Departamento de Bioquímica: <http://bq.unam.mx/>

Comités Organizadores

### Del XXXI TAB

Dr. Oscar Flores Herrera

[oflores@bq.unam.mx](mailto:oflores@bq.unam.mx)

Dr. Héctor Riveros Rosas

[hriveros@servidor.unam.mx](mailto:hriveros@servidor.unam.mx)

Dr. Alejandro Sosa Peinado

[asosa@bq.unam.mx](mailto:asosa@bq.unam.mx)

Dr. Edgar Vázquez Contreras

### Del XII Congreso

Dra. Yolanda Saldaña Balmori

[balmori@laguna.fmedic.unam.mx](mailto:balmori@laguna.fmedic.unam.mx)

Dra. Celia Virginia Sánchez Meza

[sanchezvicky@hotmail.com](mailto:sanchezvicky@hotmail.com)

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

[rsalceda@ifc.unam.mx](mailto:rsalceda@ifc.unam.mx)

# XII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A. C. 2004

La Semana de Educación Bioquímica 2004, que se realizará en el Auditorio Raoul Fournier de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México del 9 al 13 de agosto del presente año, tendrá en sus actividades durante los días 9 y 10 al XII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. y los días 11, 12 y 13 se llevará a cabo el XXXI Taller de Actualización Bioquímica, ambas actividades organizadas con el apoyo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Una de las funciones de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C., es la de dar servicio e información tanto a sus Asociados como a los que no lo sean, en lo relacionado con la enseñanza de la Bioquímica, con la publicación de la Revista de Educación Bioquímica y con la organización del Congreso Anual.

Al igual que en el año anterior y tal como se había previsto, el tema central del Congreso será: **“Diagnóstico de la Enseñanza de la Bioquímica en México”** ya que sólo a través de algunos años podremos reunir información que nos permita acercarnos a conocer la realidad al respecto; durante el Congreso habrá conferencias magistrales y presentaciones libres.

La Asociación tiene el compromiso ante los bioquímicos del país, de poseer y en su caso proporcionar información de las universidades o centros de enseñanza superior en donde existan las carreras de Agronomía, Biología, Ciencias Químicas, Enfermería, Medicina, Nutrición, Odontología, Psicología, Veterinaria, u otra en donde se enseñe bioquímica.

Por tal razón es importante conocer las características de la materia de Bioquímica en las diferentes escuelas o facultades del campo biológico arriba mencionadas, tal es el caso de: A) los planes de estudio, B) los diferentes programas, C) la duración de ellos, D) los materiales de

apoyo (libros, prácticas u otros), E) los índices de inscripción, F) los porcentajes de acreditación, G) de reprobación, H) de deserción, etc.

Para realizar el diagnóstico propuesto y con la finalidad de dar mejor servicio, nos estamos dirigiendo por este conducto a todos los involucrados en el proceso: ya sean directivos de la correspondiente carrera, jefes de Departamento de Bioquímica, coordinadores de la materia, organizadores de curso y profesores, para invitarles a que participen en el XII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. presentando sus datos ya sea en forma oral o en cartel.

Para la participación es indispensable enviar un resumen que deberá ser escrito en letra Arial 10 a 11 puntos, con una extensión máxima de una cuartilla, a espacio sencillo y con un margen de 2.5 cm por lado. En el resumen se debe especificar: título (a mayúsculas), autores y adscripción, introducción, contenido, resultados, discusión y conclusiones. Le pedimos cuidar su presentación y ortografía pues los resúmenes serán publicados en las memorias que se elaborarán en ocasión del XII Congreso tal y como se envíen.

Al original de su trabajo, el cual no deberá tener borrones ni tachaduras, se anexarán de tres copias del mismo, además de la forma de registro y de la fotocopia del pago de su inscripción al Congreso deberá enviarse sin doblar por correo al apartado postal de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica o entregarlos personalmente a la Sra. Marivel García Rojas, en las oficinas de la Asociación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Los trabajos también podrán enviarse por correo electrónico a cualquiera de las direcciones abajo mencionadas; no se aceptarán envíos por Fax. Se sugiere que la presentación del resumen se apegue al siguiente ejemplo:

# LOS APOYOS DIDÁCTICOS EN LA ENSEÑANZA DE BIOQUÍMICA EN LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DEL DESIERTO.

Isabel Trujillo Mier, Mariano Rodríguez Anaya y Carlos Báez Macias. Departamento de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad del Desierto. Av. Lluvia No.22, Acueducto, S. L. P.

RESUMEN...

Fecha límite para el envío de resúmenes: **8 de Julio de 2004.**

Rojas García en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

INFORMES: [reb@bq.unam.mx](mailto:reb@bq.unam.mx) Teléfono: 01 (55) 5623-2170 Fax: 01(55) 5618-2419

## COSTOS

### Socios:

Inscripción y pago de

Membresía anual MN \$ 300.00

### No socios:

Inscripción MN \$ 350.00

El pago deberá hacerse en Sucursales del Banco BBVA Bancomer a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. en la cuenta 0133718123 Sucursal Perisur (3517).

Enviar sus resúmenes junto con una copia de su depósito con sellos bancarios visibles, a: Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. al Apartado Postal 70-281, C. P. 04510, México, D. F. o entregar a Sra. Marivel

## COMITÉ ORGANIZADOR DEL CONGRESO

Dra. Yolanda Saldaña Balmori

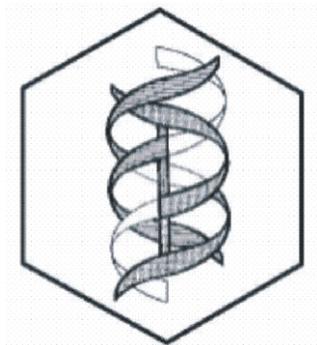
[balmori@laguna.fmedic.unam.mx](mailto:balmori@laguna.fmedic.unam.mx)

Dra. Virginia Sánchez Meza

[sanchezvicky@hotmail.com](mailto:sanchezvicky@hotmail.com)

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

[rsalceda@ifc.unam.mx](mailto:rsalceda@ifc.unam.mx)



## XII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C.

9 y 10 de agosto de 2004, Auditorio Raoul Fournier, Facultad de Medicina, UNAM

### FORMA DE REGISTRO

Nombre \_\_\_\_\_ Apellidos \_\_\_\_\_  
 Miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. Si  No   
 Jefe de Departamento  Coordinador de la materia  Profesor   
 Nombre de la materia \_\_\_\_\_  
 Departamento \_\_\_\_\_  
 Escuela o Facultad \_\_\_\_\_  
 Universidad \_\_\_\_\_  
 ¿Conoce la Revista de Educación Bioquímica (REB), antes BEB ? Si  No   
 ¿La recibe? Si  No  En caso de no recibirla ¿le gustaría recibirla? Si  No

La REB estará disponible en Internet en próxima fecha, para incluirlo en el directorio envíenos su o sus:

Correo(s) E: \_\_\_\_\_

### Domicilio Institucional

Calle y  
 Número \_\_\_\_\_  
 Colonia \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_  
 Estado \_\_\_\_\_ C. P. \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_

### Domicilio Particular

Calle y Número \_\_\_\_\_  
 Colonia \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_  
 Estado \_\_\_\_\_ C. P. \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_  
 Sitio donde desea recibir su correspondencia: Domicilio institucional  Domicilio particular

### Trabajos enviados al Congreso

Número de resúmenes enviados: \_\_\_\_\_

Título de el o los trabajos:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Indique la forma en que desee hacer su presentación: Oral  Cartel  Indistinto   
 Pago realizado a la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. MN \$ \_\_\_\_\_

## PROGRAMA

### Lunes 9 de agosto de 2004

- 8:00 11:00h **Registro e Inscripciones.**
- 11:00 11:15h **INAUGURACIÓN de la Semana de Educación Bioquímica 2004**  
**Dr. José Narro Robles, Director de la Facultad de Medicina, UNAM**
- 11:15 12:15:h **Conferencia**  
**EL TRIPANOTIÓN Y LA TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE *Entamoeba histolytica*: UN NUEVO “BLANCO” A DROGAS.**  
**Dr. Raúl N. Ondarza Vidaurreta, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.**
- 12.15 12:30 h **RECESO**
- 12:30 13:30 h **Conferencia**  
**ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN CURRICULAR EN BIOQUÍMICA**  
**Dr. Federico Martínez Montes, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM**
- 13:30 14:30 h **Presentaciones de trabajos (15-20 min cada uno).**
- 14:30 - 16:00 h **RECESO**
- 16:00 17:00 h **Conferencia**  
**LAS MITOCONDRIAS EN LA HERENCIA MATERNA**  
**Dra. Graciela Meza Ruíz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.**
- 17:00 17:30 h **RECESO**
- 17:30 18:30 h **Presentación del Observatorio de Visualización, UNAM “Ixtli” en la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM**

### Martes 10 de agosto de 2004

- 11:00- 12:00h **Conferencia**  
**ANDRÓGENOS Y PROGESTINAS SINTÉTICAS EN CÁNCER DE MAMA**  
**Dr. Gregorio Pérez Palacios, Coordinador de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM**
- 12:00- 13:00h **Conferencia**  
**CIENCIA Y EDUCACIÓN: EL CONFLICTO HUMANO-TECNOLÓGICO**  
**Dr. Leopoldo de Meis, Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil**
- 13:00- 13:15 h **Receso**
- 13:15- 14:30 h **Presentaciones de trabajos (15-20 min cada uno.)**
- 14:30 - 16:00 h **RECESO**
- 16:00 18:00 h **Presentaciones de trabajos (15-20 min cada uno.)**
- 18:00 19:00 h **CARTELES**
- 19:00h **CLAUSURA del XII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C.**

# ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C.

## CONVOCATORIA PARA NUEVOS SOCIOS

Se invita a los profesores de Bioquímica y ciencias afines, de los distintos centros educativos del país a inscribirse como miembros activos.

### Requisitos:

- 1.- Ser Profesor de Bioquímica o materia afín
- 2.- Presentar carta solicitud
- 3.- Ser propuesto por dos socios activos
- 4.- Presentar *curriculum vitae* el cual será evaluado por la Comisión de Admisión
- 5.- Pago de registro MN \$ 200.00 (el pago deberá hacerse en las sucursales del Banco BBVA Bancomer a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C en la cuenta 0133718123 Sucursal Perisur (3517) en México, D F y entregar comprobante)

### Beneficios:

- 1.- Durante la asistencia al Congreso Anual de la Asociación:
  - a) Actualización en diversos temas.
  - b) Establecer lazos de comunicación entre los docentes a nivel nacional.
  - c) Información editorial de libros de bioquímica.
  - d) El pago anual de su membresía incluye un descuento en el pago de la inscripción al Congreso.
- 2.- Acceso a información de interés:
  - a) Derecho a recibir la Revista de Educación Bioquímica (REB).
  - b) Acceso a un banco de preguntas de la materia.
  - c) Apoyos didácticos para la impartición de la clase.
  - d) Nombres y direcciones de los miembros de la Asociación.
  - e) Acceso al directorio de Departamentos de Bioquímica de diferentes universidades.
  - f) Disponer, una vez elaborado, de un catálogo de información de programas de bioquímica.
- 3.- Asesoría para la elaboración de posibles publicaciones en la REB.
- 4.- Vínculo entre la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A C y las universidades del país, para la organización de cursos de difusión, seminarios, pláticas o conferencias.

# XXXI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UNAM  
Auditorio Raúl Fournier, del 11 al 13 de agosto de 2004.

MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
8:30-9:30 Registro e Inscripciones	9:00-10:10 <b>Dr. Rogelio Hernández</b> Instituto Nacional de la Nutrición <i>"Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental"</i>	9:00-10:10 <b>Dr. Guillermo Elizondo:</b> CINVESTAV, IPN <i>"Uso de Ratones Transgénicos en la Farmacología y Toxicología"</i>
9:30-10:00 INAUGURACIÓN		
10:00-11:15 <b>Dr. Leopoldo De Meis</b> Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil <i>"El mecanismo de transducción de energía en sistemas biológicos"</i>	10:10-11:20 <b>Dr. Julio Polaina</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, España <i>"Ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos"</i>	10:10-11:20 <b>Dr. Luis Vaca</b> Instituto de Fisiología Celular, UNAM <i>"RNA interferente: una herramienta y un novedoso mecanismo de regulación génica"</i>
11:15-11:40 RECESO	11:20-11:40 RECESO	11:20-11:40 RECESO
11:40-12:50 <b>Dr. Alfredo Saavedra</b> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo <i>"Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial"</i>	11:40-12:50 <b>Dr. Gustavo Viniegra</b> Universidad Autónoma Metropolitana: Iztapalapa <i>"La ingeniería metabólica requiere una nueva didáctica de la bioquímica (el caso de la glucólisis)"</i>	11:40-12:50 <b>Dr. Félix Recillas</b> Instituto de Fisiología Celular, UNAM <i>"Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica"</i>
12:50-14:00 <b>Dr. Ricardo Tapia</b> Instituto de Fisiología Celular, UNAM <i>"Mecanismos de Neurodegeneración"</i>	12:50-14:00 <b>Dra. Rosario Muñoz</b> Facultad de Química, UNAM <i>"Genio y figura de la betaina aldehído deshidrogenasa"</i>	12:50-14:00 <b>Dra. Estela Sánchez</b> Facultad de Química, UNAM <i>"Mecanismos de control traduccional en plantas"</i>
14:00-16:00 COMIDA	14:00-16:00 COMIDA	14:00-14:20 CLAUSURA
16:00-17:00 <b>Dr. Leopoldo De Meis</b> Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil <i>"La mitocondria en 3 actos"</i> Proyección de audiovisual comentado por el propio autor. (Auditorio Guevara Rojas, Fac. Medicina, UNAM)	16:00-17:00 <b>Dr. Gustavo Viniegra</b> UAM: Iztapalapa <i>"La ingeniería metabólica requiere una nueva didáctica de la bioquímica (el caso de la glucólisis)". Segunda Parte</i>	
	17:00-18:00 <b>Dr. Fernando Basurto</b> Universidad del Estado de Morelos Presentación: <i>"La Guía Interactiva de Química"</i>	17:00-18:00 <b>Dra. Geneviève Lucet</b> Dir. Gral. Computo Académico, UNAM <i>"Realidad Virtual como una herramienta para el desarrollo de las ciencias Biomédicas III"</i> Sala Ixtli, en DGSCA
18:30-19:30 <b>Dra. Geneviève Lucet</b> Dir. Gral. Computo Académico, UNAM <i>"Realidad Virtual como una herramienta para el desarrollo de las ciencias Biomédicas I"</i> Sala Ixtli, en DGSCA	18:30-19:30 <b>Dra. Geneviève Lucet</b> Dir. Gral. Computo Académico, UNAM <i>"Realidad Virtual como una herramienta para el desarrollo de las ciencias Biomédicas II"</i> Sala Ixtli, en DGSCA	

# 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 cursos, seminarios, 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 deber 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, Apartado Postal 70-253, México, 04510, DF, MÉXICO, o bien al teléfono 5622-5669 y Fax: 5622-5607; correo E: rsalceda@ifc.unam.mx

Dra. Rocío Salceda Sacanelles  
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 el procesador de textos **Word**, 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: nombre 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:

Word K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: The molecular biology of immunosuppression. Editor: Thomson A W. John Willey and Sons Ltd, pp81-104.

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 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 2002. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá obtenerse 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 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 especifica con 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.**