

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. 3

SEPTIEMBRE 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

CONOCIMIENTO PEDAGÓGICO DEL
CONTENIDO: UN NUEVO CONCEPTO
PARA CARACTERIZAR
LA BUENA DOCENCIA
Andoni Garritz.....95

ARTÍCULOS

BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO
Norma Angélica Castro Guerrero y
Rafael Moreno Sánchez.....99

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL
ESTUDIO DEL TEJIDO OSEO
G. Emelí Cortina Ramírez y
J. Víctor Calderón Salinas.....107

ENFOQUES MOLECULARES DE LA
METÁSTASIS TUMORAL
Miguel Ángel Mayoral Chávez, Edgar Zenteno
Galindo, Blanca Espinosa Mancilla, Salvador
Martínez Cairo, Jorge Guevara Fonseca.....117

OTRAS COMUNICACIONES

LAS MITOCONDRIAS EN LA HERENCIA
MATERNA. EL CASO DE LA SORDERA
Dra. Graciela Meza Ruíz.....123

FOROS DE DISCUSIÓN
Dr. José Víctor Calderón Salinas.....125

FORO DE DISCUSIÓN SOBRE LOS
CIENTÍFICOS
Dra. Graciela Meza Ruíz.....125

LOS CIENTÍFICOS ¿QUIÉNES SOMOS?
Dra. Graciela Meza Ruíz.....125

¿POR QUÉ INVERTIR EN LA CIENCIA
MEXICANA?
Dr. Gabriel del Río126

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CONTROL
METABÓLICO
Sara Rodríguez-Enríquez y David G.
Mendoza-Cozatl128

CRUCIBIOQ. AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y
PROTEÍNAS
Yolanda Saldaña Balmori129

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Sara Rodríguez-Enríquez y David G.
Mendoza-Cozatl 131

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori133

CONVOCATORIAS

NUEVOS SOCIOS.....134

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....135

ACTUALIZACIÓN DE DATOS DE LOS
SUSCRIPTORES..... 136

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....137

EDITORIAL

CONOCIMIENTO PEDAGÓGICO DEL CONTENIDO: UN NUEVO CONCEPTO PARA CARACTERIZAR LA BUENA DOCENCIA

La propuesta de Shulman

En 1983, Lee S. Shulman (1999), actualmente el presidente de la “Carnegie Foundation for the Advancement of Teaching”, dictó una conferencia en la Universidad de Texas, en Austin, la cual tituló “El paradigma perdido en la investigación sobre la enseñanza”. Especuló sobre el tema a lo largo de su presentación y propuso hacia el final que dicho paradigma era el del pensamiento del profesor con relación a la materia de estudio y su interacción con la pedagogía llevada a cabo durante la clase.

Esta propuesta sorprendió a toda su audiencia ya que hasta ese momento los estudios sobre los profesores y la enseñanza se habían enfocado en las formas de comportamiento del maestro más que en las de su pensamiento. Shulman, que había empezado su carrera como profesor de Psicología Educativa y Educación Médica en la Universidad Estatal de Michigan de 1963 a 1982, y se mudó posteriormente a la Facultad de Educación de la Universidad de Stanford, había tratado a los profesores de una manera muy genérica como pensadores. Por otra parte, los estudios de moda sobre la psicología cognitiva del aprendizaje se habían dado estrictamente desde la perspectiva de los aprendices y la investigación sobre la enseñanza había tendido a ignorar los puntos con relación a los profesores.

Para abordar su propuesta Shulman planteó durante su conferencia algunas preguntas como las siguientes:

- ¿Cómo el estudiante universitario exitoso que se convierte en profesor novato transforma su pericia en la materia en una forma que los estudiantes de bachillerato puedan comprender?
- ¿Cuáles son las fuentes de las analogías, metáforas, ejemplos, demostraciones y reformulaciones que el profesor utiliza en el aula?
- ¿Cómo los profesores toman una parte de un texto y transforman su entendimiento en instrucción que sus estudiantes puedan comprender?

Tres años más tarde, Shulman (1986) publica las primeras ideas que resultan de los estudios sobre la interacción

entre el contenido temático de la materia y la pedagogía. Presenta el concepto “Pedagogical Content Knowledge” para referirse al producto de dicha interacción. En este trabajo se burla de la frase de un siglo atrás de George Bernard Shaw: “El que puede, hace. El que no puede, enseña” y la reescribe al final de su artículo como “Aquellos que pueden, hacen. Aquellos que entienden, enseñan”. Shulman acaba de fungir como el último presidente de la Asociación Americana de Investigación Educativa (AERA, por sus siglas en inglés) y lo fue también de la Academia Nacional de Educación (NAE).

EL CONOCIMIENTO PEDAGÓGICO DEL CONTENIDO

En un segundo artículo aborda nuevamente el tema del Conocimiento Pedagógico del Contenido (CPC). Shulman (1987, P. 9) nos dice “es el conocimiento que va más allá del tema de la materia *per se* y que llega a la dimensión del conocimiento del tema de la materia *para la enseñanza*”.

En el CPC, se incluyen, “*las formas más útiles de representación de las ideas; las analogías, ilustraciones, ejemplos, explicaciones y demostraciones más poderosas; en pocas palabras, las formas de representación y formulación del tema que lo hace comprensible a otros*”, es decir, todo el esfuerzo que hace el profesor para hacer comprensible su tema en particular.

El CPC también incluye un entendimiento de lo que hace fácil o difícil el aprendizaje de tópicos específicos: “*las concepciones y preconcepciones que los estudiantes de diferentes edades y antecedentes traen al aprendizaje de los tópicos y lecciones más frecuentemente enseñados*”. Si estas preconcepciones son errores conceptuales, como lo son frecuentemente, los profesores necesitan el conocimiento de las estrategias más probables de ser fructíferas en la reorganización del entendimiento de los aprendices, ya que es improbable que los cerebros de estos aprendices se comporten como pizarras blancas. Shulman (1987) plantea la noción del conocimiento básico con que el profesor debe contar, e incluye al menos los siguientes siete tipos de conocimiento:

- Conocimiento del contenido temático de la materia o asignatura (CA)

Conocimiento pedagógico general
 Conocimiento curricular (CC)
 Conocimiento pedagógico del contenido (CPC)
 Conocimiento de los aprendices y sus características
 Conocimiento del contexto educativo
 Conocimiento de los fines, propósitos y valores educativos y sus bases filosóficas e históricas

Propone Shulman que mientras más amplio sea el conocimiento del profesor en cada uno de estos tópicos, mayor será su calidad en la enseñanza. Pone énfasis en el CPC como fuente de la buena docencia.

Actualmente el CPC está incluido en los Estándares de Desarrollo Profesional de los Profesores de Ciencias de los Estados Unidos (National Research Council, pp. 62-68, 1996; Enfield, 1999) y se ha tomado ese país como una guía para la reforma educativa en los programas de formación de los profesores de ciencias (ver, por ejemplo, Talanquer, 2003).

En la didáctica de las ciencias, el CPC ha sido usado como un término para describir cómo los profesores novatos aprenden poco a poco a *interpretar y transformar* su contenido temático del área en unidades de significados comprensibles para un grupo diverso de estudiantes (Van Driel, Verloop y de Vos, 1998). De manera similar, Veal y MaKinster (1999) definen el CPC como la habilidad para *traducir* el contenido temático a un grupo diverso de estudiantes usando estrategias y métodos de instrucción y evaluación múltiples, tomando en cuenta las limitaciones contextuales, culturales y sociales en el ambiente de aprendizaje.

Cochran, DeRuiter y King (1993), en un sentido más amplio, definen el CPC como el entendimiento integrado de las cuatro componentes que posee un profesor: pedagogía, conocimiento temático de la materia, características de los estudiantes y el contexto ambiental del aprendizaje. Idealmente, el CPC se genera como una síntesis del desarrollo simultáneo de estos cuatro componentes.

Algunas referencias recientes sobre el CPC

Existen diversos escritos recientes sobre el CPC y sus aspectos relacionados, dentro de los cuales habría que mencionar el libro editado por Julie Gess-Newsome y Norman G. Lederman (1999), *Examining Pedagogical Content Knowledge*, el cual tiene un enfoque sobre la educación en ciencias y representa el primer intento sistemático para sintetizar la investigación sobre el CPC, el modelo del cual fue derivado, y para trazar sus implicaciones para la investigación y la práctica.

En los cambios que se han suscitado en los últimos años en los programas de educación de profesores de ciencias, De Jong, Korthagen y Wubbels (1998) ubican como una tendencia común importante, el creciente interés en los

pensamientos de los profesores de ciencias, especialmente en el conocimiento de la asignatura y en sus concepciones del aprendizaje.

Barnett y Hodson (2001) plantean un nuevo término: "Conocimiento Pedagógico del Contexto" en el camino para entender qué saben los buenos profesores, y qué los diferencia de los no tan buenos. Incluyen en él cuatro tipos de conocimiento, con los siguientes porcentajes de cada uno en su investigación de caracterización de frases emitidas por seis buenos profesores de la enseñanza secundaria (puede observarse que la mayor proporción de las frases empleadas por los profesores en las entrevistas tienen que ver con el CPC):

Conocimiento académico y de investigación	19.7%
Conocimiento Pedagógico del Contenido	44.5%
Conocimiento profesional	21.2%
Conocimiento del salón de clases	14.6%

Barnett y Hodson incluyen, dentro del Conocimiento Pedagógico del Contenido el uso de:

- estrategias para enseñar ciencia.
- estrategias para evaluar el aprendizaje de las ciencias.
- recursos científicos.
- recursos de la comunidad.
- estrategias para integrar la ciencia con otros temas.
- estrategias para personalizar la educación en ciencias.

Recientemente, De Jong, Veal y Van Driel (2002) realizan una recopilación de los estudios llevados a cabo con un enfoque sobre el conocimiento básico de los profesores de química, centrándose sobre el CA y el CPC, esto es, los dos tipos de conocimiento que están determinados por la naturaleza del tópico específico enseñado.

Estos autores resumen la variedad de aspectos del CPC de los profesores de química de la siguiente manera:

- i) Los profesores de química con insuficiente CPC de tópicos específicos pueden, en ocasiones, realizar demostraciones de tópicos específicos que pueden reforzar las concepciones alternativas de los estudiantes.
- ii) Un excelente CA, el conocimiento de cómo aprenden los estudiantes y el conocimiento de representaciones alternativas, son requisitos para la selección y uso de explicaciones analógicas apropiadas y efectivas.

Vicente Talanquer (2004) dice que hasta la aparición del concepto de CPC hemos dado bandazos en el proceso de formación de profesores. Insiste en que transformar el conocimiento disciplinario en formas que resulten significativas para los estudiantes requiere que el docente posea el CPC suficiente para

que:

“Identifique las ideas, conceptos y preguntas centrales asociados con un tema.

Reconozca las probables dificultades conceptuales.

Identifique preguntas, problemas o actividades que obliguen al estudiante a reconocer y cuestionar sus ideas previas.

Seleccione experimentos, problemas o proyectos que permitan que los estudiantes exploren conceptos centrales.

Construya explicaciones, analogías o metáforas que faciliten la comprensión de conceptos abstractos.

Diseñe actividades de evaluación que permitan la aplicación de lo aprendido en la resolución de problemas en contextos realistas y variados.”

¿Cómo capturar el CPC de los profesores?

Grossman (1990) identifica cuatro fuentes a partir de las cuales el CPC se genera y desarrolla:

- la observación de las clases, tanto en la etapa de estudiante como en la de profesor-estudiante;
- la formación disciplinaria;
- los cursos específicos durante la formación como profesor y
- la experiencia de enseñanza en el salón de clases.

Las dificultades para conocer el CPC de los profesores han sido expresadas por Baxter y Lederman (1999). Estos autores nos citan como fuentes para extraer el CPC las siguientes:

- Pruebas de lápiz y papel
- Observación de las clases
- Elaboración de mapas conceptuales
- Representaciones pictóricas
- Entrevistas
- Evaluaciones multimétodo

Más recientemente, Loughran *et al* (2004) nos hablan de las razones por las cuales resulta difícil reconocer y articular el CPC.

- Puede no resultar evidente para el investigador en los confines de unas cuantas lecciones.
 - Mucho del conocimiento de los profesores es tácito, se trata de una construcción muy interna
- Nos presentan dos herramientas para recopilar el CPC:

- CoRe (Content Representation)
- PaP-eRs (Professional and Pedagogical experience Repertoires)

Para obtener la Representación del Contenido (CoRe) empiezan por extraer del profesor las ideas o conceptos centrales de su exposición del tema, y para cada idea central le preguntan:

- A. ¿Qué intentas que los estudiantes aprendan alrededor de esta idea?
- B. ¿Por qué es importante para los estudiantes aprender esta idea?
- C. ¿Qué más sabes sobre esta idea? (Lo que tú no vas a enseñar por ahora a los estudiantes).
- D. Dificultades y limitaciones conectadas a la enseñanza de esta idea.
- E. Conocimiento acerca del pensamiento de los estudiantes que influye en tu enseñanza de esta idea.
- F. Otros factores que influyen en la enseñanza de esta idea.
- G. ¿Qué procedimientos empleas para que los alumnos se comprometan con la idea?
- H. ¿Qué maneras específicas utilizas para evaluar el entendimiento o confusión de los alumnos sobre la idea?

Los Repertorios de Experiencia Profesional y Pedagógica (PaP-eRs), por su parte, son explicaciones narrativas del CPC de un profesor para una pieza particular de contenido científico. Cada PaP-eR “desempaca” el pensamiento del profesor alrededor de un elemento del CPC de ese contenido y está basado en observaciones de clase y comentarios hechos por el profesor durante las entrevistas en las cuales se desarrolla el CoRe.

Se intenta que los PaP-eRs representen el *razonamiento* del profesor, o sea, el pensamiento y acciones de un profesor de ciencia exitoso al enseñar un aspecto específico del contenido científico. La función de la narrativa es elaborar y adentrarse en los elementos interactivos del CPC del profesor, de forma que sea significativa y accesible al lector, y que pueda ser útil para fomentar la reflexión acerca del CPC bajo consideración.

Conclusión

Una conclusión general de todos estos estudios citados es que para contribuir a su comprensión cabal es necesario realizar estudios sobre el CPC en tópicos específicos. Hacen falta más estudios sobre el conocimiento básico con que cuentan los profesores de bioquímica de nuestros países y es muy importante conocer este aspecto para mejorar el proceso educativo de la bioquímica. Con lo que hemos escrito sobre el CPC basta para dar una idea de la revolución que han traído las ideas de Shulman al proceso de formación y evaluación del profesorado. Si existe algún profesor o investigador interesado en hallar el conocimiento pedagógico de contenidos de la bioquímica, favor de ponerse en contacto con el autor de esta editorial.

Andoni Garriz
Facultad de Química, UNAM
andoni@servidor.unam.mx

REFERENCIAS

1. Barnett, J y Hodson, D (2001). Pedagogical Context Knowledge: Toward a Fuller Understanding of What Good Science Teachers Know, *Science Education* 85:426-453, 2001.
2. Baxter, J A and Lederman, N G Assessment and Measurement of Pedagogical Content Knowledge. In Gess-Newsome, J, Lederman, N. G. (eds.), *Examining Pedagogical Content Knowledge*. (Pp. 147-162), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.
3. Cochran, K F, DeRuiter, J A, King, R A, Pedagogical content knowing: an integrative model for teacher preparation, *Journal of Teacher Education*, 44, 263-272, 1993.
4. De Jong, O, Veal, W R, Van Driel, J H, Exploring Chemistry Teachers' Knowledge Base, en J K Gilbert y otros (Eds.), *Chemical Education: Towards Research-based Practice*, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 369-390, 2002.
5. De Jong, O, Korthagen, F y Wubbels, T, Research on Science Teacher Education in Europe: Teacher Thinking and Conceptual Change, en Fraser, B J y Tobin, K G (Eds.), *International Handbook of Science Education*, Kluwer Academic Publishers, Printed in Great Britain, pp. 745-758, 1998.
6. Enfield, M, Content and Pedagogy: Intersection in the NSTA Standards for Science Teacher Education. Consultada por última vez el 20 de febrero de 2004 en la URL <http://www.msu.edu/~dugganha/PCK.htm>, 1999.
7. Gess-Newsome, J, Lederman, N G, Examining Pedagogical Content Knowledge. The Construct and its Implications for Science Education, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, xii + 306 pp, 1999.
8. Grossman, P L, The making of a teacher: Teacher knowledge and teacher education, New York, Teacher College Press, 1990.
9. Loughran, J J, Mulhall, P and Berry, A In Search of Pedagogical Content Knowledge in Science: Developing ways of Articulating and Documenting Professional Practice. *J. Res. Sci. Teach.* 41(4), 370-391, 2004.
10. National Research Council, *National Science Education Standards*, Washington, D C, National Academic Press, ix + 252 pp, 1996.
11. Shulman, L S, "Those Who Understand: Knowledge Growth in Teaching", *Educational Researcher*, 15(2), 414, 1986.
12. Shulman, L S, *Knowledge and Teaching: Foundations of the New Reform*, Harvard Educational Review 57(1), 122, 1987.
13. Shulman, L S Foreword en Gess-Newsome, J, Lederman, N G (Eds.), *Examining Pedagogical Content Knowledge. The Construct and its Implications for Science Education*. (Pp. ix-xii). Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1999.
14. Talanquer, V, Novodvorsky, I, Slater, T F, Tomanek, D, A Stronger Role for Science Departments in the Preparation of Future Chemistry Teachers, *Journal of Chemical Education* 80(10), 1168-1171, 2003.
15. Talanquer, V, Formación Docente: ¿Qué conocimiento distingue a los buenos maestros de química?, *Educación Química* 15(1), 52-58, 2004.
16. Van Driel, J H, Verloop, N, de Vos, W, Developing Science Teachers' Pedagogical Content Knowledge, *Journal of Research in Science Teaching*, 35(6), 673-695, 1998.
17. Veal, W R, MaKinster, J G, "Pedagogical Content Knowledge Taxonomies", *Electronic Journal of Science Education*, 3(4), 1-18, 1999. Versión electrónica consultada el 20 de febrero, 2004, en la siguiente URL <http://unr.edu/homepage/crowther/ejse/ejsev3n4.html>

BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO*

NORMA ANGÉLICA CASTRO GUERRERO Y RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

RESUMEN

La formación de tetrapirroles es esencial para la producción de porfirinas, las cuales constituyen los grupos hemo (con $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) de los citocromos y de proteínas transportadoras de oxígeno (hemoglobina), y los pigmentos (con Mg^{2+}) de las clorofilas y las bacteriofilas (en el caso de bacterias). Existen dos diferentes rutas para sintetizar al precursor δ -aminolevulinato a partir del cual se obtiene el grupo hemo después de siete reacciones en común. La regulación de esta vía biosintética es al parecer a través del grupo hemo, el cual tiene un efecto inhibitorio en ambas vías mediante diferentes mecanismos. También se ha determinado que la concentración de oxígeno, la fuente de carbono y los metales pesados tienen efectos sobre esta vía. El conocimiento sobre esta biosíntesis ha permitido la utilización biotecnológica de algunos de los intermediarios o productos finales, también con fines de investigación básica.

PALABRAS CLAVE: Rutas biosintéticas, grupo hemo.

ABSTRACT

Tetrapyrrole biosynthesis is essential for porphyrin production. Two different pathways synthesize heme precursor δ -aminolevulinic acid. The heme group has an inhibitory effect on both routes. Oxygen level concentration, carbon source and heavy metals also have an influence on heme biosynthesis. The knowledge of the heme synthesis pathways has led to the biotechnological application of its precursors.

KEY WORDS: Biosynthetic pathways, heme group.

INTRODUCCIÓN

Los hemos son compuestos que están directamente involucrados en reacciones de óxidoreducción, oxigenación, hidroxilación y en aquellas relacionadas al transporte y almacenamiento de oxígeno y otros gases biatómicos (CO, NO). Asociados a proteínas, los hemos pueden participar en la unión de ligandos y servir de sensores durante la transducción de señales dependientes de oxígeno y óxido nítrico en *Rhizobium* (1) y en mamíferos (2). La vía de síntesis del grupo hemo afecta directamente el metabolismo oxidativo al estar relacionado con la utilización de hierro, el cual puede promover

procesos oxidativos dañinos.

La formación de especies reactivas de oxígeno a partir del grupo hemo puede surgir durante la oxidación aeróbica del δ -aminolevulinato catalizada en presencia de metales o bien mediante reacciones fotoquímicas de la protoporfirina IX (precursor del grupo hemo).

Además de conferir estabilidad a las proteínas y participar en la diferenciación celular, se ha propuesto al grupo hemo como modulador de la expresión genética a nivel traduccional y transcripcional (3,4).

Un ejemplo de esto último es la activación por el grupo hemo del factor transcripcional HAP1, el cual a

su vez estimula la expresión de las enzimas de la fosforilación oxidativa en levadura, cuando la concentración de oxígeno disminuye a niveles críticos.

Si bien los grupos hemos forman parte de los citocromos que participan en la transferencia de electrones en las mitocondrias en condiciones aeróbicas, también son importantes en sistemas anaeróbicos bacterianos que emplean aceptores de electrones alternos como nitrato en sus complejas cadenas respiratorias (Fig. 1). Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* el grupo hemo se sintetiza activamente en condiciones anaeróbicas, aunque disminuya su requerimiento de

* Recibido: 11 mayo 2004 Aceptado: 05 agosto 2004

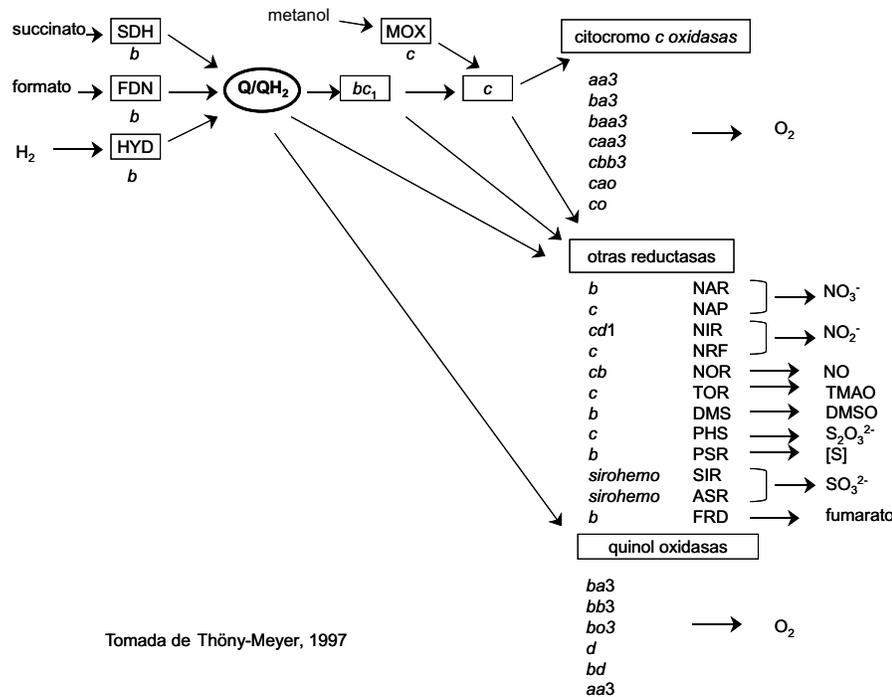


FIGURA 1. Citocromos presentes en cadenas respiratorias bacterianas. SDH, succinato deshidrogenasa; FDN, formato deshidrogenasa; HYD, hidrogenasa; MOX, metanol deshidrogenasa; NAR, nitrato reductasa membranal; NAP, nitrato reductasa periplásmica; NIR, nitrato reductasa; NRF, nitrato reductasa dependiente de formato; NOR, óxido nítrico reductasa; TOR, óxido trimetilamina reductasa; DMS, DMSO reductasa; PHS, tiosulfato reductasa; PSR, polisulfuro reductasa; SIR, sulfito reductasa; ASR, sulfito reductasa II; FRD, fumarato reductasa. Tomado de Thöny-Meyer (5).

citocromos para los complejos respiratorios (4).

Recientemente se han descubierto algunas nuevas características funcionales del grupo hemo en proteínas. En la guanilato ciclase, el óxido nítrico activa a la enzima cuando se une al hemo que contiene, para la posterior formación del GMPc y el inicio de una cascada de señalización. La hemoproteína CcmE presente en *Escherichia coli* actúa como chaperona para transferir el hemo al apocitocromo c durante la biogénesis de citocromos. Hem-AT es el primer ejemplo de una proteína en arqueas que actúa como sensor del oxígeno atmosférico por medio del grupo hemo en el dominio en la región N-terminal, el cual controla la actividad de la región C-terminal (6).

RUTAS BIOSINTÉTICAS

En levaduras y animales, la síntesis del hemo se distribuye entre la mitocondria y el citosol. El proceso

comienza en la mitocondria debido a que uno de los precursores está presente sólo en este organelo. En células vegetales la biosíntesis del grupo hemo se realiza dentro del cloroplasto, mientras que en bacterias ocurre en el citosol.

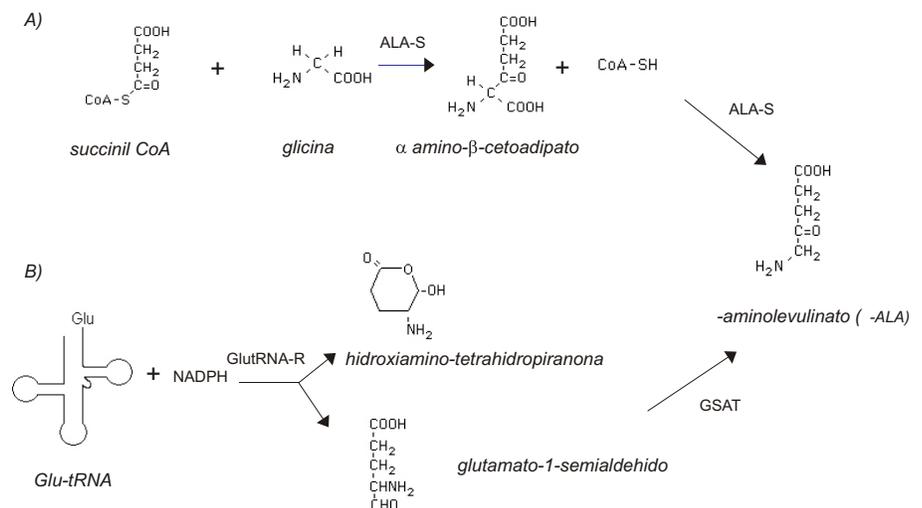


FIGURA 2. Formación de -aminolevulinato (-ALA) por dos diferentes vías. A) Ruta C4, a partir de succinil-CoA y glicina; B) Ruta C5 a partir de glutamato tRNA. (7,8)

El primer paso de la vía es la síntesis de δ -aminolevulinato (δ -ALA), para lo cual se han encontrado dos diferentes rutas (Fig. 2):

- VIA C4

Esta vía se encuentra en levaduras, células de mamíferos y algunas proteobacterias como *Rhodobacter*, *Rhizobium* y *Rickettsia*. En esta vía, δ -ALA se sintetiza por la condensación de succinil-CoA y glicina en una reacción catalizada por la ALA sintetasa (ALA-S), la cual requiere piridoxal 5'-fosfato como cofactor esencial (Fig. 2A). La reacción ocurre en dos pasos: la condensación de los sustratos para formar el complejo intermediario enzima- α -amino β ceto adipato y su descarboxilación para formar δ -ALA. La forma activa de la enzima es un homodímero. En esta ruta, la ALA-S es una de las enzimas que se ha caracterizado más ampliamente (Tabla I).

- VIA C5

El δ -ALA también puede sintetizarse a partir del esqueleto C5 del glutamato. Esto sucede en cloroplastos de plantas y algas verdes, además de arqueas, cianobacterias y en algunas eubacterias como *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Esta ruta se inicia con el

TABLA I
PROPIEDADES DE LA δ -ALA SINTETASA
DE DIFERENTES ORGANISMOS

Modelo	Peso molecular*	pH _{óptimo}	Km _{glicina} (M)	Km _{succCoA} (M)	Km _{piridoxalP} (M)
bacteria					
<i>Paracoccus denitrificans</i>	68	7.0	1.2 x10 ⁻²	1.0 x10 ⁻⁵	1.1 x10 ⁻⁵
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	105-110	7.4-7.6	1.0 x10 ⁻²	2.5 x10 ⁻⁵	4-5x10 ⁻⁶
Eritrocito					
Pollo	-	7.2	6.0 x10 ⁻³	-	-
Conejo	200	7.6	1.0 x10 ⁻²	6.0 x10 ⁻⁵	-
Cuyo	105	-	1.1-1.6 x10 ⁻²	-	-
Higado					
Pollo	87	-	-	-	-
Cuyo	107	-	3.3 x10 ⁻³	-	-
Rata	110	7.6	1.0x10 ⁻²	7.0x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁶
protista					
<i>Euglena gracilis</i>	138	7.8	8.5 x10 ⁻³	2.5x10 ⁻⁵	2.9x10 ⁻⁶

* Calculado de la traducción de la secuencia del gen (en kilodaltones)

Los valores fueron obtenidos de referencias que son omitidas por razones de presentación

glutamil-tRNA, el cual se reduce a glutamato-1-semialdehído por la glutamil-tRNA reductasa (Fig. 2B).

La identificación de esta vía surgió por el descubrimiento de un cofactor que contenía RNA. El análisis de las secuencias de los genes de cloroplastos de espinaca, tabaco, *Euglena gracilis*, *Chlamydomonas reinhardtii* y de algunas bacterias ha mostrado características genéticas únicas que corresponden a un tRNA de glutamato.

Un análisis más completo de estas secuencias también mostró que el tRNA^{GLU} usualmente presente en estos organismos, es el sustrato para la síntesis de tetrapirroles.

El Glu-tRNA se genera en presencia de ATP a partir de glutamato y tRNA por la glutamil-tRNA sintetasa, una enzima perteneciente a la familia de las aminoacil-tRNA sintetisas (9). Aunque esta enzima cataliza el primer paso de la síntesis de hemo por la vía C5, no se ha encontrado evidencia de que alguno de los intermediarios regule su actividad.

La glutamil tRNA reductasa es

una enzima inusual pues su estructura cristalográfica reveló una forma de V extendida. El análisis de las secuencias de aminoácidos disponibles ha mostrado un 60% de similitud con base en las regiones más conservadas (10), como el sitio de unión de piridinucleótidos.

El único cofactor requerido para la actividad de la enzima es el NADPH, mientras que el NADH, aún a concentraciones altas, no induce una actividad significativa.

La glutamato-1-semialdehído aminotransferasa (GSAT) cataliza la transaminación de glutamato-1-semialdehído a δ -ALA en presencia de fosfato de piridoxal o piridoxamina-5-fosfato. Se ha identificado y caracterizado el gen de GSAT en diferentes organismos. Además, se ha logrado purificar a la enzima de bacterias y cloroplastos de plantas. Esta enzima corresponde estructural y catalíticamente a las aminotransferasas típicas. La forma activa es dimérica en la mayoría de los organismos y las subunidades pesan entre 44 y 46 kDa (10).

En el protista parásito *Trypanoso-*

ma cruzi no se han detectado actividades de las enzimas involucradas en la biosíntesis del grupo hemo, el cual es provisto por el hospedero.

En cambio, en el protista de vida libre *E. gracilis* existen ambas rutas, al igual que en una cepa del alga verde *Scenedesmus obliquus* (11,12).

Utilizando los precursores marcados radioactivamente de δ -ALA, glutamato y glicina, se pudo determinar que en células fotosintéticas de *E. gracilis* coexisten las dos vías, mientras que en células heterotróficas sólo la ALA-S es funcional (11). Las enzimas de ambas vías son codificadas en el núcleo, pero son transferidas a compartimentos diferentes. La ruta C5 provee δ -ALA para la síntesis de hemos y clorofila en el cloroplasto de la célula fotosintética, mientras que la vía de condensación de succinil CoA y glicina (C4) se utiliza en la síntesis de hemos no plastídicos. Por lo tanto, las dos vías en *E. gracilis* se encuentran separadas y compartimentalizadas con su propio grupo de enzimas para sintetizar su respectiva poza de δ -ALA (11).

En el protista parásito *Plasmodium falciparum* existe la síntesis *de novo* del grupo hemo por una ruta similar a la de los eritrocitos que invade (vía C4) utilizando su propia ALA-S, la cual es inmunológicamente diferente a la del hospedero. Sin embargo, el parásito requiere importar a la ALA deshidratasa (ALA-D) y posiblemente al resto de las enzimas del hospedero. Además, también importa el grupo hemo del organismo que infecta para procesos de destoxificación (13).

Después de la formación de δ -ALA, las rutas C4 y C5 comparten las siguientes siete reacciones para la síntesis final del grupo hemo. Las enzimas involucradas y la naturaleza de los intermediarios se encuentran muy conservadas en todos los organismos (Fig. 3).

En *Bradyrhizobium japonicum* se analizó una mutante deficiente en la ALA-S y se demostró que esta enzima

no es necesaria para la síntesis del hemo en los nódulos formados por esta bacteria, ya que es capaz de usar la poza de δ -ALA de su hospedero. Estos resultados sugieren que la siguiente enzima en la vía, la ALA-D (también denominada porfobilinógeno sintetasa), es realmente la primera enzima esencial en la síntesis de hemos en esta bacteria y no la ALA-S (14).

El transporte de δ -ALA hacia el citosol en la vía C4 no se ha dilucidado totalmente. Sin embargo, datos obtenidos en *Saccharomyces cerevisiae* indican que este compuesto es transportado por una permeasa. Ensayos de inhibición con el ácido aminobutírico (GABA) mostraron que δ -ALA y GABA comparten el mismo transportador (15).

La ALA-D es una metaloenzima que puede estar asociada a zinc, en el caso de la que se encuentra en el citosol de células animales y en la mayoría de las bacterias, o a magnesio cuando está en cloroplastos de plantas. La diferencia en el metal les otorga diferencias en el pH óptimo, en su termoestabilidad y en la sensibili-

dad hacia metales pesados como plomo y cadmio (14). Se ha determinado una K_i aparente de la ALA-D de $0.12 \mu\text{M}$ para el plomo en eritrocitos, mientras que $10 \mu\text{M}$ de cadmio inhibe el 55% de la actividad (Prasad A. R., datos no publicados).

El uroporfirinógeno III se sintetiza en el citosol por la acción de la porfobilinógeno desaminasa (PBG-D) y la uroporfirinógeno III sintetasa (URO-S), para después ser descarboxilado a coproporfirinógeno III por la uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D). El coproporfirinógeno III se transporta de regreso a la mitocondria para las subsecuentes reacciones de la síntesis del grupo hemo (Fig. 3). Sin embargo, no existe información clara acerca del transporte de este intermediario hacia la mitocondria.

La coproporfirinógeno oxidasa es una enzima mitocondrial (en células de mamífero) que cataliza la síntesis de protoporfirinógeno IX (o III de acuerdo a la nomenclatura anterior).

Esta enzima se encuentra asociada al lado interno de la membrana externa mitocondrial, aunque también está documentada su existencia en el

citosol de *S. cerevisiae* (16). El protoporfirinógeno IX se transporta hacia la matriz mitocondrial en donde se transforma a protoporfirina IX por acción de la protoporfirinógeno oxidasa, la cual está asociada a la membrana interna mitocondrial. A continuación, la vía se ramifica para que se lleve a cabo la inserción del metal. Por un lado, la enzima Mg^{2+} quelatasa inserta magnesio en la protoporfirina IX para la síntesis de clorofilas; y por el otro, la ferroquelatasa cataliza la inserción de hierro en la protoporfirina IX para la síntesis del grupo hemo. Esta enzima requiere hierro (II) (K_m $0.16 \mu\text{M}$), y ácido ascórbico y cisteína como agentes reductores.

La ferroquelatasa también puede insertar otros metales como zinc, con una K_m de $9 \mu\text{M}$. Al igual que la ALA-D, la ferroquelatasa es susceptible a metales pesados, principalmente al plomo con valores de K_i de 0.1 a 0.65 mM (17).

REGULACIÓN

Se ha propuesto que en células animales no eritroides el principal sitio de regulación de la vía C4 es la ALA-S, pues se inhibe por el producto final, el grupo hemo (18), el cual es tóxico cuando se acumula (19). Aunque esta enzima es considerada importante dentro de la regulación de la vía en levaduras, también existe evidencia sobre el papel regulatorio que tiene el grupo hemo sobre la ALA-D (20).

En bacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa* o *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, donde los primeros pasos de la biosíntesis son a través de la vía del glutamato (ruta C5), la regulación no se ha establecido claramente, aunque se ha considerado a la aminotransferasa como sitio de regulación (21). Al someter a fermentación a sistemas bacterianos, donde no hay requerimiento de enzimas respiratorias, los niveles generales de hemo disminuyen, indicando que el oxígeno, la fuente de carbono y el nitrato pueden ser señales

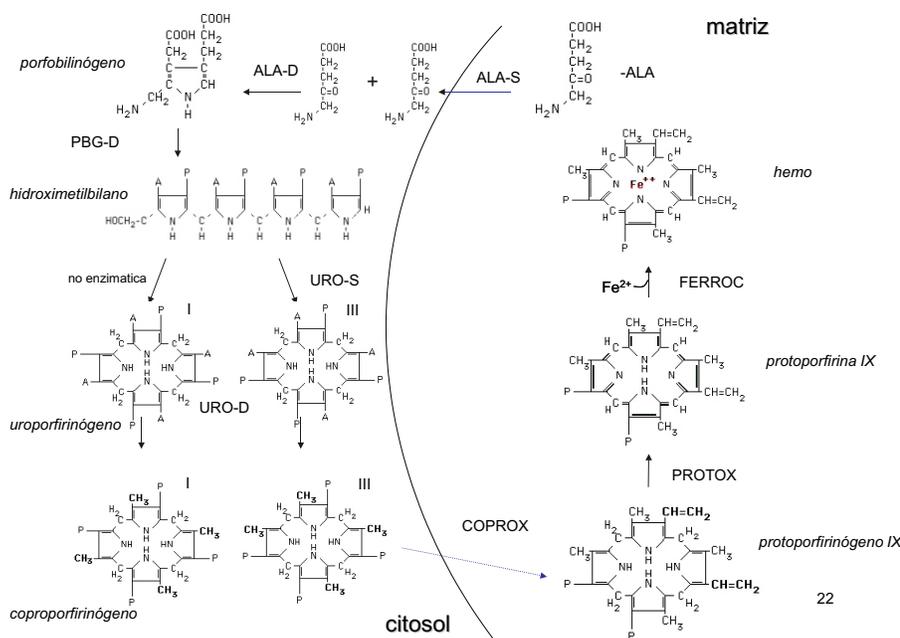


FIGURA 3. Reacciones comunes en las rutas biosintéticas del grupo hemo representadas en el modelo de levadura. ALA-S, ALA-D; PBG-D, porfobilinógeno deaminasa; URO-S, uroporfirinógeno sintetasa; URO-D, uroporfirinógeno descarboxilasa; COPROX, coproporfirinógeno oxidasa; PROTOX, protoporfirinógeno oxidasa; FERROC, ferroquelatasa.

indirectas para su biosíntesis (4).

En general, son dos las etapas críticas de la biosíntesis del hemo en la vía C5:

1) la formación de δ -ALA, en donde, a diferencia de la vía C4, el grupo hemo no tiene efecto inhibitorio sobre la glutamil tRNA reductasa purificada. Sin embargo, al adicionar el grupo hemo a extractos celulares de *E. coli* se observa disminución de la actividad de esta enzima, implicando que intervienen otros factores celulares en la regulación de su actividad.

Otros experimentos revelaron que el efecto del grupo hemo sobre la reductasa es el de inducir cambios conformacionales que la hacen susceptible a proteólisis (4). Además, se observó que en *S. enterica* serovar *typhimurium*, al limitar la producción del hemo, había un aumento de 10 a 25 veces en la actividad de la reductasa acompañado de un aumento en el nivel de proteína. Estos resultados sugirieron que existe regulación de la glutamil tRNA reductasa a nivel transcripcional y en la modulación de la estabilidad de la proteína.

2) la síntesis de protoporfirinógeno IX a partir de coproporfirinógeno III por una familia de coproporfirinógeno oxidasas. La enzima HemF requiere oxígeno molecular para su catálisis y por lo tanto no puede operar en condiciones anaeróbicas. HemZ y HemN operan en condiciones anaeróbicas y no presentan similitud en la secuencia de aminoácidos con la enzima dependiente de oxígeno (22).

B. japonicum posee una ALA-D inusual que requiere magnesio en vez de zinc, la cual se induce por disminución en los niveles de oxígeno. Además, se ha descrito que la concentración de hierro regula la síntesis de esta proteína (14).

Se han identificado, clonado y caracterizado a nivel bioquímico los genes y enzimas de la biosíntesis del grupo hemo en *S. cerevisiae* (23). Hoffman y colaboradores (23) analizaron las actividades específicas (kcat) y las Km de las enzimas

purificadas (Tabla II) para concluir que la ALA-D, la PBG-D y la URO-D eran las enzimas con mayor control sobre la vía. Con base en estos datos, sobreexpresaron las enzimas propuestas como regulatorias. Los resultados mostraron que al sobreexpresar a la ALA-D se registraba un aumento de su producto PBG mientras que al sobreexpresar a la siguiente enzima (PBG-D), la concentración de este intermediario disminuía. Esto fue interpretado por los autores como una evidencia del papel regulatorio de ambas enzimas. Cuando la ALA-D y la PBG-D se sobreexpresaron simultáneamente, la concentración de porfirinas aumentó sugiriendo que existía otro paso regulatorio.

Al adicionar δ -ALA el efecto era mayor. Por lo tanto, los autores obtuvieron una mutante donde sobreexpresaron las tres enzimas propuestas (ALA-D, PBG-D y URO-D), en la cual inexplicablemente la concentración de porfirinas disminuyó. Es conveniente enfatizar que la comparación de uno solo de los parámetros cinéticos, y su determinación solamente en las enzimas purificadas y no en los extractos celulares puede conducir a conclusiones erróneas. La enzima con la capacidad catalítica menor (la enzima más lenta) también puede ser la enzima con la mayor afinidad por su sustrato y aquella que se expresa en mayor cantidad, y viceversa.

Por esta razón, Hoffman *et al.* (23) no pudieron explicar el por qué se incrementaban los niveles de porfobilinógeno y de porfirinas al añadir δ -ALA al cultivo, siendo que ellos proponían que la ALA-S (y tal vez el transportador de este intermediario) no eran sitios de control de la vía. Por ejemplo, la URO-D es la enzima más lenta de la vía, pero también es la que posee mayor afinidad por su sustrato (Tabla II).

Desafortunadamente, Hoffman *et al.* no analizaron el efecto de sobreexpresar solamente a esta enzima sino en combinación con otras enzimas. Al analizar conjuntamente ambos parámetros cinéticos (es decir, la eficiencia catalítica, kcat/ Km) se observa que la ALA-D y la PBG-D son las menos eficientes en esta vía. Al analizar los parámetros cinéticos obtenidos de las enzimas en los extractos celulares (en donde se considera la concentración fisiológica de cada enzima) se observa que la ALA-D es la enzima menos eficiente seguida por la PBG-D, URO-S y ALA-S. Por lo tanto se espera que estas enzimas, ubicadas al inicio de la vía, sean las que ejerzan mayor control. Con este criterio, el resto de las enzimas al parecer no ejercerían control significativo.

Además, se ha encontrado que en condiciones aeróbicas, la fuente de carbono y la concentración de

TABLA II

PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS ENZIMAS EN LA BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO EN LEVADURA

Enzima	Km * (M)	kcat* (seg ⁻¹)	eficiencia catalítica (kcat/ Km)	Vmax \square (nmol/min/mg)	Vmax/Km
δ - ALA-S	2×10^{-6}	1.15	5×10^5	90	0.045
ALA-D	3.6×10^{-4}	1.2	3×10^3	1.4	3.8×10^{-6}
PBG-D	1.9×10^{-5}	0.5	2×10^4	0.06	3×10^{-3}
URO-S ϵ	5×10^{-6}	250	5×10^7	8	1.6×10^{-3}
URO-D	6×10^{-9}	0.021	3×10^6	2	0.33
COPROX	5×10^{-8}	0.10	2×10^6	9.2	0.18
PROTOX	1×10^{-7}	0.62	6×10^6	0.45	4.5×10^{-3}
FERROC	9×10^{-8}	0.39	4×10^6	41	0.45

* Hoffman *et al.*, 2003.

\square Valores basados en los datos cinéticos de las enzimas en extractos celulares de *S. cerevisiae*. Estos valores fueron tomados de referencias que fueron omitidas por razones de presentación.

ϵ Valores obtenidos en *Euglena gracilis*.

Los valores de Vmax/Km fueron simplificados por un factor común de 1×10^9 .

oxígeno son importantes para modular la síntesis del hemo. Sin embargo, al cambiar a condiciones fermentativas, la producción de este compuesto disminuye a un 3 a 7%, posiblemente debido a las bajas concentraciones de oxígeno remanentes o a que en estas condiciones el oxígeno no es el principal aceptor de electrones.

DESTINOS DEL GRUPO HEMO

Uno de los intermediarios de la síntesis del hemo, el uroporfirinógeno III, es también precursor de la vitamina B₁₂ y otros derivados. La síntesis de hemo y clorofila divergen al nivel de la protoporfirina IX, uno de los intermediarios finales. Hemoglobinas, citocromos P450 y citocromos tipo B tienen al protohemo como grupo prostético (la ferroprotoporfirina IX o hemo es nombrada también hemo B), el cual puede ser modificado para la síntesis de hemocitocromos A, C, D y O (Fig. 4; Ref. 5). Los hemos tipo C se unen covalentemente a la proteína mediante dos enlaces tioéter que se establecen entre

grupos vinilo del hemo con dos residuos de cisteína. Por otro lado, los hemos tipo A, B, D y O se unen de manera no covalente a la proteína.

El hemo D es del tipo clorina en el cual se reduce un doble enlace del tetrapirrol, posiblemente como resultado de una hidroxilación del hemo B. En *E. coli* se ha descrito la presencia de una quinol oxidasa terminal y una catalasa/hidroperoxidasa que poseen hemo D como grupo prostético. Sin embargo, también se han obtenido datos cristalográficos en la catalasa de este organismo que mostraron la presencia de hemo B, sugiriendo que la modificación para convertirse en hemo D se puede llevar a cabo cuando ya se ha asociado a la proteína. También se ha descrito a un hemo D1 que funge como grupo prostético de un tipo de nitrito reductasa presente en algunas especies bacterianas (Fig. 1) y el cual, a diferencia del hemo D, posee dos anillos insaturados (Fig. 4).

Para la síntesis del hemo O, el grupo vinilo en la posición 3 del hemo B se reemplaza por un grupo farnesilhidroxietilo. La biosíntesis del hemo

A inicia con la farnesilación de un grupo vinilo en el carbono 2 del anillo de la porfirina del hemo B por la farnesil transferasa codificada por el gen *COX10*. Posteriormente, el hemo farnesilado se hidroxila por medio de un complejo compuesto por Cox15p, ferredoxina y ferredoxina reductasa. La conversión del producto resultante a hemo A requiere la oxidación del grupo metilo en el carbono 8 del hemo B (24) aunque la enzima responsable no ha sido caracterizada.

IMPLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LA BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO

Las porfirinas se han utilizado como terapia contra el cáncer debido a que generan especies reactivas de oxígeno y conducen a la muerte celular, siendo más susceptible la célula tumoral.

Para esto, el compuesto δ -ALA, de origen bacteriano, es administrado con el objetivo de obtener una acumulación de porfirinas (25). Recientemente, el descubrimiento en algunas cianobacterias de tetrapirroles atípicos los cuales tienen propiedades citotóxicas, también pueden considerarse como una posible herramienta para la terapia contra el cáncer (26).

Por otra parte, se han obtenido datos sobre la síntesis de protoporfirinas asociadas a zinc en lugar de a hierro en respuesta a la depleción de hierro o a la presencia de plomo (que inhibe a la ferroquelatasa). Estos compuestos (Zn-PP) se han administrado a pacientes con el objetivo de controlar la formación de bilirrubina (producto de la degradación del grupo hemo) en neonatos que padecen de hiperbilirrubinemia (27).

Las porfirias son padecimientos desarrollados por alteraciones en la biosíntesis del hemo ocasionando la acumulación de porfirinas o de sus precursores. El entendimiento de la función y la bioquímica de las enzimas puede permitir evaluar los sitios de control metabólico de la vía ayudando al diseño racional de

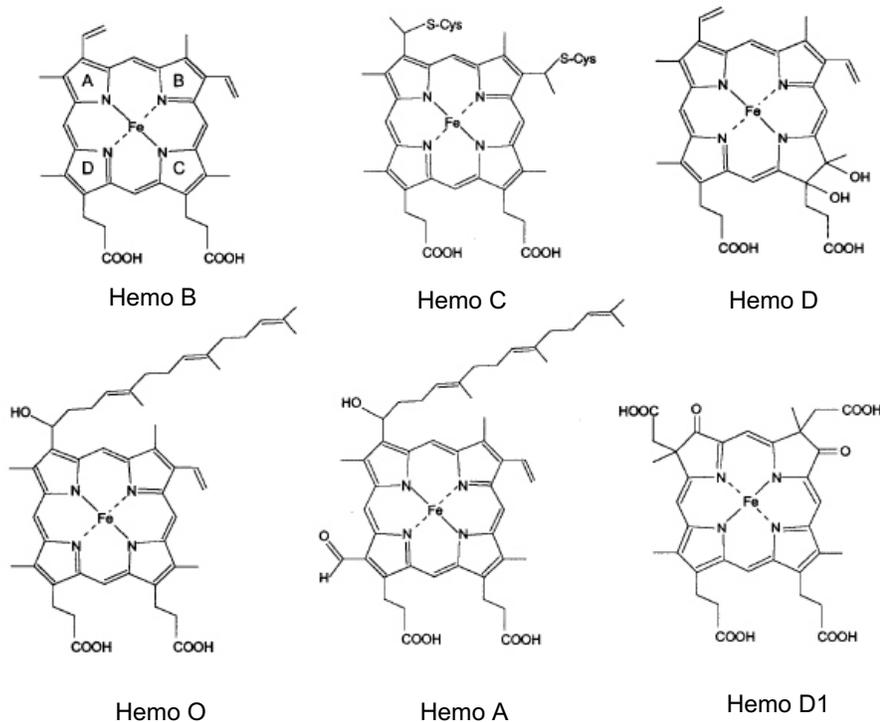


FIGURA 4. Destinos del grupo hemo. Tomado de Thöny-Meyer (5).

fármacos para contrarrestar estas enfermedades. Sin embargo, es difícil explorar las enzimas de mamíferos por su resistencia a la tecnología del DNA recombinante y a que están asociadas a la membrana.

De esta manera, la utilización de las contrapartes procariontes es una herramienta útil para la investigación básica y aplicada.

Uno de los principales productos generados por procesos biotecnológi-

cos es la vitamina B₁₂, donde la mayoría de los pasos son comunes a la biosíntesis del hemo. Recientemente se han desarrollado estrategias donde la sobreexpresión de la enzima inicial incrementó la síntesis de esta vitamina para su uso comercial (28).

Los citocromos P450 son también muy importantes para el metabolismo bacteriano y de células eucariontes ya que participan en la monooxigenación de una amplia variedad de sustratos,

en la síntesis de esteroides y en procesos de detoxificación. Sin embargo, existen limitaciones debido a la complejidad de su funcionamiento, su baja actividad y estabilidad, por lo que su desarrollo biotecnológico se ha enfocado, principalmente en la modificación y optimización de su funcionamiento y de su especificidad hacia un sustrato de elección, utilizando como herramienta la ingeniería de proteínas (29).

REFERENCIAS

- Gilles-Gonzalez M A, Ditta G S y Helinski D R (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350: 170- 72.
- Goldberg M A, Dunning S P y Bunn H F (1988) Regulation of the eritropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242: 1412- 1415.
- O'Brian M R y Thöny- Meyer L (2002) Biochemistry, regulation and genomics of haem biosynthesis in prokaryotes. *Adv Microb Physiol* 46: 257-318.
- Schobert M y Jahn D (2002) Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 287-294.
- Thöny-Meyer L (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 337- 376.
- Paoli M, Marles-Wright J y Smith A (2002) Structure function relationships in heme-proteins. *DNA Cell Biol* 21: 271- 280.
- Gong J, Hunter G A y Ferreira G C (1998) Aspartate-279 in aminolevulinic acid synthase affects enzyme catalysis through enhancing the function of the pyridoxal 5'-phosphate cofactor. *Biochemistry* 37: 3509-3517.
- Avissar Y J y Beale S I (1989) Identification of the enzymatic basis for delta-aminolevulinic acid auxotrophy in a hemA mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171: 2919- 2924.
- Scimmel P R y Söll D (1979) Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem.* 48: 601-648.
- Schubert W D, Moser J, Shauer S, Heinz D W y Jahn D (2002) Structure and function of glutamyl- tRNA reductase, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and prokaryotes. *Photosynthesis* 74: 205- 215.
- Weinstein J D y Beale S I (1983) Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* 258: 6799- 6807.
- Panek H y O'Brian M R (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* 148: 2273-2282.
- Padmanaban G y Rangarajan P N (2000) Heme metabolism of *Plasmodium* is a major antimalarial target. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 665-668.
- Chauhan S, Titus D E y O'Brian M R (1997) Metals control activity and expression of the heme biosynthesis enzyme deltaaminolevulinic acid dehydratase in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 179: 5516- 5520.
- García S C, Moretti M B, Garay V R, Gloscio C, Ramos E y Batlle A (1995) Obtainment of a *S. Cerevisiae* mutant deficient in aminolevulinic acid transport. *Scand J Clin Lab Invest* 55: 223-228.
- Dailey H A (2002) Terminal steps of haem biosynthesis. *Biochem Soc Trans* 30: 590- 595.

17. Posnett S J, Oosthuizen M M, Cantrell A C y Myburgh J A (1988) Properties of membrane bound ferrochelatase purified from baboon liver mitochondria. *Int J Biochem* 20: 845-855.
18. Woodard S I y Dailey H A (1995) Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 316: 110-115.
19. Nakahigashi K, Nishimura K, Miyamoto K y Inokuchi H (1991) Photosensitivity of a protoporphyrin-accumulating, light sensitive mutant (*visA*) of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10520-10524.
20. Araujo L S, Lombardo M E, Del C y Batlle A M (1998) Regulatory role of ALA-S and ALA-D in a haem-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol* 44: 591-595.
21. Tsang E W, Hu Z, Chang Q, McGregor D I y Kéller W A (2003) Expression of a *Brassic napus* glutamate 1- semialdehyde aminotransferase in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein. *Protein Exp Purif* 29: 193-201.
22. Rompf A, Hungerer C, Hoffmann T, Lindenmeyer M, Romling U, Gross U, Doss M O, Arai H, Igarashi Y y Jahn D (1998) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa hemF* and *hemN* by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol* 29: 985-997.
23. Hoffman M, Góra M y Rytka J (2003) Identification of ratelimiting steps in yeast heme biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 1247-1253.
24. Barros M H y Tzagoloff A (2002) Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 516: 119-123.
25. Fuchs J, Weber S y Kaufmann R (2000) Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 28: 537-548
26. Bykhoyskii V, Zaitseva N I y Eliseey A A (1998) Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, biotechnology. *Appl Biochem Microbiol* 34: 1-18.
27. Labbe R F, Vremon H J y Stevenson O K (1999) Zinc protoporphyrin: a metabolite with a mission. *Clin Chem* 45: 2060-2072.
28. Frankenberg N, Moser J y Jahn D (2003) Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 115-127.
29. Urlacher V B, Lutz-Wahl S y Schmid R D (2004) Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 317-325.

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO DEL TEJIDO OSEO*

G. EMELÍ CORTINA RAMÍREZ Y J. VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

RESUMEN

El estudio del hueso ha enfrentado limitaciones experimentales, dadas por sus propias características, como la mineralización de la matriz extracelular, la heterogeneidad de sus poblaciones celulares, la interdependencia entre las actividades de los componentes óseos, la vascularización ósea y la influencia de otros tejidos sobre el hueso. El desarrollo de un modelo experimental que reproduzca las características y que refleje la complejidad del microambiente óseo, continúa siendo un reto. Sin embargo, el avance en el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales el hueso se forma, crece, es mantenido y lleva a cabo sus múltiples funciones en el organismo, ha continuado gracias al desarrollo de diferentes modelos experimentales, sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre los modelos de experimentación desarrollados como sistemas *in vitro*, encontramos a los cultivos celulares, ya sean cultivos primarios o de líneas celulares; los cocultivos, que involucran más de un tipo de células y los cultivos de órganos, en los que elementos esqueléticos completos o secciones de ellos son mantenidos en un medio de cultivo adecuado. Los modelos de experimentación *in vivo* más frecuentemente utilizados son las vértebras caudales de roedores, las formaciones ectópicas de hueso y los ratones transgénicos. Ambos tipos de modelos, *in vitro* e *in vivo*, muestran ventajas y desventajas que deben ser consideradas para seleccionar el modelo experimental apropiado para el estudio del fenómeno de interés. El propósito de esta revisión es proveer un panorama general de las principales características de los modelos experimentales usados en la investigación del tejido óseo, exponiendo algunas consideraciones con respecto a los modelos más comúnmente usados, y a aquellos que han contribuido de manera significativa al entendimiento de los mecanismos a través de los cuales el hueso lleva a cabo todas sus funciones en el organismo.

PALABRAS CLAVE: Hueso, modelos de experimentación.

ABSTRACT

The study of bone confronts experimental limitations given by its own characteristics, such as the extra cellular matrix mineralization, the cellular populations heterogeneity, the interdependence among the bone components activities, the bone vascularization and the influence on bone from other tissues. The development of an experimental model which reproduces the bone characteristics and reflects the complexity of bone microenvironment, is a challenge yet. Although, the progress in understanding mechanisms by which bone develops, grows, is maintained and carries out its multiple functions inside the organism, have continued thanks to the development of different experimental models, such as *in vitro* and *in vivo* systems. Among the experimental models developed as *in vitro* systems, are including cell cultures, primary cultures or cell lines; the cocultures, involving more than one cell type and organ cultures, in which complete skeletal elements or sections of them are maintained in an adequate culture medium. The most frequently used *in vivo* experimental models are the caudal vertebrae in rodents, bone ectopic formations and transgenic mice. Both kind of models, *in vitro* and *in vivo*, shows advantages and disadvantages that should be considered in selecting appropriate experimental model, depending on the phenomena one is interested in studying. The purpose of this review, is to provide an overview of the main characteristics of the experimental models used in bone tissue research, discussing some considerations with regard to the more commonly used experimental models and those which have contributed significantly in understanding the mechanisms by which bone carries out all of its functions in the organism.

KEY WORDS: Bone, experimental models.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo se pensó que los huesos desempeñaban funciones estrictamente mecánicas dentro del organismo. Los primeros estudios de los elementos estructurales de los

huesos comenzaron a cambiar esta idea. El análisis de los componentes óseos, células y matriz extracelular (MEC), se hacía por separado, lo que dificultaba la integración de los resultados y la comprensión de las

diversas funciones óseas. Fue hasta mediados del siglo pasado, con el desarrollo de la microscopía electrónica, que de manera conjunta se comenzó a analizar a las células óseas y a su MEC. Los resultados conduje-

* Recibido: 16 febrero 2004 Aceptado: 05 mayo 2004

ron al reconocimiento de los huesos como órganos de importante actividad metabólica y con múltiples funciones dentro del organismo. Los mecanismos moleculares, a través de los cuales se regulan las funciones óseas, son poco conocidos y existen un sin número de incógnitas al respecto que continúan pendientes de resolverse.

Los huesos son órganos complejos que conforman al sistema esquelético con alrededor de 200 elementos óseos distribuidos por todo el cuerpo, con diferentes tamaños y formas, los cuales además de proporcionar soporte mecánico para los movimientos y para los tejidos blandos, desempeñan un papel primordial en la homeostasis mineral, determinan las características corporales en cuanto a la forma y el tamaño, protegen a los órganos internos y albergan al tejido hematopoyético, donde tienen su origen los precursores de las células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos) y las plaquetas (1). Todas estas funciones involucran complejas interrelaciones entre los componentes óseos y la actividad de otros tejidos sobre el hueso, las cuales determinan el tamaño, la forma, la posición y arreglo adecuado de los huesos, así como el desarrollo de la capacidad de mantenimiento y remodelación que caracteriza a este tejido. Sin embargo, aún es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos moleculares que controlan estas interrelaciones y la influencia de otros tejidos sobre la formación, mantenimiento y homeostasis del hueso.

Las barreras experimentales dadas por la mineralización de la matriz extracelular, la heterogeneidad de las poblaciones celulares, la interdependencia estrecha entre sus diferentes componentes, la particular vascularización observada en este tejido y la distribución de las células óseas dentro de la MEC, que constituye un relativo aislamiento de las células con respecto a nutrientes, oxígeno y agentes externos, han influido de manera determinante en el avance del conocimiento del tejido óseo.

El reproducir la complejidad del microambiente óseo y la influencia de otros tejidos sobre el metabolismo del hueso en un solo modelo experimental, continúa siendo un reto. Sin embargo, la falta de este modelo ideal no ha detenido el avance en el conocimiento del tejido óseo, el cual ha requerido de manera indispensable el desarrollo de diversos modelos de experimentación, cada uno de ellos con ventajas y desventajas a considerarse al momento de analizar e interpretar resultados y entonces emitir conclusiones confiables acerca de los fenómenos estudiados que se traduzcan en conocimiento.

El objetivo de esta revisión es presentar las características del tejido óseo y hacer algunas consideraciones con respecto al uso de los modelos de experimentación más frecuentemente utilizados y que más han contribuido a la comprensión de los mecanismos que conducen a la función normal del sistema esquelético.

HUESO

El hueso es una variedad de tejido conjuntivo altamente especializado. Su peculiaridad reside en que es uno de los pocos tejidos que fisiológicamente se mineralizan. Bioquímicamente se caracteriza por poseer una mezcla de diferentes tipos de proteínas, las cuales conforman a la matriz orgánica u osteoide, sobre la cual se depositan las sales minerales que constituyen la matriz mineral ósea. La matriz orgánica le confiere a los huesos alta resistencia a la tensión y la matriz mineral a la compresión, estas características previenen a los huesos de fracturas durante el desempeño de sus funciones mecánicas normales. Morfológicamente se distinguen dos formas de hueso, cortical o compacto y trabecular o esponjoso. El hueso cortical se observa como una masa sólida, donde las láminas de MEC se disponen de manera concéntrica alrededor de conductos denominados de Havers, los cuales contienen tejido nervioso y vasos sanguíneos. En el hueso trabecular el tejido se dispone formando trabéculas, creando

cavidades ocupadas por la médula ósea, la cual puede ser médula amarilla, compuesta principalmente por grasa, o médula roja donde se producen los precursores de las células sanguíneas. Las superficies de los huesos largos, que forman parte de las articulaciones, están recubiertas por una capa de cartílago denominado articular, el resto de la superficie de un hueso está cubierta por capas de tejido conjuntivo formando el periostio y endostio, altamente vascularizados, a través de los cuales los vasos sanguíneos se distribuyen a todo el hueso para llevar a cabo su irrigación y de donde migran células precursoras óseas en procesos de reparación.

CÉLULAS ÓSEAS

Aunque las células óseas constituyen sólo el 2 % del peso total de un hueso (1), son las responsables de su formación y mantenimiento durante la vida de un organismo. En el hueso se encuentran células derivadas del mesénquima, osteoprogenitoras, osteoblastos y osteocitos pertenecientes al mismo linaje celular y células que se originan por la fusión de monocitos de origen sanguíneo y que pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares y osteoclastos. En la figura 1 se representan los diferentes tipos de células óseas así como su disposición en el hueso (2).

Las células osteoprogenitoras son células del mesénquima, las cuales tienen la capacidad de proliferar y diferenciar a osteoblastos. Los factores que estimulan su diferenciación y los mecanismos moleculares, a través de los cuales se lleva a cabo este proceso, continúan siendo parte de las incógnitas por solucionar. Sin embargo, en el control transcripcional de la diferenciación de estas células a osteoblastos, se han identificado dos factores de transcripción, que resultan claves en el control de la expresión de múltiples genes correspondientes al desarrollo del fenotipo de osteoblastos, estos son “*Core binding factor 1*” (*Cbfa1*) y “*Osterix*” (*Osx*). *Cbfa1*

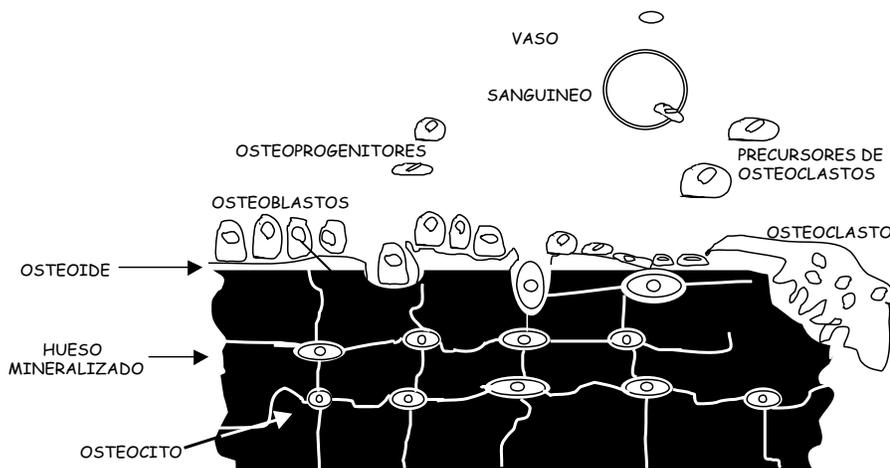


FIGURA 1. Origen y localización de las células óseas (2).

también conocido como *Runx 2*, es el marcador molecular más temprano y altamente específico de células del linaje osteoblástico. La expresión de *Cbfa1* es indispensable para la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos, como se demostró por su inactivación en animales experimentales, en los que se observó la formación de esqueletos compuestos por cartílago con ausencia completa de hueso. La expresión de *Cbfa1* incrementa constantemente en las células osteoprogenitoras durante su diferenciación y se mantiene presente en osteoblastos diferenciados. Como parte del control ejercido por *Cbfa1*, se ha identificado la regulación de la expresión de otros factores de transcripción como *Osx*.

Esta proteína es expresada en las células osteoprogenitoras en diferenciación, su ausencia provoca un fenotipo similar, pero menos severo, al causado por la ausencia de *Cbfa1*. (3) La diferenciación de las células osteoprogenitoras, es un proceso esencial para la formación, el crecimiento y la reparación de los huesos (1,2).

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar, secretar y ordenar las proteínas que conforman la fase orgánica de la MEC ósea. Los osteoblastos además regulan la mineralización, disponiendo de manera adecuada a las proteínas y formando pequeñas depresiones (100 nm), sobre la matriz, rodeadas por

parte de su membrana plasmática que posee enzimas como fosfatasa alcalina (ALP) y pirofosfatasa, las cuales aumentan la concentración local de fosfato y calcio, creando así centros de nucleación de las sales que constituyen la fase mineral. Numerosos factores sistémicos y locales regulan la proliferación, diferenciación y metabolismo de los osteoblastos, mediante mecanismos moleculares poco entendidos. Entre ellos se encuentran hormonas, como la 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) y la hormona paratiroidea (PTH), y las citocinas como las interleucinas (IL) 6 y 11, los factores transformantes del crecimiento beta (TGFbs) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs)(4). Los osteoblastos pueden permanecer en las superficies del tejido óseo en su forma inactiva o ser rodeados por la matriz que producen y entonces diferenciarse en osteocitos.

Los osteocitos se localizan inmersos en la MEC ósea dentro de espacios, lagunas osteocíticas, en donde están bañados por líquido tisular y conectados con otros osteocitos, con osteoblastos en la superficie del tejido óseo y con los conductos de Havers, a través de prolongaciones de su membrana que se extienden por una red de conductos denominados canaliculos. En general

los osteocitos presentan un metabolismo menos activo que los osteoblastos y, aunque en forma limitada, tienen la capacidad de sintetizar y remover (resorber) MEC ósea. Los osteocitos son responsables del proceso de osteólisis osteocítica, en el cual se resorben las sales amorfas de calcio y de fosfato depositadas en la fase mineral de la MEC ósea y de esta forma la actividad de los osteocitos contribuye de manera importante a la homeostasis de calcio (2, 5).

Los osteoclastos son responsables de la resorción ósea. Son células multinucleadas localizadas en las superficies de tejido óseo, dentro de las depresiones de resorción que forman, llamadas lagunas de Howship. La parte de la membrana celular del osteoclasto que se encuentra en contacto con la superficie del tejido óseo, forma un espacio autoconteniente, en donde son liberadas tanto enzimas lisosomales, que permiten la lisis de las proteínas, como ácido, que solubiliza las sales de la MEC ósea (4). Mediante la resorción, se liberan factores (como TGFbs, ILs y BMPs) previamente depositados por los osteoblastos en la MEC, los cuales junto con algunas hormonas provenientes de otros tejidos (PTH y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), estimulan a los osteoblastos a depositar hueso nuevo en las zonas recién resorbidas, en una proporción similar al hueso que fue removido por los osteoclastos. Esta coordinación, entre las actividades de los osteoclastos y de los osteoblastos, permite mantener el equilibrio entre los procesos de formación y resorción, determinándose así el estado óptimo de la masa esquelética (1).

En la formación y la resorción de los huesos, son los osteoblastos los que ejercen la mayor parte del control. Los osteoblastos no sólo producen las proteínas de la matriz extracelular ósea, sino que influyen en la maduración y la actividad de los osteoclastos (6). Muchos de los factores que sirven como estímulo primario para la resorción ósea, como la PTH, la IL-1, la IL-6 y el factor beta de necrosis

tumoral (TNF-), tienen efecto directo muy escaso o nulo sobre los osteoclastos; de hecho, son los osteoblastos los que poseen receptores para estas sustancias. Bajo la señal adecuada, los osteoblastos liberan un mediador soluble, inductor de la actividad de resorción de los osteoclastos, denominado RANKL u ODF (ligando del receptor activador del factor nuclear κB o factor de diferenciación de osteoclastos) (7, 8).

MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA

En la MEC ósea la proteína más abundante es la colágena tipo I, que constituye aproximadamente el 90% de la matriz orgánica. Las fibras de colágena tipo I se disponen de manera paralela formando laminillas, las laminillas contiguas se alternan formando ángulos rectos, confiriéndole al hueso su resistencia a las fuerzas tensionales. El resto de la matriz orgánica está compuesto principalmente por glicoproteínas, como la osteonectina y la fibronectina, proteínas con grupos γ -carboxiglutámicos, como la osteocalcina, proteoglicanos, como el condroitín y el queratán-sulfato y citocinas como TGFbs y BMPs. Las proteínas de la matriz orgánica participan en la regulación de la mineralización, la migración, la proliferación y diferenciación celular, mediante la interacción entre proteínas de la MEC y las células y generando sitios de nucleación para las sales minerales. En la Tabla 1 se muestra el origen y función de las principales proteínas de la MEC ósea (1).

La fase mineral de la MEC ósea es abundante (70%) y está formada por el depósito, sobre el osteoide, de sales amorfas principalmente de fosfatos de calcio $[CaHPO_4]$ y $Ca_3(PO_4)_2$ y por cristales bien estructurados de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Las sales amorfas son la principal fuente de recambio para la homeostasis mineral y la hidroxiapatita es el componente mineral óseo que proporciona dureza, confiriéndole al hueso su resistencia a

TABLA I	
PROTEÍNAS DE LA MATRIZ ÓSEA	
Proteínas producto de los osteoblastos	
Colágena tipo I	
Proteínas de adherencia celular	Osteopontina, fibronectina, trombospondina
Proteínas de unión al calcio	Osteonectina, sialoproteína ósea
Proteínas que participan en la mineralización	Osteocalcina
Enzimas	Colagenasa, fosfatasa alcalina (ALP)
Citocinas	IGF-1, TGF-, PDGF, Prostaglandinas, IL-1, IL-6
Proteínas concentradas a partir del suero	
Beta HS microglobulina	
Albúmina	

IGF-1 = factor de crecimiento-1 similar a la insulina; TGF- = factor beta transformante del crecimiento; PDGF = factor de crecimiento derivado de las plaquetas; IL-1, IL-6 = interleucina-1, Interleucina-6.

las fuerzas de compresión. En la fase mineral también se encuentran sales de sodio, magnesio, potasio y carbonatos (1, 5).

TIPOS DE OSIFICACIÓN

En la etapa embrionaria el tejido óseo tiene su origen en la capa mesodérmica. Los huesos del cráneo se desarrollan a partir del mesodermo de la cresta cráneo-neural, de las somitas surge el resto del esqueleto axial (columna vertebral, costillas y esternón) y el esqueleto apendicular

(huesos de las extremidades) se forma a partir del mesodermo de la placa lateral (9). En la regulación de la osteogénesis embrionaria, participan factores parácrinos como, BMPs, TGFbs, la familia de factores Wntless (Wnts), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y factores Hedgehog (como Indian, Ihh y Sonic hedgehog, Shh) (10). En el crecimiento, mantenimiento y reparación de los huesos, además de estos factores parácrinos, participan factores

endocrinos (hormonas) como la PTH y la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (5). (columna vertebral, costillas y esternón) y el esqueleto apendicular (huesos de las extremidades) se forma a partir del mesodermo de la placa lateral (9). En la regulación de la osteogénesis embrionaria, participan factores parácrinos como, BMPs, TGF s, la familia de factores Wingless (Wnts), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y factores Hedgehog (como Indian, Ihh y Sonic hedgehog, Shh) (10). En el crecimiento, mantenimiento y reparación de los huesos, además de estos factores parácrinos, participan factores endocrinos (hormonas) como la PTH y la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (5).

La osteogénesis, sucede a través de dos procesos, la osificación intramembranosa o directa y la endocondral o indirecta. La osificación intramembranosa ocurre por diferenciación directa de células del mesénquima en osteoblastos. En la osificación endocondral la condensación del mesénquima embrionario da origen a la proliferación intersticial de columnas de condrocitos. En el cartílago la matriz es producida y mineralizada por los condrocitos, los cuales posteriormente sufren hipertrofia y finalmente mueren por apoptosis. El cartílago mineralizado, sirve como base para el depósito subcondral óseo, durante el cual las células del mesénquima se diferencian en osteoblastos. La presencia de osteoblastos coincide con la vascularización del centro de los sitios de osificación. Después de que se lleva a cabo la invasión vascular, los osteoclastos se hacen presentes, encargándose de la resorción e iniciando la remodelación del hueso recién formado (10).

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO*

Los modelos de experimentación *in vitro* consisten en cultivos de un tipo de células, de varios tipos celulares (cocultivos) o hasta de órganos completos (cultivos de órganos). Éstos constituyen sistemas relativa-

mente simples, en los cuales se pueden estudiar diversos fenómenos biológicos, incluyendo aspectos de regulación de expresión de genes o los efectos de mutaciones específicas, entre otros. El uso de estos modelos de experimentación ha ayudado a entender cómo los cambios en la función o metabolismo de un grupo celular específico, por efecto de algún agente de interés (hormonas, fármacos, etc.), podrían afectar al metabolismo total del hueso.

CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS ÓSEAS

Los cultivos primarios se constituyen a partir de células obtenidas directamente del hueso, estas son cultivadas sin pasajes (sin resiembra) y en general conservan la morfología de las células en el hueso. Contrastando con la relativa simplicidad de los cultivos primarios de células óseas, está la dificultad que representa el aislar poblaciones de células homogéneas (sin contaminación por otros tipos de células) y el lograr que estas células retengan sus características fenotípicas bajo las condiciones de cultivo (11). Aunque la mayoría de las células óseas sobreviven a los procesos de aislamiento y proliferan *in vitro*, a menudo muestran características de células indiferenciadas y el fenotipo que desarrollan *in vitro* está influido, de manera muy importante, por el medio de cultivo (11). Todo esto hace necesario que en estudios realizados en cultivos primarios se considere (I) el grado de contaminación con células, no solamente de otras poblaciones óseas, sino de otros tipos de células presentes en los huesos, como células sanguíneas, de médula ósea o de células del tejido conectivo, entre otras; (II) el posible daño celular causado durante el aislamiento de las células, que puede repercutir en alteraciones del metabolismo o cambios en las propiedades de la membrana, como por ejemplo, alteración de receptores para alguna hormona; (III) la posibilidad de diferenciación de células precursoras o la desdiferenciación de células

maduras, ocasionadas por las características del medio de cultivo y (IV) la identidad de las células aisladas (12). Estos aspectos pueden ser controlados y deben ser corroborados metodológicamente para analizar e interpretar de manera correcta los resultados que se obtengan.

Otra cuestión a considerar, es el origen de las células aisladas para cultivos. Los tejidos óseos a partir de los cuales se aíslan osteoblastos para cultivos primarios son principalmente, la calvaria (huesos frontales y parietales inmaduros del cráneo) de la rata o ratón, huesos de pollo, conejo, cerdo y bovino (11). El aislamiento de las células consiste en la digestión de los tejidos mediante la actividad de proteasas, como la colagenasa o la tripsina. La técnica más común es simplemente coleccionar las células a diferentes tiempos durante el procedimiento de digestión y se considera que las células obtenidas en las últimas digestiones (después de 40-120 min) presentan, mayoritariamente, fenotipo de osteoblastos (13). La calvaria resulta una fuente muy conveniente de células con características de osteoblastos, debido a que las células aisladas a partir de este tejido proliferan exitosamente *in vitro* y muestran una alta proporción de células fenotípicamente osteoblásticas, además de que la calvaria es un tejido fácilmente disecable con desarrollo muy limitado de médula ósea y con relativamente poca mineralización (13). Debido a su alta capacidad proliferativa, también se usan células aisladas de huesos en estadios fetales o neonatales. Sin embargo, debido a que existen diferencias entre los huesos de aves, roedores y mamíferos superiores, es necesario hacer consideraciones cuidadosas al analizar y comparar los estudios realizados en los cultivos de células aisladas de tejidos de diferentes fuentes. Un factor que se debe tener en cuenta es la edad de los animales fuente de tejidos de donde se aíslan las células; por ejemplo, las células de los tejidos provenientes de

adultos tienen generalmente menor capacidad proliferativa que las células aisladas de los tejidos óseos fetales, pero resultan más apropiadas para el estudio de aspectos relacionados con la formación y regulación del hueso maduro (11). Los cultivos celulares a partir de huesos maduros se obtienen mediante el cultivo de explantes, provenientes de biopsias o especímenes obtenidos quirúrgicamente. Una vez en cultivo las células obtenidas muestran características fenotípicas de osteoblastos.

COCULTIVOS

En el caso de cultivos de osteoclastos, estos requieren de la coexistencia de células multinucleadas obtenidas del cultivo de médula ósea y de células provenientes del mesénquima con características fenotípicas de osteoblastos. Esta necesidad se debe a que la diferenciación de las células de la médula ósea en osteoclastos, como se mencionó anteriormente, requiere de la liberación de RANKL por los osteoblastos. Diferentes líneas celulares de origen mesenquimal, que permiten el cultivo de osteoclastos, han sido desarrolladas, entre las más comunes MC3T3-G2/PA6 y ST2 provenientes de preadipocitos, KS-4 y MB1.8 de origen osteoblástico, todas ellas con fenotipo de osteoblastos (14). El cultivo de osteoclastos también requiere de la presencia de hormonas osteotrópicas como $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y PTH y de interleucinas como la IL-1 (14). Esto convierte a los cultivos de osteoclastos en sistemas denominados cocultivos en los cuales se involucra más de una población celular.

LÍNEAS CELULARES

Se consideran líneas celulares a los cultivos de células sometidas a procesos de immortalización o transformación y obtenidas, en su gran mayoría, de tumores que presentan capacidad ilimitada de multiplicación. Las líneas celulares pueden ser de dos tipos (I) las líneas celulares continuas o de células immortalizadas,

que están constantemente en replicación y (II) las líneas celulares finitas, que tienen un número limitado de ciclos de división celular, después de los cuales entran a la etapa de senescencia y finalmente mueren.

La combinación de la inmortalidad y estabilidad del fenotipo observada en las líneas celulares clonales osteoblásticas, ha permitido la caracterización más detallada del fenotipo de estas células óseas. Un posible inconveniente, a considerar al analizar resultados de estudios en estos modelos, es el hecho de que las células transformadas presentan diferencias en su actividad con respecto a las células normales de roedor o de humano (2). Por otro lado, estas líneas celulares expresan un fenotipo muy estable, lo cual puede resultar un problema al realizar estudios en los cuales se pretenda evaluar cambios en la expresión de genes por efecto de algún agente externo, como podrían ser fármacos o xenobióticos. Sin embargo, estos modelos de experimentación han sido muy útiles en la elucidación de los mecanismos de control transcripcional en células osteoblásticas.

Las primeras líneas celulares caracterizadas como osteoblastos y usadas ampliamente para estudios similares a los que ya se hacían con células aisladas de calvaria, fueron los sistemas derivados de osteosarcoma de rata (tumor canceroso de hueso). Estos sistemas se encuentran conformados por la familia de líneas celulares clonales ROS, derivada de un tumor espontáneo en rata, y las líneas de células designadas como UMR, aisladas de tumores inducidos por irradiación utilizando $[^{32}\text{P}]$ -orto fosfato. De estas líneas celulares las más ampliamente usadas son la UMR-106, ROS 17/2 y su subclona ROS 17/2.8 (13, 14).

Las células ROS 17/2.8 expresan de manera constitutiva un amplio número de marcadores fenotípicos de osteoblastos maduros, incluyendo ALP, receptor a PTH y a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, proteínas de matriz extracelular ósea

producto de osteoblastos como osteopontina, sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina y en menor cantidad colágena tipo I. Además, esta subclona es capaz de mostrar mineralización de la matriz secretada por sus células. El osteosarcoma de rata ha sido fuente de otras líneas celulares, como la línea 25/1 cuyas células expresan un fenotipo osteoblástico pero no llevan a cabo mineralización, ni expresan osteocalcina (13).

Las líneas celulares UMR, expresan muchos elementos característicos de osteoblastos incluyendo receptor a PTH, expresión de BSP y capacidad de mineralización. Sin embargo, no expresan osteocalcina, lo que sugiere que estas células expresan de manera limitada el espectro de diferenciación observado en osteoblastos normales (13).

A partir de osteosarcoma humano también se han derivado líneas celulares usadas como modelos de células osteoblásticas. La mayoría de estas incluyen a las células SaOS, TE-85, OHS-4 y MG-63, todas estas líneas ampliamente usadas en el estudio del control de la expresión de proteínas de matriz extracelular ósea (13).

Además de las líneas celulares provenientes de osteosarcoma, encontramos líneas de células establecidas a partir de tejido óseo normal. Dentro de este grupo la línea más comúnmente utilizada es MC3T3-E1, derivada de calvaria de ratón mediante el aislamiento de una clona enriquecida con una población con alta actividad de ALP. Esta línea celular se caracteriza por desarrollar nódulos mineralizados en cultivos de 2 a 3 semanas en ausencia de fosfato exógeno (13).

Aunque los cultivos celulares son a menudo el modelo de estudio de elección, se debe tener en cuenta que como modelos, tienen limitaciones para entender cuestiones tan complejas como el desarrollo esquelético y procesos de regulación celular en un organismo. Con el incremento de la complejidad de los modelos *in vitro*, en cuanto a los grupos celulares

involucrados en ellos, tales como los cocultivos, las posibilidades para el estudio de las interacciones celulares aumentan. Sin embargo, los resultados obtenidos de estudios en estos modelos pueden no explicar satisfactoriamente todos los fenómenos observados *in vivo*. Aún con sus limitaciones, los cultivos celulares óseos han permitido hacer muchas contribuciones al entendimiento de la regulación del fenotipo específico de las células óseas y son ampliamente utilizados y aceptados como una valiosa herramienta en la biología ósea.

CULTIVOS DE ÓRGANOS

El cultivo de órganos consiste en el mantenimiento en medio de cultivo de explantes de huesos, provenientes de embriones, neonatos y ocasionalmente huesos de adultos, preferentemente de ratones, pollos, ratas, aunque también se han utilizados como donadores cerdos, hamsters, anfibios y humanos. Los huesos más comúnmente usados para cultivo de órganos son la calvaria y los huesos de las extremidades. La calvaria fetal tiene la ventaja de que cursa osificación únicamente intramembranosa, mientras que el crecimiento de los huesos de las extremidades se da exclusivamente a través de la osificación endocondral. La osificación intramembranosa y endocondral muestran diferentes respuestas a hormonas, factores de crecimiento y condiciones ambientales, las cuales determinan el crecimiento y diferenciación de las células óseas en cada una de estos procesos. El uso de los cultivos de órganos ha contribuido al entendimiento de estas respuestas, ya que brindan gran parte del complejo microambiente óseo, y la posibilidad de controlar el medio en el que se encuentran (15). El cultivo de órganos presenta algunas ventajas con respecto a los modelos *in vivo*, por ejemplo en cuanto al análisis cuantitativo de resorción y formación ósea, procesos que requieren de la interacción entre los diferentes componentes

óseos para que puedan llevarse a cabo. En estos sistemas, limitados por el recipiente de cultivo, se puede medir fácilmente la cantidad de material resorbido (liberado) hacia el medio y la cantidad de material tomado del medio para integrarse al órgano en cultivo, lo cual resultaría muy difícil o hasta imposible determinar en un modelo *in vivo* (16). De igual forma se descartan los efectos de factores como el endócrino, la circulación e influencias mecánicas, ya que pueden ser controlados por el investigador.

Los cultivos de extremidades han ayudado a comprender aspectos relacionados con el establecimiento del patrón esquelético, determinado por el tamaño, la forma, el número y el arreglo de los elementos esqueléticos, que conduzcan a su correcto funcionamiento. Para estos estudios se han utilizado exitosamente cultivos de extremidades de embriones de ratón, rata y pollo (3). Es importante tomar en cuenta el estadio del embrión a partir del cual se obtienen las extremidades, para asegurar que los cultivos progresen y ayuden entonces a contestar las preguntas hechas en el estudio que se esté llevando a cabo.

Es claro que ninguno de los modelos antes mencionados se acerca a replicar las condiciones óseas *in vivo*. A pesar de esto, han permitido, con la información generada por ellos, aproximarse a una mejor comprensión de los fenómenos observados *in vivo* y sugerir posibles estrategias a desarrollar en modelos de experimentación *in vivo*.

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

Hemos visto que los modelos de experimentación *in vitro* han generado un sin número de datos valiosos, lo cual ha ayudado a avanzar en la comprensión de fenómenos observados en los huesos como la formación/resorción, la mineralización, el establecimiento del patrón esquelético, el metabolismo y función de las células óseas y el efecto que sobre estos tienen hormonas provenientes

de otros tejidos. Sin embargo, la información generada por los modelos *in vitro*, a menudo no explica de manera satisfactoria los fenómenos observados dentro de la complejidad de un organismo. Surge entonces la necesidad de corroborar *in vivo* tales observaciones y así poder integrar la información y establecer conclusiones inequívocas acerca del fenómeno de interés.

Los modelos *in vivo*, a diferencia de los modelos *in vitro*, son sistemas muy complejos, que en ocasiones dificultan la interpretación de resultados por la cantidad de variables que intervienen en un solo fenómeno. La ventaja del uso de estos modelos es que muestran al fenómeno de interés tal como sucede dentro de un organismo, incluyendo a todas las variables que sobre él tengan algún efecto.

VÉRTEBRAS CAUDALES

Varios sitios en el cuerpo muestran de manera temporalmente precisa y localizada actividades metabólicas óseas, como reclutamiento celular, activación de las células reclutadas, desarrollo de la función celular y senescencia. Uno de estos sitios lo constituyen las vértebras caudales de roedores. En estadio postnatal se utilizan frecuentemente como un modelo de experimentación *in vivo*. En las vértebras caudales se desarrolla una secuencia predecible y progresiva de maduración esquelética, en dirección cráneo-caudal. En este modelo el desarrollo esquelético es llevado a cabo sucesivamente en cada vértebra y la mayoría de estos eventos suceden después del nacimiento. Los estudios realizados en las vértebras caudales de roedores, han contribuido al entendimiento de procesos como el desarrollo de osteoblastos, la regulación de la formación de hueso endostal y la regulación de aspectos relacionados con la biología del osteoclasto (2).

PLACA DE HUESO ECTÓPICO

La placa de hueso ectópico es un modelo de experimentación *in vivo*

que consiste en la inducción de la formación de hueso ectópico, a través de osificación endocondral, por partículas de matriz ósea desmineralizada (PMOD) (17). En el sistema de implantación subcutánea de PMOD en ratas, se induce una serie de eventos que conducen a la producción de una placa convexa de hueso en el sitio del implante, ectópico. El desarrollo de esta placa de hueso ectópico (PHE), sucede a través de una secuencia de eventos condro- y osteo-inductivos de manera directamente comparable a lo observado en la formación normal de los huesos vía endocondral. Después de tres días de implantadas las PMOD, los fibroblastos (células del mesénquima) rodean a las partículas implantadas, observándose proliferación de estas células que se transforman en condroblastos (células inmaduras de cartílago). Hacia el día 5 o 6, los condroblastos se han diferenciado a condrocitos, posteriormente sufren hipertrofia hacia el día 9, cuando se inicia la mineralización de la matriz de cartílago, producida por los condrocitos, y la invasión vascular. Al día 10 es evidente la condrólisis y la osteogénesis, con presencia importante de osteoblastos. El hueso nuevo, formado por los osteoblastos en este sitio, es remodelado por osteoclastos y se observa desarrollo de médula ósea en la PHE hacia el día 21 después del implante (18).

Este modelo resulta muy conveniente en cuanto a su manipulación, reproducibilidad, accesibilidad al tejido óseo que lo conforma y con la gran ventaja de sus características fisiológicas. Su uso ha contribuido a la resolución de muchas incógnitas referentes al proceso y regulación de la osificación endocondral, así como para investigar los efectos que tienen varios tóxicos (ej. aluminio y plomo) y drogas sobre aspectos relacionados al desarrollo óseo *in vivo*.

RATONES TRANSGÉNICOS

Los animales modificados genéticamente se denominan animales transgénicos (en los cuales un gen es

eliminado, modificado o sobreexpresado), y estos han sido herramientas muy útiles en el desarrollo de conocimientos aplicables al ser humano o en su beneficio. El uso de animales transgénicos ha ayudado a comprender el origen de algunas enfermedades óseas y a estudiar y entender los mecanismos de diferenciación celular y morfogénesis ósea.

En la actualidad las modificaciones genéticas se han llevado a cabo en su mayoría en ratones. La transgénesis en ratones se ha visto favorecida debido a las ventajas reproductivas y al relativo bajo costo de su producción con respecto a otras especies (19).

Utilizando ratones transgénicos como modelos de estudio, se han ido identificando factores moleculares involucrados en enfermedades óseas frecuentes, como son los casos de la osteogénesis imperfecta, la cual se caracteriza por una fragilidad extrema de los huesos, relacionada con mutaciones en los genes de las procolágenas pro- $\alpha 1(I)$ y pro- $\alpha 2(I)$ y de uno de los tipos de condrodisplasias, caracterizada por el acortamiento de los huesos largos y por consecuencia relacionada con baja estatura, que involucra mutaciones en el gen de la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP, uno de los muchos péptidos relacionados con el crecimiento de los huesos) y mutaciones en el gen de la colágena IX (19).

Entre las modificaciones más frecuentemente utilizadas, es la eliminación de un gen, denominada *knockout*. Al eliminar un gen, deja de producirse la proteína codificada por ese gen y de esta forma se puede evaluar la función de esa proteína en específico, con base en las alteraciones que provoca su ausencia en el animal. Por ejemplo, en ratones con carencia de osteocalcina se altera, entre otros, el proceso de remodelación ósea. Gracias a estos modelos, también se conocen varios genes que participan en la regulación transcripcional de la osificación durante el desarrollo y durante el establecimiento del patrón esquelético, entre los que

se encuentran CBFA1 y OSX (10, 3).

Cualquier manipulación genética requiere de un análisis cauteloso de sus resultados. Se debe considerar, por ejemplo, que la sobreexpresión de genes puede cambiar la actividad de otros genes y mostrar efectos que son el resultado de la suma de las alteraciones en todos los genes que se vieron afectados y no sólo del gen manipulado.

Los *knockout* solamente mostrarán efectos sobre los huesos si los genes eliminados son esenciales para la función esquelética. Por otro lado, en los ratones que carecen de una proteína desde el inicio de su desarrollo pueden evocarse mecanismos de compensación que ayuden a reemplazar o compensar, en mayor o menor grado, la función de la proteína faltante. Con la intención de eliminar estos mecanismos de compensación, se han generado los llamados ratones *knockout* inducibles o condicionales. La estrategia para obtener estos animales es crear la dependencia de un factor externo para que se deje de producir una proteína específica. Es decir, el gen de interés será suprimido sólo cuando se dé el estímulo externo adecuado. Así se evita que la falta, desde estadios tempranos, de la proteína codificada por el gen eliminado genere los mecanismos compensatorios que complican la interpretación de los resultados o incluso los modifican (19).

CONCLUSIÓN

Durante mucho tiempo los modelos de experimentación *in vitro*, para el estudio del tejido óseo, ocuparon un lugar muy importante en cuanto a la producción de conocimiento al respecto. Ahora se acepta que, aunque valiosos, los resultados obtenidos de estos modelos con frecuencia han sustentado conclusiones erróneas. Las razones son principalmente, el hecho de que las células no funcionan de manera normal cuando se les aísla de su ambiente fisiológico y que ninguna condición de cultivo *in vitro*, puede sustituir las complejas interacciones entre las células, la matriz ósea y

factores sistémicos, que ocurren *in vivo*. Estos principios han originado discrepancias entre las conclusiones alcanzadas en diferentes estudios y han complicado el entendimiento de los mecanismos biológicos que regulan la formación y el mantenimiento de los huesos.

Para tratar de resolver esta situación, se han ideado estrategias experimentales llevadas a cabo en modelos *in vivo*, que permiten complementar, corroborar o descartar las observaciones hechas en estudios *in vitro*.

Los modelos de experimentación *in vivo*, ofrecen la posibilidad de estudiar, de manera fisiológica y localizada, fenómenos como formación, resorción y mineralización ósea, que requieren de la complejidad del medio *in vivo* para poder llevarse a cabo.

Más recientemente se han establecido modelos *in vivo*, como los animales transgénicos, los cuales han suministrado información abundante sobre las funciones de ciertas proteínas en el hueso y su participación en algunas enfermedades óseas. Las posibilidades que ofrecen los animales transgénicos, el avance de la tecnología del DNA y su combinación con otros modelos de experimentación, resultan actualmente muy amplias.

La interpretación de resultados de modelos *in vivo*, aunque compleja, resulta mucho menos cuestionable que en modelos *in vitro*. Sin embargo, no se debe perder de vista las implicaciones del uso de animales como modelos de experimentación, tales como la bioética, la legislación nacional e internacional para el uso de animales en laboratorios, así como los

protocolos de producción, instalaciones para mantenimiento, alimentación y trato de los animales, que aseguren la adecuada utilización y máximo aprovechamiento de ellos, considerando su naturaleza de ser vivo susceptible al dolor. Todo esto conduce a la necesidad de alcanzar la compatibilidad entre el avance en el conocimiento y el respeto a los animales.

Es claro que todo el avance en el conocimiento del tejido óseo, que han permitido tanto los modelos *in vitro* como los modelos *in vivo*, ha servido no sólo para progresar en la comprensión de los mecanismos involucrados en el óptimo funcionamiento de los huesos, sino también para favorecer el desarrollo de mejores métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano.

REFERENCIAS

1. Andrew E y Rosenberg M D (1995) El sistema esquelético y los tumores de los tejidos blandos: Huesos. En Patología Estructural y Funcional. Editorial: Mc. Graw-Hill Interamericana, España. pp 1331-1367.
2. Marks S C Jr y Hermey D C (1996) The structure and development of bone. En Principles of Bone Biology. Editorial: Academic Press, USA. pp 3-14.
3. Karsenty G (2003) The complexities of skeletal biology. *Nature*. 423:316-318.
4. Aubin J E y Liu F (1996) The osteoblast lineage. En Principles of Bone Biology. Editorial: Academic Press, USA. pp 51-67.
5. Guyton A C. (1998) Hormona paratitoida, calcitonina, metabolismo del calcio y del fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En Tratado de Fisiología Médica. Editorial: Interamericana Mc. Graw-Hill, México. pp 1079-1098.
6. Orlandini S Z, Formigli L, Benvenuti S, Lasagni L, Franchi A, Masi L, Bernabei P A, Santini V, Brandi M L (1995) Functional and structural interactions between osteoblastic and preosteoclastic cells *in vitro*. *Cell Tissue Res*. 281(1): 33-42.
7. Suda T, Udagawa N y Takahashi N (1996) Cells of bone: osteoclast generation. En Principles of Bone Biology. Editorial: Academic Press, USA. pp 87-102.
8. Tsukki K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Yano K, Shibata O, Udagawa N, Yasuda H (1998) Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1, 25-dihydroxivitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 246:337-341.
9. Gilbert S F (2000) Osteogenesis: the development of bones. En Developmental Biology. Editorial: SINAUER, USA. pp 454-459.
10. Kronenberg H M (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 423: 332-336.
11. Sodek J y Berkman F A (1987) Bone cell cultures. *Methods Enzymol*. 145: 303-324.
12. Cohn D V y Wong G L (1979) Isolated bone

- cells. En *Skeletal Research an Experimental Approach*. Editores: Simmons D J y Kunin A S, U.S.A. pp 3-20
13. Majeska R J. (1996) Culture of osteoblastic cells. En *Principles of Bone Biology*. Editorial: Academic Press, USA. pp 1229-1237.
 14. Hakeda Y y Kumegawa M (1996) The growth and culture of bone cells: osteoclastic. En *Principles of Bone Biology*. Editorial: Academic Press, USA. pp 1217-1228.
 15. Stern P H y Raisz L G (1979) Organ culture of bone. En *Skeletal Research an Experimental Approach*. Editores: Simmons D J y Kunin A S, USA. pp 21-59.
 16. Murrills R J (1996) In vitro bone resorption assays. En *Principles of Bone Biology*. Editorial: Academic Press, USA. pp 1239-1251.
 17. Urist M R (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899.
 18. Reddi A H y Huggins C (1972) Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69(6): 1601-1605.
 19. Clark S y Rowe D W (1996) Transgenic animals. En *Principles of Bone Biology*. Editorial: Academic Press, USA. pp 1161-1172.

ENFOQUES MOLECULARES DE LA METÁSTASIS TUMORAL*

MIGUEL ÁNGEL MAYORAL CHÁVEZ¹, EDGAR ZENTENO GALINDO¹,
BLANCA ESPINOSA MANCILLA², SALVADOR MARTÍNEZ CAIRO³ Y JORGE GUEVARA FONSECA⁴.

RESUMEN

La metástasis tumoral es la más grave complicación del cáncer y es causante de la mayoría de las muertes por esta enfermedad. El fenómeno de migración celular tumoral surge como un mecanismo complejo que logra hacer que las células tumorales migren desde su sitio primario, hacia otros sitios que no necesariamente están conectados por contigüidad. Esta migración celular logra su objetivo gracias a la participación de diversas moléculas proteicas entre las que se cuentan a las moléculas de adhesión celular, las enzimas proteolíticas y diversos factores de señalización. En esta revisión, se ofrece un panorama general de este complicado mecanismo, y la importancia de las moléculas involucradas, así como las alteraciones en los patrones de su glicosilación.

PALABRAS CLAVE: Metástasis, glicosilación, moléculas de adhesión.

ABSTRACT

Metastasis is the most serious complication of cancer and is the main cause of death by this disease. Cell migration appears like a complex mechanism, which make the tumor cells go from his primary site to others not necessarily connected by contiguity. This cell migration gets his objective due to the participation of several proteic molecules such adhesion cellular molecules, proteolytic enzymes and many signal factors. This review shows a general view of this complicated mechanism and the significance of the involved molecules, as well as the alterations of the patterns of its glycosylation.

KEY WORDS: Metastasis, glycosylation, adhesion molecules

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en las ciudades industrializadas; se produce cuando una población celular escapa a los mecanismos de regulación y continúa incrementando el número de células indefinidamente. La diferencia más significativa de las células cancerosas con las células normales es su elevada proliferación, causada entre diversos factores, por la falla en la regulación bioquímica de la mitosis celular, sea por mutaciones genéticas en la expresión de oncogenes como ocurre en el caso del oncogen *Ras* (1) que se activa por mutaciones puntuales, que en estado normal codifica para una familia de proteínas de 21 kDa conocidas como p21^{ras} cuya función radica en la transmisión de señales celulares, pero una vez mutado

cambia el fenotipo celular que varía de división a diferenciación celular. Por otro lado, la pérdida de anti-oncogenes o genes supresores de tumor, reguladores negativos de la división celular también lleva al desarrollo del cáncer. En la mayoría de los cánceres humanos las mutaciones genéticas más frecuentes ocurren en los antioncogenes, con excepción de las leucemias y los linfomas.

Dentro de estos antioncogenes se encuentra por ejemplo, el gen p53 cuyo producto proteico, la proteína del mismo nombre se une al ADN y regula los fenómenos apoptóticos, de detención del crecimiento y reparación del ADN entre otras funciones (2). La célula tumoral tiene la capacidad para inmortalizarse, regula las telomerasas para regenerar a los telómeros y evitar de esta manera el

envejecimiento o la muerte celular (3).

Se ha descrito el modelo de peligro ("danger model") que sugiere que se desarrolla una respuesta inmune específica como resultado de la detección discriminada entre antígenos. De esta manera, las células tumorales transformadas expresan antígenos que están completamente ausentes o expresados en sólo pequeñas cantidades en células somáticas. Estos antígenos pueden ser re-expresiones de antígenos embrionarios (oncofetales, como por ejemplo el antígeno carcinoembrionario), antígenos de diferenciación (proteínas normales sobre-expresadas, como es el caso de las proteínas reguladoras del melanocito que se sobre-expresan en el melanoma), antígenos virales (por virus oncogénico-

* Recibido: 16 febrero 2004 Aceptado: 05 octubre 2004

1 Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM, México D.F. mianmayo@yahoo.com

2 Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Tlalpan 12410 México D.F.

3 Coordinación de Investigación, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F.

4 Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INN y N), Av. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, C. P. 14269, México, D. F. jorgix_gj@yahoo.com.mx

cos como el virus del papiloma humano) o proteínas mutadas que funcionan como antígenos debido a mutaciones puntuales de genes celulares normales y representan antígenos tumorales únicos. La mayoría de los casos de antígenos de células tumorales deberían ser eliminados. La realidad no es tan sencilla, la célula tumoral puede escapar a las respuestas específicas inmunológicas mediante diversos mecanismos, postulándose que las células transformadas son genética y fenotípicamente menos estables que las células normales y pueden rápidamente adaptarse a las nuevas condiciones y escapar de la destrucción inmune (4). Con este escape de la destrucción celular y la ubicación de las células tumorales en la circulación, da comienzo la migración a distancia que culminará con el reestablecimiento en sitios secundarios o metástasis. Estos antígenos tumorales tienen composición diversa; de esta manera, puede haber antígenos de tipo oligosacarídico como es el caso del antígeno de Thomsen-Friedenreich, que expone residuos de Galactosa (Gal) en el disacárido Gal β 1,3-GalNAc (GalNAc = N-AcetilGalactosamina) y que constituye un marcador importante de malignidad de células con expresión oligosacarídica de tipo mucínico.

METÁSTASIS TUMORAL

Metástasis se refiere a la transferencia de células tumorales desde un órgano o parte de él hacia otro no directamente relacionado por contigüidad y constituye la más grave complicación y principal causa de muerte en pacientes con cáncer. En la ruta del proceso de transferencia muchas de las células son destruidas, así es que se garantiza la supervivencia mediante el apolotonamiento celular y la expresión de glicoconjugados citoprotectores tumorales como es el caso de oligosacáridos de tipo N-glicosídicos que contienen ramas GlcNAc β -1,6-Man (GlcNAc = N-Acetil Glucosami-

na, Man = Manosa) que se incrementa luego de la transformación en diversos tipos celulares por un número de virus tumorales y oncogenes que inducen la expresión de enzimas β -1,6-N-Acetil-glucosamiltransferasa V (MGAT5, E. C: 2. 4. 1. 155) en el aparato de Golgi (5) y cuya expresión se asocia con un incremento en la motilidad celular y decremento en la adhesión al sustrato.

La migración celular a distancia ocurre a través de rutas vasculares, linfáticas o tisulares (6). El proceso de

la metástasis puede dividirse en cinco estadios mayores, que no tienen una línea clara de demarcación entre uno y otro, pueden operar simultáneamente y que se ha denominado cascada metastásica (Fig. 1). Inicia con la ruptura de la interacción local célula-célula, alterando la membrana basal, invadiendo e infiltrando tejido circunvecino sano, con penetración a vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación), de esta forma permite el establecimiento de células neoplásicas, como células aisladas o pequeñas

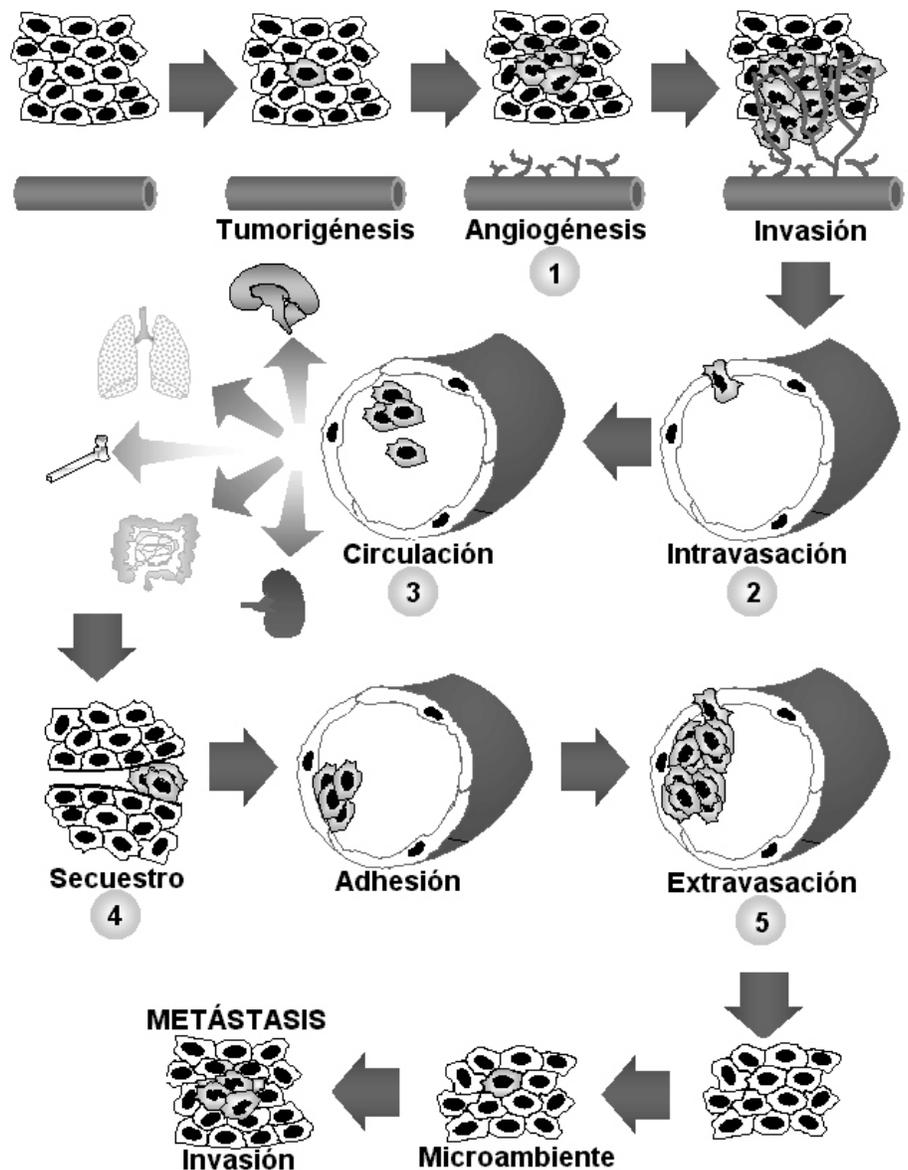


FIGURA 1. La cascada metastásica. Descrita en cinco pasos que no tienen línea delimitada de separación y que pueden ocurrir simultáneamente: 1. Angiogénesis; 2. Intravasación; 3. Circulación; 4. Secuestro en la microcirculación y trombosis; 5. Extravasación e invasión a distancia.

cadena de ellas dentro de la circulación. Algunos factores que participan en el proceso metastásico son: la supervivencia en la circulación, el secuestro en terminaciones capilares de órganos distantes y el escape de los vasos (extravasación), que favorecen el establecimiento, el crecimiento y la diseminación de células tumorales.

La extravasación es considerada como uno de los pasos críticos para la invasión celular a distancia, y se ha sugerido que esta función es independiente de la habilidad metastásica, por tanto la facultad de las células para extravasarse no es predictivo ni subsecuente de metástasis, pero los eventos post-extravasación pueden ser determinantes en la metástasis (7). Las principales causas del inicio de invasión pueden ser por presiones mecánicas, presencia de enzimas proteolíticas, incremento en la motilidad celular, pérdida de cohesión célula-célula y célula-matriz extracelular, entre otros.

La invasión sucede por un crecimiento descontrolado, caracterizado por la rápida proliferación de células neoplásicas. La presión que ejerce la masa celular en crecimiento bloquea vasos sanguíneos locales que llevan a la muerte celular y a una reducción en la resistencia mecánica. Por otro lado, las células tumorales estimulan la síntesis y expresión de enzimas proteolíticas como catepsina, metaloproteinasas, colagenasas y activadores del plasminógeno, tanto en la célula tumoral como en el tejido sustrato sobre el que están actuando. Existe además un incremento en la motilidad de células tumorales (migración celular), en la que participan diversos factores de motilidad para células cancerosas y células no malignas, primero como factores de crecimiento, proteínas estimulantes secretadas por la célula tumoral que se dirigen al espacio extracelular, para acoplarse a receptores específicos en la superficie celular y que actúan sobre sustratos cercanos a la célula cancerosa (factores parácrinos) o pueden retornar y actuar sobre la

misma célula que los secretó (factores autócrinos), para influenciar el microambiente de cada célula y, a partir de ello, los patrones morfológicos resultantes. Un factor de motilidad convierte una célula de un estado estático a uno dinámico, transición caracterizada por la aparición de agregados de membrana como digitaciones filiformes, lamelares y pseudopodios. Diversos factores de motilidad se han descrito para las células cancerosas. Por ejemplo, el factor de motilidad autócrina (AMF) es una citocina secretada por tumores que regula el crecimiento celular, la motilidad por una vía mediada por receptor y estimula la quimioquinesis y quimiotaxis (8).

Las células invasoras se adhieren *in vivo* alrededor de las moléculas de la matriz extracelular a través de receptores específicos como las integrinas, y responden a señales transducidas por esta interacción, junto con señales de citocinas y factores de crecimiento celular, para producir una serie de proteasas. Se involucran así dos fenómenos importantes: la quimiotaxis, que describe la motilidad celular en respuesta a un gradiente de atrayente soluble y la haptotaxis, que denota la motilidad a través de fijadores de sustratos atrayentes insolubles como la laminina y la fibronectina. La quimiotaxis y la haptotaxis participan en la regulación de la invasión tumoral y la metástasis (9).

LA GLICOSILACIÓN Y LA METÁSTASIS TUMORAL

Los carbohidratos poseen funciones diversas debido a su gran estabilidad y a la diversidad estereoquímica de las uniones glicosídicas. Los carbohidratos predominantemente encontrados en glicoproteínas humanas son la galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc, ácido siálico). La modificación de proteínas por unión de carbohidratos (glicosilación), es la

más extensa modificación co- y post-traducciona en células eucariotas (10). La unión de carbohidratos es catalizada por glicosiltransferasas específicas en tres tipos de glicosilación conocidas que son: la *N*-, *O*- y *C*-glicosilación. La ruta de glicosilación es muy importante para la estabilidad y función celular, de tal manera que las alteraciones de la glicosilación de los tejidos se asocian con la progresión de la enfermedad, definiendo en algunas ocasiones la malignidad cancerosa de algunas estirpes celulares (10), estas alteraciones son el resultado de glicosiltransferasas que involucran cambios en los patrones de glicosilación (11). Otro importante factor de malignidad y proliferación es la sialilación, tal como se ha observado en células de linfoma de Burkitt, en los que la expresión de sialilglicoconjugados favorece la adhesión de las células del linfoma al colágeno tipo IV y la fibronectina (12), así como el potencial metastásico tumoral.

PARTICIPACIÓN DE DIVERSAS PROTEÍNAS EN LA METÁSTASIS

Los eventos moleculares precisos relacionados con la formación de fenotipos metastásicos no están del todo claros; algunos ejemplos de proteínas involucradas son los miembros de la superfamilia *Ras* que fueron anteriormente mencionadas, son proteínas que unen GTP y se han implicado en la regulación de diversas funciones biológicas que incluyen a la progresión tumoral. De esta forma, las rutas efectoras *Ras* median las actividades tumorigénicas y metastásicas (13). Otra amplia familia de proteínas asociadas con la migración celular tumoral son las proteínas de la familia S100, en particular la proteína S100A, que es uno de los marcadores moleculares para potencial metastásico con significancia pronóstica más alta (14) y que ha demostrado no ser una molécula tumorigénica (15), pero sí un inductor de metástasis en masas tumorales (16). Toda una gama de proteínas participan activamente tanto

en la carcinogénesis como en la metástasis, constituyendo un complicado sistema de proteínas y glicoproteínas involucradas que van desde las moléculas de adhesión celular hasta proteínas con actividad catalítica, pasando por las proteínas producto de la expresión génica alterada y las proteínas receptoras o emisoras de señalización celular.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y METÁSTASIS.

Las moléculas de adhesión célula-célula ayudan a mantener a las células en su lugar. Estas moléculas de adhesión se pueden ver disminuidas o comprometidas en células cancerosas, como se ha observado en la expresión del complejo E-cadherina-catenina que funciona como un reductor de la proliferación tumoral, invasión y formación de metástasis; sin embargo, en algunos tipos de carcinomas diferenciados se observa un decremento en la expresión de estas moléculas de adhesión que favorece la invasión y la metástasis. El mantenimiento integral de las vías de señalización a través de factores solubles, adhesiones a célula-matriz extracelular y adhesión célula-célula es una de las más importantes funciones de la multicelularidad. La correcta integración de estas señalizaciones favorece el crecimiento celular apropiado, la diferenciación y la morfogénesis, final pero la incorrecta contribuye a fenómenos patológicos entre los que destaca la proliferación celular, el cáncer y la metástasis. En estos fenómenos de regulación participan activamente las moléculas de adhesión en sus diversas formas (Fig. 2). La gran gama de moléculas de adhesión que orquestan los fenómenos de desacoplamiento, migración celular y acoplamiento a otros sustratos involucra a prácticamente todas las familias de estas moléculas, algunas de ellas glicosiladas. Esta porción glicosídica la que es clave en todos los fenómenos antes descritos, debido a que es la que interactúa en la señalización y comunicación celular,

que llevarán a la célula tumoral a independizarse y responder a conveniencia ante las modificaciones del medio externo para garantizar no sólo su supervivencia, sino su implantación y desarrollo a distancia.

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS Y METÁSTASIS

Las metaloproteinasas de la matriz son una gran familia íntimamente relacionada: endopeptidasas metalo-dependientes de zinc que, una vez activadas, entre otras funciones degradan una variedad de componen-

tes de la matriz extracelular y desempeñan un papel importante en los eventos de remodelación tisular tales como el desarrollo embrionario, angiogénesis, ovulación, involución de la glándula mamaria. La expresión anormal de ellas contribuye en diversos procesos patológicos que incluyen a la artritis reumatoide, osteoartritis, enfisema pulmonar, crecimiento tumoral y metástasis (17). La transformación de la hiperplasia pre-neoplásica en carcinoma, se ha visto asociada con un fuerte incremento en la actividad de metalo-

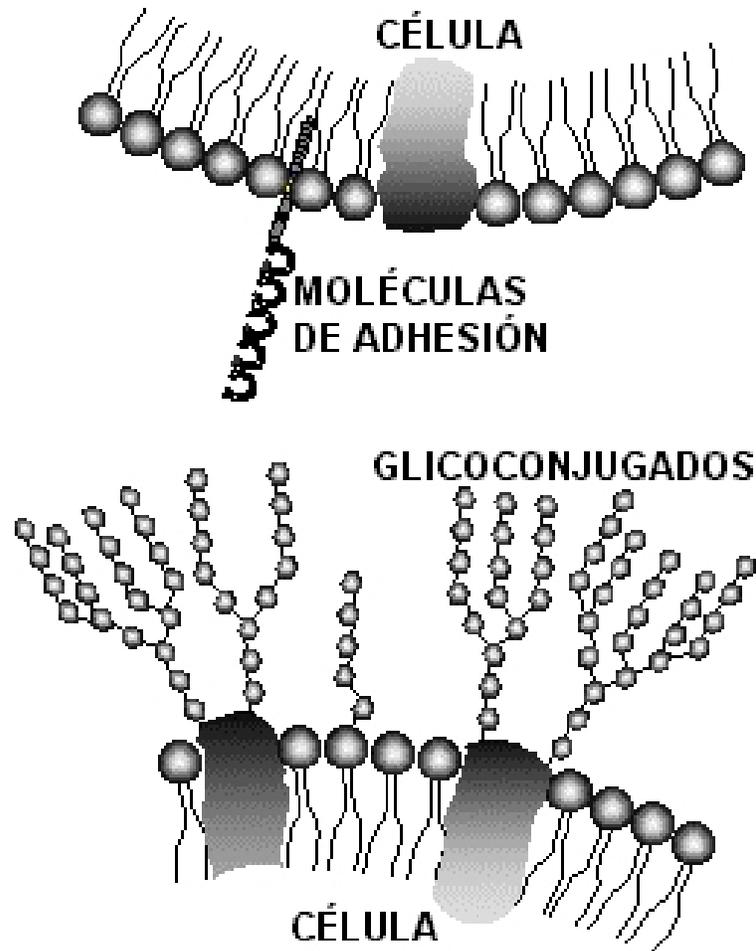


FIGURA 1. Participación de las moléculas de adhesión y proteínas receptoras en el reconocimiento de glicoconjugados celulares. Debido a que la comunicación y la vida social celular se realiza a merced del reconocimiento de moléculas expresadas o no en la superficie celular, la célula tumoral que está adaptándose a las adversidades externas a ella para independizarse y hacerse autónoma, desempeña estas funciones mediante la expresión a conveniencia de oligosacáridos de superficie para no ser reconocida por las células del sistema inmunológico, para desacoplarse de las células circunvecinas, migrar y acoplarse a otros elementos circulantes como las plaquetas (por ligandos a moléculas de adhesión que reconocen residuos oligosacáridicos a través de selectinas) o a células del sistema inmunológico (por adhesión a fracciones oligosacáridicas de tipo sialilado que reconocen los NK) y finalmente acoplarse a células endoteliales o tisulares mediante el reconocimiento por selectinas, para establecerse en sitios secundarios.

proteinasas (18). Un factor importante en el fenómeno de la invasión celular tumoral es la modificación sustancial del pH tisular, que en tejidos sanos es de alrededor de 7.5 y en células tumorales se acidifica con valores de pH menores a 7.0, este efecto es generado en parte por la glicólisis, tanto anaerobia como aerobia en el metabolismo de la glucosa, que conlleva a la generación de ácido láctico en concomitancia con la disgregación tumoral y la neovascularización, mecanismo que se propone podría preparar al tejido tumoral a los eventos hipóxico-isquémicos que se presentan paradójicamente con la angiogénesis y que frecuentemente se acompañan de necrosis tisular durante la invasión y la metástasis. El fenómeno invasivo y metastásico involucra la degradación de matriz extracelular por las células tumorales, mediante la producción de enzimas proteolíticas secretadas por el tumor a través de organelos ácidos en forma de proenzimas inactivas y que requieren de un pH ácido para su activación, medio que aporta el secuestro protonado del que ha sido objeto la producción de ácido láctico (19).

CONCLUSIONES

La metástasis tumoral es la mayor complicación del cáncer y es la responsable de la muerte en la mayoría de los casos. Aparentemente

la participación activa de las moléculas de adhesión en este fenómeno es crucial, sin embargo las alteraciones en los patrones de glicosilación tanto de las moléculas de adhesión, como de la superficie celular tumoral, resultan ser más importantes, ya que sin estas modificaciones sustanciales en la expresión de un patrón de oligosacáridos de superficie determinado, la célula tumoral no podría señalar factores de crecimiento, adhesión y migración celular. Por otro lado, son estas alteraciones de la glicosilación las que protegen a la célula de la identificación inmune y su destrucción. La metástasis no surge como un fenómeno aleatorio, ya que la dirección a sitios blanco específicos está mediada por las diversas moléculas de adhesión y la expresión tanto de sus receptores sacarídicos, como la de los carbohidratos de superficie celular con los que interactúa la célula tumoral para reconocerse o reconocerlos y lograr migrar e implantarse en sitios a distancia juega una importante función. Puede haber sitios de implantación de "primer paso" metastásico, pero la mayoría de las células tumorales tienen bien definido el sitio al cual van dirigidos. Además, no sólo los factores mecánicos celulares producidos por el incremento en número de células tumorales y la compresión local son los responsables de la migración celular. En realidad,

más allá de un simple modelo metastásico en el cual una célula es empujada fuera de su sitio por el incrementado y desordenado crecimiento de sus vecinas, y luego atrapada en un vaso sanguíneo por azar para, de igual manera azarosa, viajar a través del torrente circulatorio e implantarse en un sitio cualquiera; la metástasis parece ser un mecanismo mucho más complejo, con potenciales genéticos de migración celular, modificaciones sustanciales de señalización y reconocimiento celular e implantación a distancia específica. Es claro que no todos los tipos de células tumorales generan metástasis y aquellas que sí lo hacen también han mostrado ciertos sustratos de predilección, dejando a un lado estas ideas de aleatoriedad. El conocimiento de estas modificaciones en los patrones de glicosilación que llevan a una célula tumoral a expresar un carbohidrato a conveniencia para pasar inadvertida por el sistema inmunológico, transportarse mediante el reconocimiento de estos residuos por moléculas de adhesión celular o receptores titulares o membranales, ayudan a comprender mejor el complicado mecanismo de la cascada metastásica y a esclarecer el fenómeno más que como un evento casual y aleatorio, como un complejo mecanismo ordenado y dirigido.

REFERENCIAS

- 1 Hernández MM, Ríos HMA (1999). Oncogenes y cáncer. *Rev Cub Oncol* 15 (2): 131-139.
- 2 Knudson AG (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10914-10921.
- 3 Kovkarova E, Stefanovski T, Dimov A, Naumovski J (2003). Telomerase in lung cancer diagnostics. *Radiol Oncol* 37 (2): 109-113.
- 4 Kowalczyk DW (2002). Tumors and the danger model. *Acta Bioc Polon* 49 (2): 295-302.
- 5 Couldrey C, Green JE (2000). Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* 2: 321-323.
- 6 Fisher B, Fisher ER (1966). The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surg Gynecol Obstet* 122: 791-798.
- 7 Koop S, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Khokha R, Grattan M, Leone J, Chambers AF, Groom AC (1996). Independence of metastatic ability and extravasation: Metastatic *ras*-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci, USA* 93: 11080-11084.
- 8 Silletti S. (1998). Autocrine motility factor and the

- extracellular matrix. II. Degradation or remodeling of substratum components directs the motile response of tumor cells *Int J Cancer* 76: 129-135.
- 9 Perumpanani AJ, Simmons DL, Gearin AJH, Miller KM, Ward G, Norbury J, Schneemann M, Sherratt JA (1998). Extracellular matrix-mediated chemotaxis can impede cell migration. *Proc R Soc Lond* 265: 2347-2352.
- 10 Hakomori S (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *PNAS* 99(16): 10231-10233.
- 11 Jiménez MC, Trejo H, Herrera A, Romero JL, Chávez R, Lascrain R, Zenteno E (2002). Alteraciones de la glicosilación en las enfermedades humanas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 15(1): 39-47.
- 12 Susuki O, Nosawa Y, Kawaguchi T, Abe M (2002). UDP-GlcNAc2-epimerase regulates cell surface sialylation and cell adhesion to extracellular matrix in Burkitt's lymphoma. *Int J Ocol* 20: 1005-1011.
- 13 Webb CP, Aelst LV, Wigler MH, Vande Woude GF (1998). Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 95: 8773-8778.
- 14 Takenaga K, Nakamura Y, Endo H, Sakiyama S (1994). Involvement of S100-related calcium-binding protein pEL98 (or mts1) in cell motility and tumor cell invasion *Jpn J Cancer Res* 85: 831-839.
- 15 Davies M, Harris S, Rudland P, Barraclough R (1995). Expression of the rat, S-100-related, calcium-binding protein gene, p9Ka, in transgenic mice demonstrates different patterns of expression between these two species. *DNA Cell Biol* 14: 825-832.
- 16 Kim EJ, Helfman DM (2003). Characterization of the Metastasis-associated Protein, S100A4. *J Biol Chem* 278(32): 30063-30073.
- 17 Stamenkovic I (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10: 415-433.
- 18 Steeg P (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis 'Has it spread?': disarming one of the most terrifying questions. *Breast Cancer Res* 2: 396-399.
- 19 Webb CP, Aelst LV, Wigler MH, Vande Woude GF (1998). Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 95: 8773-8778.

LAS MITOCONDRIAS EN LA HERENCIA MATERNA. EL CASO DE LA SORDERA

En 1962 fue Luft quien introdujo el concepto de miopatía mitocondrial al describir las anomalías musculares, morfológicas y bioquímicas que se observaron en un caso clínico característico de disfunción mitocondrial. Después se comprobó que los órganos con células altamente diferenciadas que tienen mayor cantidad de mitocondrias y demanda energética, como las musculares o las del cerebro, son las que se afectan con más frecuencia. Otros estudios demostraron alteraciones en otros órganos y sistemas por lo que en la actualidad se prefiere usar el término citopatía mitocondrial.

La totalidad del DNA mitocondrial (DNAMt) proviene del óvulo y por tanto se ha pensado que se hereda sólo de la madre. Esto implica que no está sujeto a un proceso llamado recombinación. Este concepto se ha cuestionado últimamente, ya que se han encontrado secuencias derivadas de la madre y del padre con técnicas de PCR en un paciente con desórdenes mitocondriales (1), mientras que en otros éste no aparece (2). En cualquier caso, sería necesario demostrar que estas secuencias son heredadas por la progenie para validar esta afirmación.

El DNAMt presenta mutaciones espontáneas, algunas de las cuales son inocuas, es decir no son patológicas y tienden a perpetuarse en un mismo individuo e incluso en grupos. A estas mutaciones inocuas se les denomina polimorfismos los que tienen características antropológicas regionales y aparecen en las mitocondrias de todas las células del organismo. Las mutaciones patológicas del DNAMt generalmente son heteroplásmicas (copias con mutación y sin mutación conviven en cada célula) y pueden ser de dos tipos: uno, caracterizado por la ablación o pérdida de un segmento de las cadenas circulares del genoma mitocondrial, generalmente de presentación esporádica; y el otro, de tipo puntual donde sólo se sustituye una base nitrogenada por otra.

El DNA mitocondrial (DNAMt) humano es una molécula circular pequeña de dos cadenas con 16,569 bases que se replica y se transcribe usando un origen de replicación y un promotor para cada una de las dos cadenas. Cada mitocondria posee de 2 a 10 copias de su propio genoma y pueden existir más de 10,000 copias de DNAMt por cada célula somática. El DNAMt humano tiene 37 genes que codifican para dos RNAs ribosomales (RNAr) el 16S y el 12 S, veintidós para sendos RNAs de transferencia (RNAt) y trece para genes estructurales. Los 13 genes estructurales del DNAMt codifican sólo para 13 de los polipéptidos que participan en la fosforilación oxidativa. En proporción a la cantidad de información genética total del ser humano, el

genoma mitocondrial representa únicamente el 0.00006% del material genético; sin embargo, éste resulta indispensable para la replicación, transcripción y síntesis de algunas proteínas claves de los complejos respiratorios. El DNAMt tiene una frecuencia de mutación 10 a 17 veces mayor que el DNA nuclear. Esto puede deberse a diversos factores, entre otros: la falta de mecanismos eficientes para reparar el DNAMt, la alta concentración de radicales libres de oxígeno en la mitocondria y a la carencia de proteínas del tipo de las histonas.

Recientemente se han reconocido en las células auditivas citopatías mitocondriales que causan sordera. Esta es el defecto sensorial más común en los humanos y su origen puede ser genético o ambiental o una combinación de ambos. Aproximadamente 1 de cada 1000 niños pueden afectarse en etapas perinatales o en la niñez temprana y casi un 30% de los adultos mayores de 65 años sufre una pérdida auditiva considerable. La sordera o "anacusia" puede ser "sindrómica" (que cursa con otras alteraciones sistémicas) o "no sindrómica" también llamada sordera pura.

El mapeo genético de la sordera se ha centrado en los genes codificados por el DNA nuclear; sin embargo, también puede ser heredada de la madre en forma no Mendeliana, relacionada con alteraciones en el DNAMt. En ambos casos la sordera puede ser sindrómica o no sindrómica, por lo que se ha llamado genéricamente "Pérdida auditiva heredada de la madre" (PAHM). (3)

La sordera de origen mitocondrial se presenta generalmente en la pubertad o en la primera juventud como una hipoacusia que empeora con el tiempo; sin embargo, su aparición y grado de severidad varía, aún dentro de la misma familia.

El gran número de sorderas de tipo PAHM sugiere un papel muy importante de las mitocondrias en la función del oído interno y se ha postulado que cualquier alteración en la producción de ATP en las células sensoriales afecta principalmente al transporte iónico del cual depende casi exclusivamente la fisiología auditiva.

La primera mutación descrita en humanos que cursa con sordera no sindrómica fue la A1555G en el gen de la subunidad 12S del RNA ribosomal mitocondrial (mit RNAr 12S) del mit DNA. Esta mutación es de particular interés al conferir cierta hipersensibilidad a los antibióticos aminoglicósidos (AG) como la estreptomina (STP) que destruye a las células sensoriales del oído interno. La asociación entre la A1555G y la PAHM se ha confirmado en multitud de familias en el mundo, en especial en aquellas de origen ibérico, asiático o árabe-israelí. Esta mutación

altera la estructura de la subunidad mit RNAr 12S de tal manera, que se impide la iniciación de la síntesis mitocondrial de proteínas, lo cual es exacerbado en presencia de AG. En ausencia de AG se actúa en paralelo con alteraciones de genes probablemente de origen nuclear.

Se ha identificado esta mutación en mitocondrias de fibroblastos y linfocitos. En condiciones normales estas células no se alteran por incubación con AG, por lo que una explicación a la especificidad ototóxica de los AG puede ser, que éstos se acumulan solamente en el oído interno. Este hallazgo es de singular importancia puesto que es posible que en pacientes con hipersensibilidad a los AG, también exista mutación en fibroblastos y linfocitos, lo que facilitaría su detección en una muestra de sangre.

Dado que la población mestiza mexicana tiene antecedentes étnicos en los grupos mencionados, se determinó la presencia de la mutación A1555G y de otras (961delT y A7445G) en individuos sometidos a tratamiento con AG. La detección se realizó en DNA de sangre total por PCR y restricción enzimática. Se trabajó con 4 grupos: a) individuos sanos normales, b) pacientes tratados con AG

que presentaban arreflexia vestibular, c) con sordera e hipersensibilidad a AG y d) con daño coclear por etiología desconocida. En ningún caso se detectaron estas mutaciones; sin embargo, en el "asa D" (D-loop), contiguo al gen del tRNA^{phe} y a la región 5' de la subunidad mit RNAr 12S se detectaron varios polimorfismos en los individuos con arreflexia vestibular que podrían estar asociados a la hipersensibilidad a los antibióticos.

Cuando las secuencias donde se hallan estos polimorfismos se alinearon con las conocidas para grupos europeo, amerindio u oriental una región C-C-C-C era distinta, por lo que es probable que el mexicano constituya un grupo diferente, lo que sería muy útil en Medicina Genómica.

Resumen de trabajo presentado en el XII Congreso de la Asociación de Profesores de Bioquímica. Financiado parcialmente por CONACyT (38952-M)

Dra. Graciela Meza Ruíz,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
gmeza@ifc.unam.mx

FOROS DE DISCUSIÓN

Una de las actividades más importantes que desarrollan los profesionales dedicados a la educación e investigación es la discusión de temas que les atañen. El análisis de un tema a partir de un enfoque y lograr diferentes puntos de vista, que permitan el contraste de las ideas es esencial para las actividades de investigación y docencia; actividades donde la verdad no existe como recurso de referencia inamovible, sino que es solo un recurso alcanzable y cambiante, que avanza y se modifica a la luz de nuevas discusiones y que es diferente dependiendo del matiz y el enfoque. Aun así, hemos tenido una pobre discusión de los grandes temas de la educación y la investigación y áreas del quehacer nacional que nos afectan. Solo algunas ideas individuales

se presentan en el medio especializado y que decir de los medios de divulgación general, salvo honrosas excepciones que logran convertirse en temas de discusión y reflexión. Es por ello que la REB trata de contribuir humilde y limitadamente, pero no sin el mayor entusiasmo y con las mejores intenciones a la generación de estas discusiones, esperando hagan eco en los diferentes protagonistas de la academia y la sociedad de nuestro país. Sean pues, bienvenidas sus contribuciones.

José Víctor Calderón Salinas
Editor en Jefe

FORO DE DISCUSIÓN :SOBRE LOS CIENTÍFICOS

En este número se propone este foro, con ánimos de estimular la participación de nuestros colegas. Independientemente que lleguemos o no a un acuerdo de quienes somos, podría ser de utilidad para aquellos que quieran abrazar la actividad científica, o mejor aún, para quienes aún no la han comprendido y tienen en sus manos el futuro de la Ciencia Mexicana.

Graciela Meza

LOS CIENTÍFICOS: ¿QUIÉNES SOMOS?

Unos de los problemas por los cuales hay tan poco apoyo a la ciencia es que nosotros los científicos no hemos sabido definir y comunicar en qué consiste nuestra actividad.

Ningún individuo pondría en duda que el arte debe existir “porque sí”. El pueblo en general “admira” las obras de arte y nunca se le ocurriría preguntar ¿Cuánto costó? ¿Para qué sirve? ¿En qué puede ayudar? ¿Cuántos problemas nacionales puede resolver una determinada escultura, cuadro, pieza de música etc.?

Entonces, porqué se pregunta a los científicos ¿para qué sirve su hallazgo? ¿En que beneficiaría a la humanidad? ¿Cuántos problemas nacionales podría solucionar?

Creo que es porque no hemos sido capaces de identificar quienes somos, para qué sirve lo que hacemos y el gran esfuerzo que requiere ser un buen científico.

Algunos científicos han opinado que hacer ciencia es “divertido”, otros que dedicarse a la ciencia es viajar y conocer gente nueva. Otros que desean no ser molestados “pues se dedican a pensar cosas importantes”. Todo esto nos califica como triviales, fatuos y superficiales.

Tendríamos que empezar por relatar cómo es la carrera de un científico. Cuánto tiempo toma alcanzar un nivel o

meta (“grado”), qué quieren decir “los grados”, cómo se alcanza la formación de la “personalidad científica”, cómo se adquiere la capacidad analítica, cuán profunda es la “autocrítica”, cómo se aprecia la evaluación “por los pares (colegas que se dedican a lo mismo)”, cuales son las capacidades necesarias, a cuántas cosas hay que renunciar, explicar que la ciencia es una “filosofía de vida”, no una nueva actividad profesional.

De este inventario quizá saldrían habilidades que definirían porqué es importante la cercanía de un científico, las cualidades que se aprovecharían, el beneficio que emanaría “de su persona” y no de lo que “sabe hacer”.

Es urgente replantearse las estrategias utilizadas en el pasado, identificar los errores cometidos, aspectos del quehacer científico hasta ahora ignorados y explicar porqué sería útil incluir a un científico en actividades, aún aquellas que se antojen lejanas a la ciencia. Vale la pena el riesgo y los resultados serían inmejorables, a mi manera de ver.

Dra. Graciela Meza Ruiz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
gmeza@ifc.unam.mx

¿POR QUÉ INVERTIR EN LA CIENCIA MEXICANA?

Los mexicanos presenciamos este año 2004 D.C. un debate por el gasto del presupuesto de la nación. En el centro de estas discusiones está la inversión en ciencia y tecnología en el país (e.g., desarrollo tecnológico de PeMex, impulso a la educación superior pública, gasto en ciencia, etc.). ¿Por qué tendríamos siquiera que discutir sobre eso? ¿Es acaso importante para la nación el desarrollo científico y tecnológico? ¿No es esa la responsabilidad de los países del primer mundo? Para poder entender esto es importante primero saber ¿Que es ciencia y que es tecnología? Ciencia se define como “La habilidad de encontrar soluciones a problemas en campos diversos”; tecnología es “la aplicación de la ciencia al comercio o la industria”.

Ahora bien, ¿Porqué un país como México, en las condiciones actuales de crisis económica mundial debe invertir en estos rubros? Esta pregunta debió estar en la mesa de las dicusiones de nuestros asambleistas, políticos y en nuestros hogares. Con el interés de contribuir en estas discusiones que seguro volverán a nuestras vidas, me dirigo a Ustedes lectores para dar los antecedentes a esta polémica. Pero encontrar el principio de un tema como este no es tarea fácil, así que decidí hacerlo por el primer antecedente del cual tenemos evidencia de su existencia: el origen de la inteligencia y habilidad humana.

Hace 40,000 años la llamada familia de los humanos (hominidos) dio a luz al primer *Homo sapiens sapiens*, el ancestro cercano al hombre moderno (1). Este humano comparte con el *Homo habilis* - quien habitó este planeta hace 2 millones de años, la capacidad de construir herramientas y de hablar, habilidades que le facilitaron su existencia y que nos diferencian de otras especies similares a la humana como son los chimpances.

El humano tiene 20,000 años de explorar el arte de crear conceptos sofisticados que nos han permitido sobrevivir en muy diversos habitats. Esto se evidencia con el descubrimiento de herramientas construidas a partir de materiales como el hueso, la pintura y la música. En estas habilidades se incorporó el uso del cobre en la manufactura de armas y utensilios hace 6,500 años y hace 2,500 años se utilizó el fierro para estos propósitos (2).

Las culturas Egipcias, Griegas y Romanas institucionalizaron por primera vez esta capacidad creativa del hombre al impulsar en su cultura las artes y la filosofía (3). Estas culturas se diferenciaron de otras en su inquietud por explicar las experiencias humanas sin un fundamento teocrático, dando origen a la cultura moderna. Todas estas manifestaciones de nuestra identidad ocurrieron hace no mas de 2,200 años y perduró hasta la llamada era Medieval en Europa (1,000-1,500 D.C.). Seguido de un período de oscurantismo, la raza humana vió nacer la llamada Revolución Científica en los siglos XVI-XVIII. En este

período se consolidaron disciplinas tales como las matemáticas, filosofía, física, astronomía y medicina, dando origen a las primeras sociedades científicas en Inglaterra en el año de 1645 D.C. (3).

Para finales del siglo XVIII, Inglaterra se transformó de un pueblo agricultor en una sociedad industrializada al desarrollar máquinas para la fabricación de textiles. Este fue el origen de la llamada Revolución Industrial (3). Transformaciones similares se observaron durante el siglo XIX en varias naciones europeas y hasta la primera mitad del siglo pasado países como Rusia y Japón desarrollaron sus propias tecnologías en sus sistemas de producción. A mas de un siglo de esta revolución, existen muchos países en el mundo que no han alcanzado a incorporar sus propias tecnologías en sus sistemas de producción (3). ¿Porqué sucede esto? ¿Es esto un plan maquiavélico de los países industrializados para mantener sozogados a los demás países? ¿O tal vez esta latencia en la mayoría de los países obedece a limitaciones culturales de los mismos? En este contexto, no es sorprendente que sea Inglaterra la madre de la Revolución Industrial, ya que fue esta misma quién generó la primera sociedad científica en el mundo. No es sorprendente tampoco que los llamados países del primer mundo hayan sido también los primeros en acoger el desarrollo científico y tecnológico.

Veamos el caso de nuestro país por ejemplo. El 12 de Agosto de 1959 se consolida la primera agrupación de científicos en México (Academia de la Investigación Científica, ahora Academia Mexicana de Ciencias) (4). El gobierno Mexicano en 1970 establece el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CoNaCyT) cuya misión es “impulsar y fortalecer el desarrollo científico y la modernización tecnológica de México, mediante la formación de recursos humanos de alto nivel, la promoción y el sostenimiento de proyectos específicos de investigación y la difusión de la información científica y tecnológica” (5). En el año 2000 D.C. México por primera vez plantea apoyar el desarrollo tecnológico mediante fondos disponibles al CoNaCyT y los científicos mexicanos, dejando a cargo la definición de las prioridades a las distintas secretarías de Estado (6). El día de hoy México cuenta con una planta de menos de 10,000 científicos trabajando en distintas áreas (7). Es decir, México tiene un poco mas de 40 años acogiendo a la ciencia, mientras que la ciencia misma tiene mas de 400 años. Aun mas, México tiene solo 30 años de haber institucionalizado el desarrollo tecnológico mientras que el desarrollo tecnológico tiene un poco más de 200 años.

¿Que nos ha mantenido alejados de la ciencia por tantos años? ¿Acaso no hemos presenciado suficientes

ventajas en este quehacer? Aunque Usted no lo crea, en gran medida este alejamiento se debe a una falta de visión de los mexicanos. Por ejemplo, en Octubre y Noviembre del año 2004, el periódico Reforma en México publicó una serie de artículos del Dr. Enrique Canales, miembro de comisión de fondos mixtos del CoNaCyT, que buscan dar apoyo a una iniciativa del gobierno para reducir el gasto en ciencia, favoreciendo solo el gasto en el desarrollo tecnológico (8). En estas publicaciones se juzga a los científicos de ser atendidos y de no trabajar para dar resultados útiles para el país. Pero ¿Cómo se puede alcanzar la aplicabilidad del conocimiento científico en tan solo 30 años y con una inversión de menos del 0.001% del producto interno bruto en ciencia? Nuevamente, aunque Usted no lo crea, la ciencia mexicana ya ha generado invenciones redituables a la sociedad Mexicana. Cabe citar el reciente libro del Dr. Francisco Bolivar Zapata "Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna", que describe algunos de estos logros en el área de la Biotecnología (9).

Entonces, ¿Porqué un país como México, en las condiciones actuales de crisis económica mundial debe invertir en ciencia? Después de nuestro viaje histórico, a mi se me ocurren estas respuestas: México debe invertir en ciencia por que esta constituye la esencia de la raza humana; por que la tecnología no existe sin la ciencia; por que de ella depende la autonomía tecnológica e intelectual de nuestro país. Por otra parte, México no debe invertir en ciencia si los mexicanos consideran que solo debemos adquirir conocimiento del extranjero; porque solo debemos explotar nuestras riquezas naturales sin saber como hacerlo de forma eficiente y sobre todo de forma sustentada; porque los mexicanos consideremos que la ciencia es una moda que pronto pasará. Pero tal vez yo este sezgado en mi opinión. Tiene Ud. lector, la última palabra en esto.

Dr. Gabriel del Río
gdelrio@ifc.unam.mx

REFERENCIAS

1. [Http://www.talkorigins.org/faqs/homs/species.html](http://www.talkorigins.org/faqs/homs/species.html)
2. <http://www.bergen.org/technology/techis.html>
3. <http://www.fordham.edu/halsall/science/sciencesbook.html>
4. http://www.amc.unam.mx/c_acercade.htm
5. <http://www.conacyt.mx/comunicacion/mision-vision.html>
6. <http://www.conacyt.mx/dap/pecyt/index.html>
7. <http://www.amc.unam.mx/atlas.htm>
8. Periódico la Reforma. 19 de Octubre 2004.
9. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/ModuloX.pdf>

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Sara Rodríguez-Enríquez y

David G. Mendoza-Cozatl,

Correo E: saren960104@hotmail.com

TEMA: Control Metabólico

La glucólisis puede simplificarse para su análisis de control en dos bloques de enzimas conectados por un intermediario que trabajan en estado estacionario (bloque productor *P* y bloque consumidor *C*). Por ejemplo, en el siguiente esquema el bloque productor *P* se refiere a todas las enzimas que participan en la formación de fructosa 1,6BP (transportador de glucosa, HX, PGI, y PFK) mientras que el bloque consumidor *C* se refiere al conjunto de enzimas que consumen al metabolito (aldolasa, TIM, GAPDH, PGK, PGM, enolasa, PK y LDH):

Bloque productor *P* → Fruc 1,6BP → Bloque consumidor *C*;

Para determinar cual de los bloques de enzimas, el bloque productor *P* o el bloque consumidor *C* de Fruc 1,6 BP, ejerce un mayor control sobre el flujo glucolítico se utiliza el análisis de control de las elasticidades. Este enfoque requiere de la determinación de los coeficientes de elasticidad de cada uno de los bloques. El coeficiente de elasticidad (ϵ) se define como el grado de respuesta que tiene una enzima en estado estacionario, al variar la concentración de cada metabolito que interacciona con ella.

Experimentalmente los ϵ pueden calcularse variando el flujo de glucólisis y midiendo la concentración del intermediario, en este caso Fruc 1,6BP, para cada bloque de enzimas.

En células de hepatoma AS-30D, el flujo del bloque productor *P* y del bloque consumidor *C* (medido como glucólisis) se tituló con inhibidores que actúan selectivamente en cada segmento de la vía: para disminuir la actividad del bloque productor *P* se utilizó el análogo no metabolizable de la glucosa, 2-desoxiglucosa (0.1- 1 mM), que inhibe a la PGI; mientras que para variar la actividad del bloque consumidor *C* se utilizó el arsenito (25-200 μ M) que inhibe selectivamente a la GAPDH. La inhibición del bloque productor *P* modifica la concentración intracelular del metabolito, por lo que es posible determinar la elasticidad (sensibilidad o respuesta) del bloque consumidor *C* a esta variación en el sustrato y viceversa. En cada condición experimental se cuantificó la concentración de Fruc 1,6BP. Los valores de glucólisis y Fruc 1,6BP fueron normalizados considerando que el 100% corresponde a los valores en ausencia de inhibidor.

TABLA I.

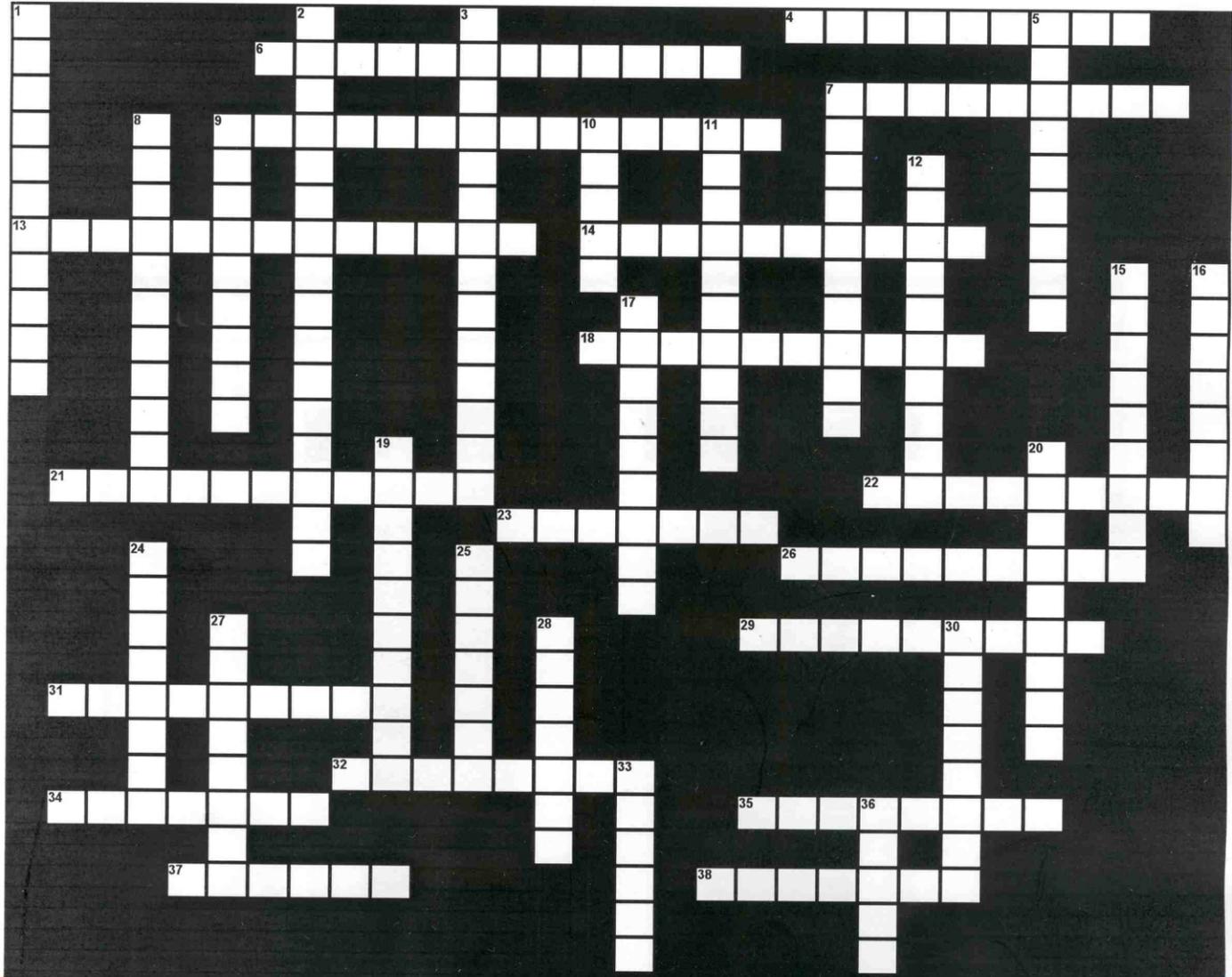
2-desoxiglucosa (mM)	Fruc 1,6BP %	Glucólisis %	Arsenito (μ M)	Fruc 1,6BP %	Glucólisis %
0	100 (111)	100 (20)	0	100 (86)	100 (13)
0.10	65	66	25	181	76
0.25	59	44	50	216	66
0.50	52	25	75	308	62
1	37	38	100	327	63
			200	274	52

Los valores absolutos de la concentración de Fruc 1,6BP (nmol/mg) y glucólisis (nmol/min/mg prot) se muestra entre paréntesis.

Calcule los coeficientes de elasticidad y de control de flujo de ambos bloques de enzimas

CRUCIBIOQ

AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS



HORIZONTALES

- 4 Moléculas orgánicas con funciones tan variadas como hormonas, enzimas, anticuerpos, además de que son constituyentes de membranas, cabello, tendones, piel, etc.
- 6 Isómeros que son imágenes especulares y que no se pueden superponer.
- 7 Éster metílico de-L-aspartil-L-fenilalanina, se usa como edulcorante.
- 9 Proteínas de membrana, algunas son antígenos como las que determinan los grupos sanguíneos.
- 13 Proceso empleado en el estudio de aminoácidos o proteínas en donde se separan mezclas de moléculas mediante particiones entre una fase móvil y una estacionaria.
- 14 Carbono presente en todos los aminoácidos a excepción de la glicina, reúne al carboxilo, al grupo amino y a la cadena lateral.
- 18 Estructura de la cadena polipeptídica en la que cada 3.6 residuos de aminoácidos se encuentran muy próximos.
- 21 Estructura resultante de la asociación no covalente de

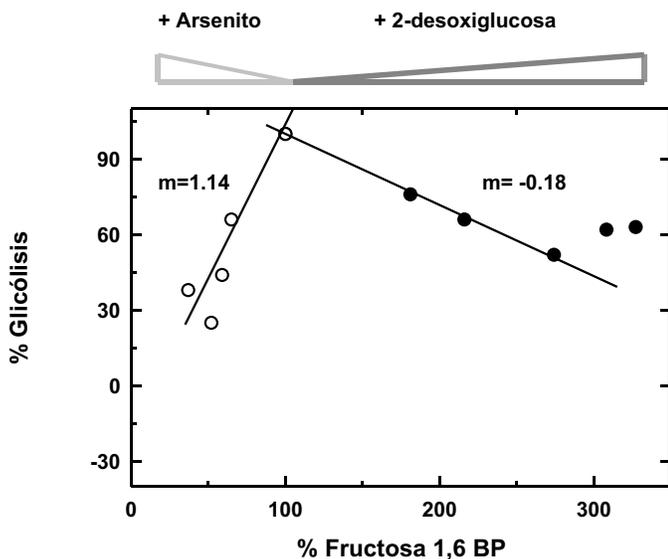
- dos o más subunidades polipeptídicas.
- 22** Grupo que, en el ácido glutámico se encuentran dos y es el responsable del carácter ácido de los aminoácidos.
- 23** Grupo de aminoácidos en el que se encuentra la arginina, su cadena lateral está cargado positivamente.
- 26** Aminoácido cuya cadena lateral tiene una estructura heterocíclica de cinco átomos llamada imidazol.
- 29** Característica de las moléculas al interactuar con el agua a pH fisiológico, permitiéndoles que sean o no solubles en ella.
- 31** Proteína presente en uñas, lana, cabello, pezuñas, concha de tortuga, escamas, cuernos, plumas y capa externa de la piel.
- 32** Proteína de alta resistencia estructural, formada por una hélice con tres residuos por vuelta en forma levógira y posteriormente tres de esas hélices enrolladas con giro dextrógiro.
- 34** Aminoácido no esencial, tiene una masa molecular de 89 y según los estudios de De Klapper (1977) se encuentra presente en el 9.0%, de las proteínas.
- 35** Aminoácido diamino monocarboxílico que no forma parte de las proteínas, pero que es un intermediario importante en la vía mediante la cual se sintetiza la urea.
- 37** Investigador que en 1953 resolvió la secuencia de la insulina. La cadena A es idéntica en hombre, cerdo, perro, conejo y cachalote.
- 38** Aminoácido que no tiene carbono asimétrico, es el de menor peso molecular y pertenece al grupo de aminoácidos apolares alifáticos.
- 8** Decapéptido circular con función de antibiótico, es producido por *Bacillus brevis*; tiene en su composición dos D-aminoácidos.
- 9** Tri péptido formado por glicina, glutamato y cisteína, es un potente reductor, interviene, entre otras reacciones, en la reducción de peróxidos que se forman durante el transporte de oxígeno.
- 10** Diseñador del método que lleva su nombre, el cual consiste en identificar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y se basa en la reacción seriada del último aminoácido de la secuencia con fenilisotiocianato.
- 11** Grupo de aminoácidos que reúne a la fenilalanina, la tirosina y al triptófano.
- 12** Péptido (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) opiáceo presente en cerebro, inhibe la sensación de dolor.
- 15** Producto de la descarboxilación de un aminoácido, vasodilatador y su liberación elevada forma parte de la respuesta alérgica.
- 16** Hormona pancreática que interviene en la regulación del metabolismo de la glucosa.
- 17** Unión formada ante la deshidratación de dos aminoácidos, en donde participa el carboxilo del primero y el amino del segundo.
- 19** Sus abreviaturas son Trp o W es considerado esencial dado que en la especie humana no se puede sintetizar, razón por la que debe ingerirse en los alimentos; según De Klapper (1977) es el de menor presencia en las proteínas.
- 20** Condición en la que los aminoácidos se encuentran en solución acuosa y por ende exhiben su carácter ácido o base.
- 24** Aminoácido responsable de la formación de puentes disulfuro en las proteínas.
- 25** Junto con la actina como estructuras filamentosas, participa en la contracción del músculo esquelético.
- 27** Forma parte del tejido conjuntivo elástico, se encuentra presente en los ligamentos y puede extenderse en dos dimensiones.
- 28** Elemento que se encuentra presente en la cadena lateral de tirosina, serina y treonina; y que se une a la hemoglobina para ser transportado a través de la sangre.
- 30** Proteína de bajo peso molecular cuya función es regular el metabolismo de la glucosa.
- 33** Elemento químico que se encuentra presente en metionina, cisteína y cistina.
- 36** Grupo presente sólo en el aminoácido prolina.

VERTICALES

- 1** Se unen en forma covalente, en secuencias características, para dar lugar a un polímero que tiene aproximadamente 16% de nitrógeno.
- 2** Proteínas sintetizadas por los linfocitos de los vertebrados, están dedicadas a la defensa del organismo contra la invasión de patógenos.
- 3** Aminoácido modificado que se encuentra en la colágena; junto con el aminoácido del cual proviene, constituyen el 21%.
- 5** Elemento químico imprescindible en las proteínas además de carbono, oxígeno e hidrógeno.
- 7** En 1806 se descubrió el primer aminoácido, se encuentra en el espárrago.

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

El coeficiente de elasticidad de los dos bloques de enzimas se calcula siguiendo la ecuación $\epsilon = \frac{M_0/V_0}{\delta V/\delta S}$; donde M_0 es la concentración inicial del intermediario y V_0 es la velocidad del flujo metabólico en estado estacionario; en una condición de estado estacionario, las velocidades de todas las enzimas son constantes e iguales, por lo cual al medir el flujo total de la vía también se está midiendo la velocidad de los bloques de enzimas. El cociente M_0 y V_0 al estar normalizados al 100% tienen un valor igual a 1. ($\delta V/\delta S$)_{ss} se refiere a la variación infinitesimal de la actividad enzimática al variar la concentración del intermediario M y se calcula de la pendiente de la gráfica de flujo (% de glucólisis) vs el intermediario (% Fruc 1,6BP), tal como se ilustra a continuación:



El punto de origen (100,100) del cual parten las dos líneas rectas, se obtiene de los valores de glucólisis y de concentración de Fruc1,6BP en ausencia de inhibidor. Las pendientes de cada recta son los ϵ de cada bloque de enzimas: al variar el flujo de glucólisis con 2-desoxiglucosa se puede determinar el grado de respuesta o elasticidad del bloque **consumidor** hacia Fruct 1,6 BP; es decir, la pendiente de la recta obtenida de titular con 2-desoxiglucosa es el coeficiente de elasticidad del bloque que consume la Fruc1,6BP con signo negativo porque denota que es producto del bloque P ($m = -0.18$). Por otro lado, la pendiente de la recta obtenida de titular el flujo de glucólisis y la concentración de Fruc 1,6BP con arsenito es el coeficiente de elasticidad del bloque **productor** del metabolito con pendiente positiva porque denota que es sustrato del bloque consumidor ($m = 1.14$).

El cálculo de los coeficientes de control de flujo (C_o) se realiza aplicando el teorema de la conectividad (Eq. 1) y la propiedad de la sumatoria (Eq. 2) que establece que la suma de los C_o de las enzimas en la vía metabólica es la unidad (100%).

$$C_C^{Glucolisis} \epsilon_{Fruc1,6BP}^C = - C_P^{Glucolisis} \epsilon_{Fruc1,6BP}^P \quad (Eq.1)$$

$$C_C^{Glucolisis} + C_P^{Glucolisis} = 1 \quad (Eq.2)$$

$$Si \epsilon_{Fruc1,6BP}^C = 1.14 \text{ y } \epsilon_{Fruc1,6BP}^P = -0.18$$

$$Entonces C_C^{Glucolisis} (1.14) = - C_P^{Glucolisis} (-0.18)$$

$$Sustituyendo 1.14 C_C^{Glucolisis} = (1 - C_C^{Glucolisis}) 0.18$$

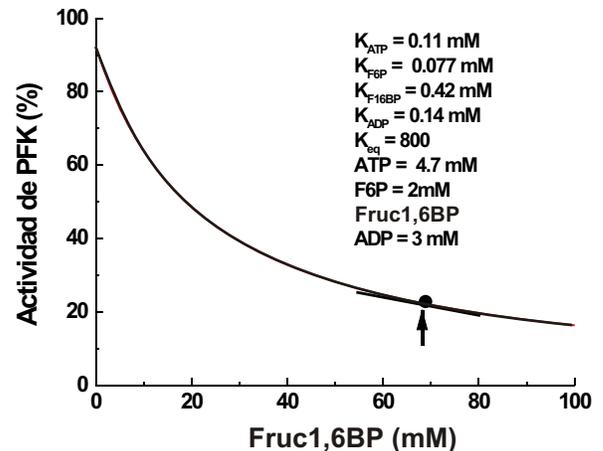
$$1.32 C_C^{Glucolisis} = 0.18$$

$$C_C^{Glucolisis} = 0.14$$

Sustituyendo en Eq 2:

$$C_P^{Glucolisis} = 0.86$$

El coeficiente de elasticidad del bloque productor P (-0.18) es menor que el del bloque consumidor C (1.14), lo cual significa que el bloque P es menos sensible a los cambios en la concentración de Fruc 1,6BP debido a que la actividad del bloque P se encuentra cerca de la saturación por Fruc 1,6BP:



En este gráfico se ilustra la actividad de PFK como un reflejo del comportamiento del bloque productor P a diferentes concentraciones de Fruc1,6BP. La flecha muestra la concentración intracelular de Fruct 1,6 BP (67 mM) en la región de saturación de la enzima. La simulación cinética se realizó utilizando la ecuación de Haldane y el software Microcal Origin 5.0.

Por lo tanto, el bloque *P* está constituido por enzimas que controlan notoriamente el flujo, i.e., su coeficiente de control de flujo es alto (0.86).

1) El bloque consumidor C responde con mayor rapidez que el bloque P a cualquier variación en la concentración de Fruc1,6BP, por lo que la actividad de las enzimas que lo

integran tiene un efecto menor en el flujo de glucólisis, i.e., su coeficiente de control de flujo es bajo (0.14).

2) Por lo tanto, el bloque de enzimas integrado por el transportador de glucosa, HK, PGI y PFK controla en mayor proporción el flujo de glucólisis (86%) en células tumorales AS-30D, mientras que el 14% restante es controlado por enzimas de la parte baja de la glucólisis.

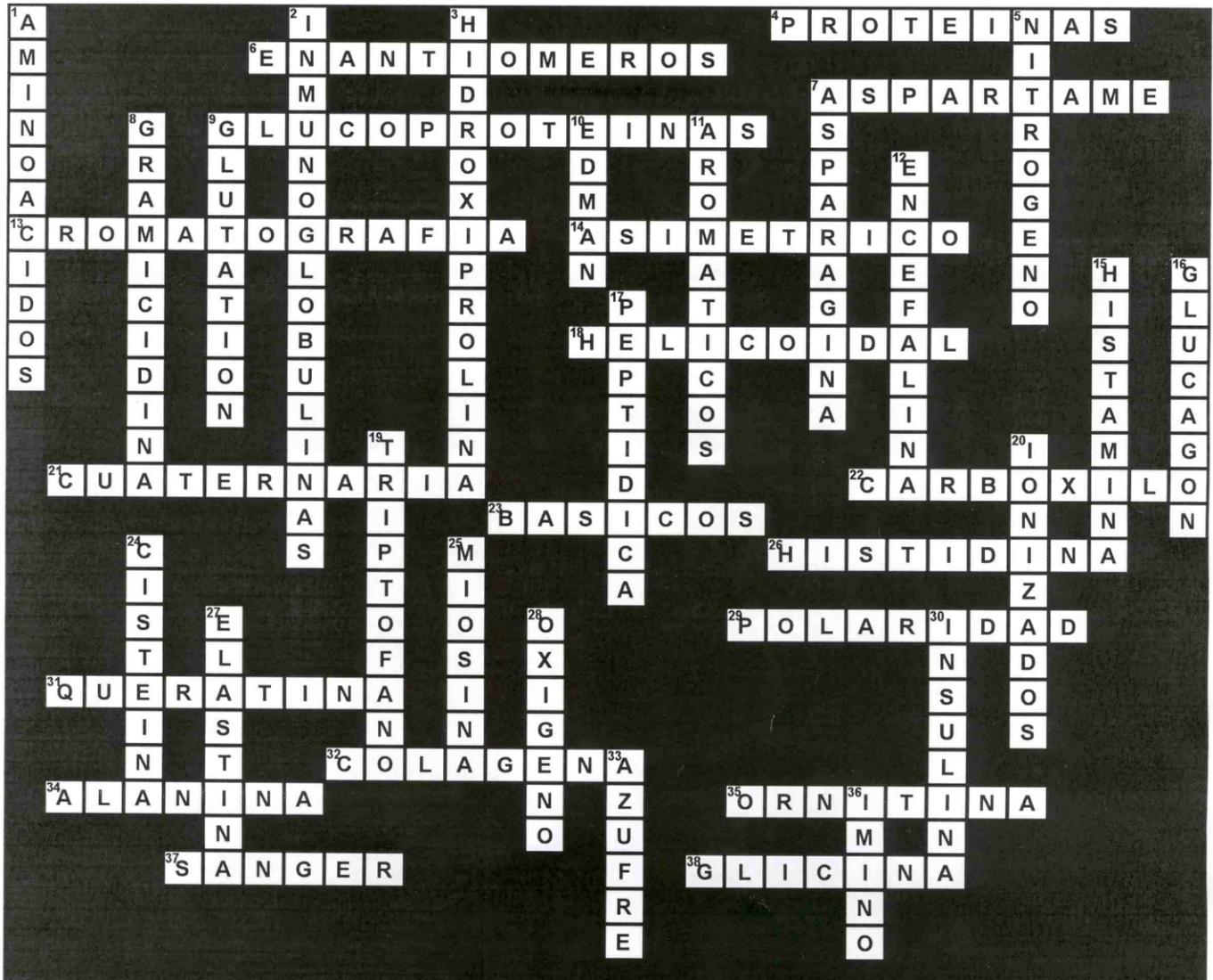
Sara Rodríguez-Enríquez y David G. Mendoza-Cozatl,
Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de
Cardiología. Correo E: saren960104@hotmail.com

REFERENCIAS

1. Westerhoff H V Groen A K y Wanders R J A. Biosci Rep (1984) 4: 1-22.
2. Fell D Biochem J (1992) 286: 313-330.
3. Uyeda K Mechanism of enzyme action. V II , CRC Press, 1990.
4. Bakker B M, Michels P A M, Opperdoes FR y Westerhoff. J Biol. Chem (1997) 272:3207-3215.

SOLUCIÓN CRUCIBIOQ

AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS




REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)**COMITÉ EDITORIAL****ACTUALIZACIÓN DE DATOS DE LOS SUSCRIPTORES**

Por favor sea tan amable de llenarlo a máquina y enviarlo a la brevedad posible, ya sea al Apartado Postal 70-810, Coyoacán, México, D.F. C.p. 04510 o por Fax al número (55) 5616.2419 o por correo electrónico a reb@laguna.fmedic.unam.mx

NOMBRE COMPLETO: Apellido Paterno _____
Apellido Materno _____
Nombre (s) _____
Correo (s) _____

DOMICILIO: Calle _____ Número _____ Apdo. Postal _____
Colonia _____
Delegación o municipio _____
Ciudad _____ Estado _____
Código Postal _____ País _____

TELÉFONOS Y FAX: Domicilio _____
Oficina _____

INSTITUCIÓN DONDE TRABAJA _____

Firma _____ Fecha _____

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

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.

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.

