

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. 4

DICIEMBRE 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.

REVISORES ASOCIADOS AL COMITÉ EDITORIAL (2004)

ROCÍO ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO ÁLVAREZ LLERA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

IRMA BERNAL LUGO
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

JESÚS CHIMAL MONROY
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

LUZ MARÍA DEL RAZO JIMÉNEZ
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

HÉCTOR JAVIER DELGADILLO GUTIÉRREZ
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

JOSÉ EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

CLARA INÉS ESPITIA PINZON
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

OSCAR FLORES HERRERA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

JOSE DE JESÚS GARCÍA TREJO
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

MARINA GAVILANES RUIZ
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

CARMEN GÓMEZ EICHELMANN
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOZA
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

LORENZA GONZÁLEZ MARISCAL MURIEL
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

AGUSTÍN GUERRERO HERNÁNDEZ
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

LUZ MARÍA LÓPEZ MARIN
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

VILMA MALDONADO LAGUNAS
Instituto Nacional de Cancerología

JORGE MELÉNDEZ
Universidad Autónoma Metropolitana

JORGE MEMBRILLO HERNÁNDEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

DAVID MENDOZA CÓZATL
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SARA RODRÍGUEZ ENRIQUEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

EMMA SAAVEDRA LIRA
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

PATRICIA TORRES DURÁN
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

JESÚS VALDÉS FLORES
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

JUAN R. VELÁZQUEZ RODRÍGUEZ
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI,
Instituto Mexicano del Seguro Social

NICOLÁS VILLEGAS SEPULVEDA
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

CONTENIDO

COMITE EDITORIAL

EDITORIAL

LAS MUJERES "NOBELES"
Dra. Graciela Meza Ruiz.....139

ARTÍCULOS

PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE LA
PROTEÍNA INHIBIDORA I κ B EN LA
ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN NF- κ B
Lucia Nikolaia López Bojórques.....140

MONO-ADP-RIBOSILACIÓN:
IMPLICACIÓN EN LA FISIOLOGÍA DE LOS
ORGANISMOS
Angel Hilario Alvarez Herrera.....149

LA UNIDAD Y LA DIVERSIDAD DE LOS
COMPLEJOS DE INICIACIÓN DE LA
TRANSCRIPCIÓN EN PROMOTORES
BASALES DE TIPO II
Miguel Martínez Trujillo, Gloria Solís
Guzmán y Yazmín Carreón Abud..... 157

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO.
DISEÑO DE UN OLIGONUCLEÓTIDO
PARA SU UTILIZACIÓN COMO SONDA
DE HIBRIDACIÓN
Emma Saavedra164

CRUCIBIOQ.
COLESTEROL Y SUSTANCIAS ASOCIADAS
Yolanda Saldaña Balmori.....165

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Emma Saavedra.....167

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori.....169

CONVOCATORIAS

CORRESPONSALES DE LA REVISTA
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA..... 170

ÍNDICE ANUAL DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....171

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA..... 174

EDITORIAL

LAS MUJERES “NOBELES”

El año de 2004 será memorable por un hecho inusitado: tres mujeres de los 8 laureados que recibieron el Premio Nobel: la austriaca Elfriede Selinek, el de Literatura; la Keniana Wangari Mathai, el de la Paz y la estadounidense Linda Buck el de Fisiología (o Medicina) compartiéndolo con Richard Axel.

Tanto Wangari como Linda provienen del área químico-biológica, lo cual es todavía más sorprendente, gratificante e inspirador para quienes nos dedicamos a la investigación en esos campos.

Es difícil resistir la tentación de mirar al pasado y no hacer un recuento de las mujeres “nobeles”. Impresiona descubrir que los hasta ahora otorgados en Química, Física o Medicina (Fisiología) suman apenas 12, contrastando con los recibidos por mujeres en Literatura y la Paz, que son 22; ambos no constituyeron ni el 5% del total otorgados desde el inicio de los Premios Nobel. El Premio Nobel de Economía todavía no se recibe por ninguna mujer.

Un análisis profundo de estas cifras, escapa al propósito de este escrito. La intención del mismo es más bien resaltar los méritos de las 7 mujeres que han sido homenajeadas con el Premio Nobel en Medicina o Fisiología.

El primero de ellos en 1947, para Gerty Theresa Cori, lo compartió con su esposo, Carl Ferdinand y Bernardo Houssay por sus estudios en el metabolismo de los carbohidratos. Rosalía Yalow, en 1977, recibió el Premio por el desarrollo de los inmunoensayos para las hormonas peptídicas y Barbara Mc Clintock los obtuvo en 1983, por sus descubrimientos en la movilidad de los elementos genéticos. En ambos casos fueron las únicas receptoras sin compartirlo con nadie más.

En los años siguientes, 1986, 1988 y 1995 las 3 mujeres ganadoras lo han compartido. Así, fueron Stanley Cohen y Rita Levi-Montalcini; James W. Black, Gertrude B. Elion y George H. Hitchius; Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric F. Wies-

chaus, en los respectivos años, por sus aportaciones en el descubrimiento de los factores de crecimiento nervioso y epitelial, los principios de la terapéutica y el control genético durante el desarrollo embriológico temprano, respectivamente.

Ninguna mujer antes que Linda Buck había sido galardonada por ocuparse de la Biología de los receptores sensoriales; Linda estudia el sistema olfatorio y compartió con Richard Axel el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en el 2004 por sus descubrimientos en los receptores periféricos moleculares de las sustancias odoríferas y sus efectos en las vías centrales del olfato.

El proceso por el cual el receptor periférico recibe la información odorífera y la transmite al cerebro, para que éste se de cuenta de que está “oliendo” e identifique el olor, es muy complejo, y numerosos grupos de investigadores se han abocado a estudiarlo en diferentes modelos experimentales.

Lo que Linda Buck y Richard Axel descubrieron es que en las células olfatorias del epitelio sensorial nasal, existen receptores, proteínas embebidas en las membranas, que reconocen a los diferentes componentes químicos que constituyen a los distintos olores. Cada célula olfatoria detecta un sólo componente. Al hacerlo envía una señal eléctrica que pasa por distintos relevos hasta llegar a la corteza olfatoria del cerebro. En esas neuronas es donde se integra esa información, combinándose en un patrón que es característico de cada olor. Los receptores moleculares olfatorios son codificados en una familia de cerca de 1,000 genes, cuyas combinaciones y expresión dará por resultado el proceso descubierto por Linda y Richard.

Este estudio inspirará a muchos otros investigadores (e investigadoras) que se dedican al olfato y a otro receptor sensorial químico no menos intrincado, que es el “gusto”.

Dra. Graciela Meza Ruiz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA INHIBIDORA I B EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- B*

LUCIA NIKOLAIA LÓPEZ BOJÓRQUEZ

RESUMEN

Las proteínas inhibidoras I B regulan la actividad del factor transcripcional NF- B al permitir su translocación al núcleo tras su degradación específica. Prácticamente todas las vías de transducción de señales que involucran NF- B, incluyen la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I B por parte del proteosoma. Se han identificado al menos seis isoformas de I B, que son capaces de interactuar a su vez con distintos heterodímeros de NF- B. Las isoformas I B- , I B- y I B- responden a los estímulos clásicos que activan a NF- B como citocinas inflamatorias y antígenos bacterianos. La degradación diferencial de estas isoformas no solo determina la velocidad de translocación del factor sino que también liberan diferentes pozas de homo y heterodímeros NF- B. Por su parte las isoformas I B- y Bcl-3 son específicas de ciertos tipos celulares, en particular de líneas mieloides y parecen ser relevantes en un control fino de NF- B durante el desarrollo y diferenciación del sistema inmune.

PALABRAS CLAVE: Factores de transcripción, proteínas inhibidoras, proteosoma, inmunidad innata, citocinas inflamatorias, familia Rel

ABSTRACT

The I B inhibitory proteins regulate the NF- B transcription factor activity by controlling its translocation in to the nucleus. All NF- B mediated transcription pathways involve the phosphorylation, ubiquitination and degradation of I B. There are six reported isoforms able of interacting with different NF- B dimers that inhibit their activity. The isoforms that are degraded in response to classical stimuli, such as inflammatory cytokines, and bacterial antigens are I B- , I B- and I B- . These inhibitors are processed by different time courses and release different NF- B pools. On the other hand, the isoforms I B- and Bcl-3 are restricted to specific cellular types, in particular to those from the myeloid lineage and allow a fine-tuning regulation during immune system development and differentiation.

KEY WORDS: Transcription factors, inhibitory proteins, proteasome, innate immunity, inflammatory cytokines, Rel family

INTRODUCCIÓN

El factor de transcripción NF- B se ha convertido en una de las proteínas reguladoras más estudiadas de los últimos 10 años. Fue descubierto como parte de la maquinaria de transcripción de los genes de la cadena

de las inmunoglobulinas en linfocitos B (de ahí su nombre). Ahora se le reconoce un papel privilegiado en la señalización de una gran variedad de fenómenos celulares. El sistema NF-

B participa en la transcripción de la

mayoría de los genes involucrados en la respuesta inmune innata, por lo que su activación es crucial tanto para la secreción de productos pro-inflamatorios por parte de los macrófagos, como para la activación endotelial.

NF- B está constituido en realidad por homo y heterodímeros que componen un factor de transcripción funcional que regula la expresión genética al unirse a secuencias específicas localizadas en la región promotora de los genes blanco. Es

importante mencionar que la mayor parte de los procesos de activación conocidos se dan en respuesta a estímulos extracelulares y que es un factor de transcripción cuya actividad se induce en pocos minutos. Su rápida activación resulta del hecho de que en la mayoría de las células hay grandes cantidades de este factor, que sin embargo, se encuentran en un estado inactivo.

La familia de factores NF- B regula la expresión de una gran variedad de genes, en particular

* Recibido: 11 de mayo de 2004 Aceptado: 05 de octubre de 2004

aquellos relacionados con el sistema inmune y el control de la proliferación celular. NF- B es un homo/heterodímero constituido por diferentes subunidades proteicas que se agrupan dentro de la familia Rel.

La familia Rel incluye genes que han permanecido altamente conservados durante la evolución de vertebrados. En mamíferos se han descrito varias proteínas Rel: p65 también denominada RelA, c-Rel, RelB, p105 (la cual es el precursor de p50) y p100 (de donde proviene p52). Se han descrito también homólogos de miembros de la familia Rel en *Drosophila*, plantas e incluso en levaduras (1). Todas las proteínas de esta familia tiene una región conservada de 300 aminoácidos en el extremo N llamado dominio Rel que es responsable de la dimerización, la unión a ADN y la interacción con las proteínas inhibidoras I B (2).

Como ya se mencionó, los factores de transcripción inducibles, generalmente están asociados a mecanismos que permiten su función solamente en respuesta a un estímulo externo. El caso de NF- B es un ejemplo interesante de cómo un factor de transcripción puede ser activado y desactivado mediante un complejo mecanismo que implica la interacción con otras proteínas reguladoras.

Esta revisión aborda aspectos que tienen que ver casi exclusivamente con los mecanismos que regulan a la familia de proteínas inhibidora I B, más que sobre el funcionamiento del factor NF- B, mismos que se abordan en otra revisión de carácter mas general y que se complementa con la presente (3).

El sistema NF- B/I B

De manera constitutiva, los dímeros NF- B se encuentran secuestrados en el citoplasma como moléculas inactivas formando un complejo con proteínas inhibidoras de la familia I B. En sus extremos carboxilos de las subunidades de NF- B contienen secuencias de aminoácidos que actúan

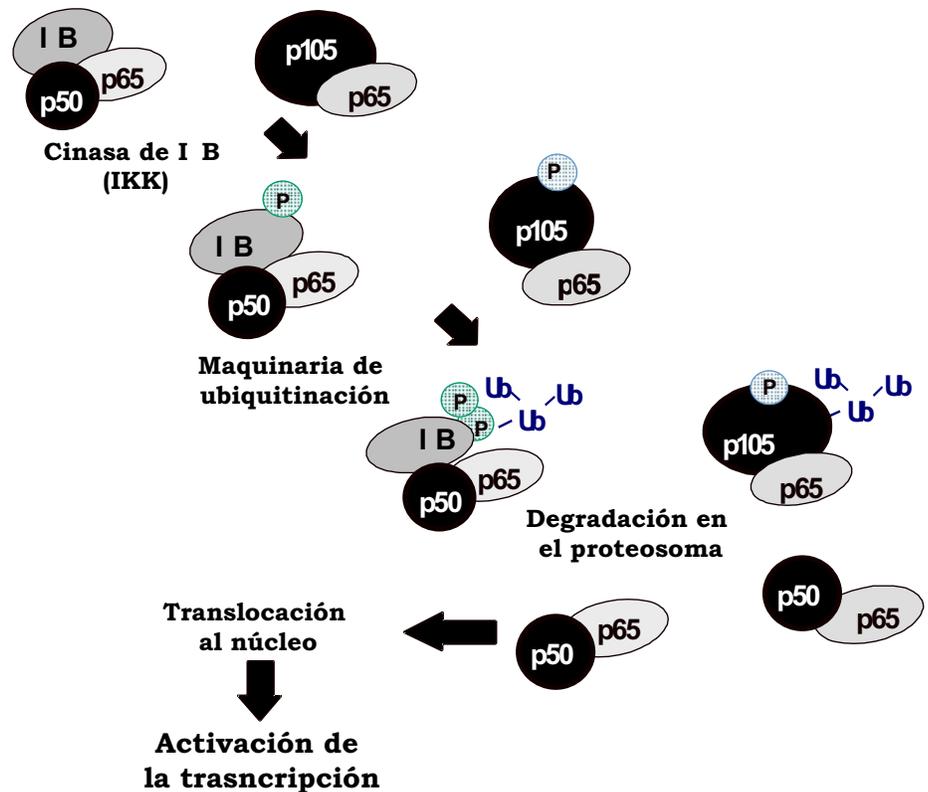


FIGURA 1. Mecanismo clásico de activación de NF- B. La fosforilación y subsecuente degradación de la proteína inhibidora I B, es necesaria para la translocación del factor al núcleo. En esta figura se muestra tanto la activación de NF- B que depende de la degradación total de I B, como la activación dependiente de la degradación parcial del precursor p105.

como péptidos señal o secuencias de localización nuclear (NES+), que determinan su destino nuclear. Esto quiere decir que si bien el factor se sintetiza en el compartimiento citoplásmico, su eventual translocación al núcleo es el resultado de la exposición de los péptidos señal. La interacción con I B oculta una de las dos secuencias que determinan el destino nuclear de NF- B, de manera que para alcanzar su destino nuclear, debe primero dissociarse de I B. La translocación al núcleo ocurre en respuesta a varios estímulos que finalmente convergen en mecanismos moleculares que favorecen la separación de NF- B de su inhibidor I B. Diversas evidencias experimentales sugieren que la activación de NF- B solo requiere de la exposición de la secuencia de destino nuclear.

Los pasos necesarios para la translocación de NF- B al núcleo son:

fosforilación, ubiquitinación y degradación de la proteína inhibidora I B en el proteosoma (Fig. 1). Una vez en el núcleo, el factor se une a la región promotora de los genes blanco y activa la transcripción. Este circuito regulatorio es la razón por la que el estudio de la regulación de NF- B se ha centrado, sobre todo, en los procesos de fosforilación de la proteína inhibidora I B y del control de su degradación.

Existen mecanismos alternativos de liberación de NF- B independientes de los I Bs. Uno de estos mecanismos concierne al origen de las subunidades p50 y p52, que se producen a partir de precursores de alto peso molecular (p105 y p100 respectivamente). A estas formas se les ha descrito como moléculas NF- B Tipo I (Fig. 2) cuyo extremo C contiene repeticiones de anquirina que ocultan las secuencias de localiza-

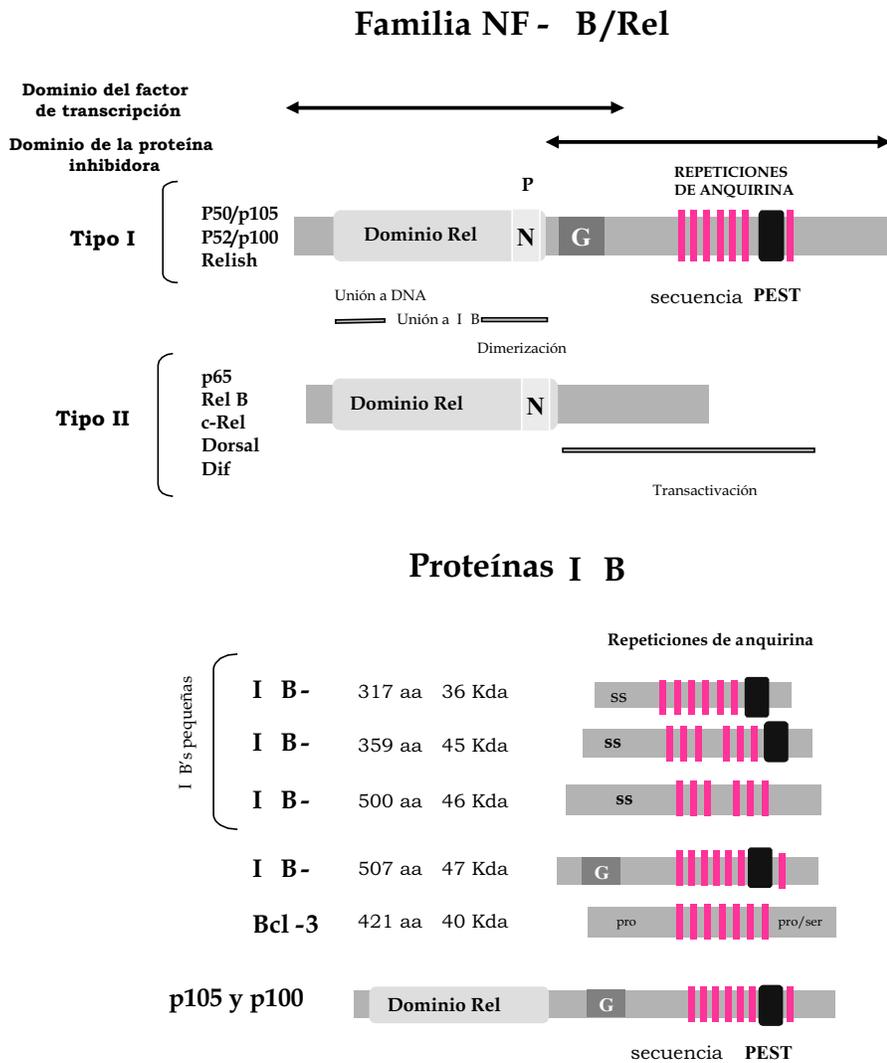


FIGURA 2. Estructuras de los distintos miembros de la familia Rel y de la familia I B. G: sitio rico en glicina P: sitio consenso de fosforilación N: secuencia de localización nuclear (modificada de referencia 5).

ción nuclear del extremo amino de la misma proteína en la que se encuentran. Esta particular regulación se discutirá mas adelante.

La fosforilación de I B es responsabilidad del complejo multiproteico IKK (por las siglas en inglés de IκB kinase). La búsqueda de esta cinasa fue motivo de intenso estudio durante la década de los 90, ya que las evidencias bioquímicas apuntaban a que se trataba de una cinasa de muy alta especificidad por los miembros de la familia I B. El complejo IKK contiene dos subunidades catalíticas (IKK-ε e IKK-β) y una sub-unidad reguladora (IKK-γ también denominada nemo) (4). Ya que la fosforila-

ción de las distintas isoformas de I B constituye el punto medular de su regulación, el estudio de esta cinasa ha cobrado interés particular en los últimos años. En uno de los escenarios mejor estudiados, IKK es activada por la cinasa NIK (NF-κB inducible kinase) quien responde directamente a la acción de citocinas como TNF-α o de IL-1 a través de sus receptores membranales. La interacción del complejo IKK con sus sustratos (los diferentes miembros de la familia I B) y la fosforilación de dos residuos conservados de serina en todas las isoformas de I B, constituye la señal primaria que determina su degradación (5). Las dos cinasas del complejo

IKK actúan de manera independiente y se activan en forma diferencial, dependiendo del estímulo, así por ejemplo, en respuesta a TNF-α o IL-1 se activan las cinasas IKK-ε.

La regulación de la actividad de NF-κB ha resultado ser sumamente compleja, dada la gran cantidad de combinaciones que presenta el sistema: 1) Si bien hay una gran cantidad de heterodímeros p65/p50 también existe un variedad de heterodímeros como p65/cRel e incluso homodímeros p50/p50. 2) Se han descrito diferentes variantes de la secuencia blanco B que unen de manera diferencial a los diferentes tipos de homo y heterodímeros, no siempre activando la transcripción del gen en cuestión. 3) Los diferentes homo y heterodímeros se pueden asociar con las diferentes isoformas de la familia de I B. 4) Diferentes estímulos extracelulares encienden diferentes procesos de activación de los miembros del sistema NF-κB generando diferentes perfiles de homo y heterodímeros activos.

Por lo tanto, cuando nos referimos al factor NF-κB incluimos a una familia de homo y heterodímeros cuyos distintos arreglos, producen efectos transcripcionales diferentes entre sí y que incluso pueden llegar a ser antagónicos.

La estructura de I B

El complejo I B-NF-κB ha sido cristalizado y su estructura molecular ha sido resuelta con detalle (6). El tamaño de las distintas isoformas de I B es de 35 a 70 kDa es decir, su tamaño es menor que el que forma el dímero NF-κB (entre 90 y 120 kDa).

Todas las isoformas de I B descritas hasta el momento son muy semejantes en estructura tridimensional aunque tienen distinto número de dominios repetidos de anquirina que constituyen el sello característico de la molécula, y que forman los sitios de interacción con NF-κB.

Cabe recordar que los precursores de p50 y p52 presentan también estos

dominios repetidos de anquirina, por lo que puede considerarse que en esas moléculas la función de la proteína inhibidora y la del factor de transcripción forma parte integral de una sola cadena peptídica.

La familia I B

Mucha de la investigación bioquímica acerca del mecanismo de acción del sistema NF- B se ha enfocado no solo al funcionamiento del factor en sí, sino en gran medida a caracterizar a las distintas isoformas de I B existentes y a la búsqueda de otras nuevas. La razón de esto resulta evidente en el sentido de que las diferencias que existen en la activación de NF- B están básicamente dirigidas a diferencias en la regulación de la fosforilación y degradación de las proteínas I B que secuestran distintas poblaciones del factor. En esta sección se describen generalidades y particularidades concernientes a cada una de las isoformas de I B identificadas hasta el momento en células de mamíferos.

Se han caracterizado al menos seis isoformas de la proteína inhibidora I B. Las mejor caracterizadas son I B- e I B- que se encuentran en prácticamente todos los tipos celulares y que por tanto son responsables de regular la mayor parte de los efectos de NF- B. La otra isoforma que en los últimos dos años ha cobrado relevancia es I B-, que participa en respuestas bifásicas que están probablemente más restringidas a estímulos específicos. A estas tres isoformas se les denomina I B's pequeñas. El cuarto miembro de esta familia es I B- de la cual se conocen un par de variantes. I B- proviene del mismo gene que genera al precursor p105, que al ser procesado proteolíticamente, genera a la subunidad p50, cuya expresión se restringe a ciertos tipos celulares. Por último se encuentra Bcl-3 que secuestra únicamente a los homodímeros p50, p52 y al heterodímero p50/p52.

I B-

Esta isoforma fue la primera en ser descrita y es también la mejor caracterizada. Fue identificada originalmente junto con I B- a partir de una purificación parcial. Tiene la cinética de degradación más rápida de estas proteínas. En casi todos los tipos celulares donde se ha probado, tanto el TNF- como el PMA y la IL-1 inducen una rápida y completa degradación de I B- desde los 5 min. Sin embargo, la ausencia de I B- es transitoria ya que 1 h después de haber sido degradada aparecen nuevamente niveles detectables de proteína. Los ensayos de análisis de hibridación de ARN mensajeros por "Northern Blot" han demostrado que tras la fase de degradación, existe un incremento significativo en la transcripción y la síntesis *de novo* de la proteína. Además, gracias a que su promotor presenta sitios B y hay una regulación positiva de su transcripción durante las siguientes 24 h que reestablecen los niveles citoplásmicos. La transcripción de I B- está sujeta entonces a un circuito auto regulatorio inductor por ser uno de los primeros genes que se transcriben tras la entrada de NF- B al núcleo.

Este mecanismo es un ejemplo interesante dentro de la biología molecular, de cómo un factor de transcripción puede regular su propia actividad al promover la síntesis de la proteína que lo inhibe. Si bien existen otros ejemplos en la literatura, el caso NF- B/I B ha sido estudiado con particular atención.

La estructura de I B- consiste de un dominio central con seis repeticiones de anquirina esenciales para su interacción con el factor. En los primeros 35 residuos del extremo carboxilo está contenida la región PEST, rica en residuos de aminoácidos cargados negativamente, e indispensable para su degradación en respuesta a diferentes estímulos. En el extremo amino, se encuentran los residuos de serina (ser 32 y ser 36) y de lisina (lis 51 y lis 52) sobre los que

recaen las señales que regulan su actividad y también en esta región se encuentran los dominios de la proteína que enmascaran las señales de localización nuclear de NF- B (7)

I B- regula además la actividad nuclear de NF- B, gracias a la presencia, única dentro de la familia I B de secuencias de exportación nuclear (NES) capaces de unir al receptor nuclear CRM1. La mutación de estas secuencias de localización nuclear que contiene I B o el uso de inhibidores del CRM1 (como leptomicina B) impiden la salida de I B- del compartimiento nuclear una vez que ha conseguido entrar (8). Dentro del núcleo I B- puede unir formas libres de NF- B e incluso disociar al factor del DNA y gracias a la secuencia de exportación nuclear puede remover las formas activas de NF- B del compartimiento nuclear.

La entrada de I B- al núcleo permite también mantener la respuesta de NF- B frente a estímulos persistentes. Es decir, una subpoblación de I B unido al factor de transcripción puede ser translocado al núcleo y degradarse *in situ* de manera paulatina para prolongar la actividad de NF- B (9).

I B-

Esta isoforma fue clonada utilizando como anzuelo oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar por PCR una región conservada de las secuencias de anquirina, de las cuales esta proteína presenta seis repeticiones consecutivas. Es una proteína de 369 aminoácidos con un peso molecular aparente de 45 kDa. Su extremo carboxilo es rico en residuos de prolina, glutámico y serina. Contiene el mismo número de residuos de serina y de treonina que I B-, pero no presenta el sitio de fosforilación para PKC presente en esta isoforma.

La estructura de la molécula del ARN mensajero que codifica para I B- es única ya que presenta regiones cortas no traducidas en ambos

extremos y a diferencia del mensajero de I B- no contiene secuencias AUUUA en el extremo 3' lo que sugiere que se trata de un mensajero que no está sujeto a un recambio rápido debido a una pronta degradación, como es el caso del mensajero de I B- (10)

I B- ha sido asociada con una respuesta bifásica y persistente de NF- B. Se ha encontrado en distintos modelos que su degradación se inicia mucho más tarde que en la isoforma I B- que normalmente ocurre en minutos. La degradación de I B- se inicia hasta casi una hora después del estímulo. Si bien hay variaciones dependiendo del tipo celular, bajo la misma serie de estímulos, la primera de las tres isoformas que se degrada es I B- que desaparece por completo en 15 minutos, seguida de I B- cuya degradación se inicia entre 30 y 40 minutos después del estímulo. La síntesis *de novo* de I B- es más lenta que la de I B- de manera que los niveles de esta isoforma en el citoplasma se normalizan más lentamente.

Al igual que I B-, I B- puede viajar al núcleo celular y capturar NF- B activo, como parte de un eficiente mecanismo de inhibición de la transcripción. Sin embargo, a diferencia de la isoforma I B-, I B- no es capaz de romper las uniones funcionales entre NF- B y la maquinaria de transcripción (11).

I B- se fosforila también en residuos de serina (serinas 32 y 36) y se ubiquitina en lisinas 21 y 22. Diversos experimentos han demostrado que en su extremo amino existen dos serinas cuya fosforilación también es importante para la función de este inhibidor (serinas 19 y 23) ya que la sustitución de estas por alaninas previene su proteólisis. En algunos modelos, I B- se encuentra constitutivamente fosforilado en una de estas dos serinas. La degradación inicial de I B- en células B y en respuesta a LPS, es seguida de la síntesis *de novo* de esta proteína en

una forma hipofosforilada. Esta se asocia con NF- B libre previniendo su interacción con I B-. A diferencia del I B- basalmente fosforilado, el I B- no fosforilado no es capaz de enmascarar las secuencias de localización nuclear de NF- B y por lo tanto de inhibir su translocación al núcleo. El NF- B unido a I B- hipofosforilado, retiene cierta capacidad de ingresar al núcleo y de activar la transcripción de manera que al competir con I B-, la forma hipofosforilada de I B- permite que exista una población de NF- B transcripcionalmente activo de manera persistente (12)

El espectro de proteínas Rel con que puede interactuar I B- es prácticamente el mismo que I B-, aunque en algunos casos se ha observado que la fuerza de retención de I B- puede ser menor es decir, que aunque unen los mismos dímeros de NF- B, la afinidad por estos de I B- es en general mayor que la de I B-

En la mayoría de los modelos, la degradación de I B- está asociada con una actividad prolongada de NF- B, en donde la respuesta inicial es consecuencia de la rápida degradación de I B- o de I B- y la respuesta persistente se debe a la desaparición más lenta de I B- (13)

I B-

Esta es la última isoforma que se ha descrito (8). Su estructura es muy similar a las otras isoformas referidas, con múltiples repeticiones de anquirina.

El mensajero de I B- posee diferente patrón basal de expresión a los de I B- y I B-. Aunque también puede capturar distintos dímeros de NF- B, se le ha implicado en la regulación de complejos de NF- B que contienen c-Rel (14)

La degradación de I B- tiene una cinética parecida a la de I B-, es decir ocurre a tiempos más largos que I B-, sin embargo la síntesis *de novo* es mucho más rápida de manera que los

niveles basales de la proteína pueden restablecerse hasta 3 horas después del estímulo. Esta recuperación coincide con la cinética de acumulación del mensajero que muestran los análisis de hibridación de ARN mensajeros tipo "Northern". Por esta razón se ha sugerido que I B- puede regular un tipo de respuesta de NF- B, lento y transitorio (14). Como las otras I B's pequeñas I B- se degrada también en respuesta a la IL-1 y al LPS.

Se ha observado en células endoteliales que la cinética de degradación de I B- coincide con la expresión de un subgrupo de genes regulados por c-Rel, como la molécula de adhesión celular de la vasculatura (V-CAM), lo cual correlaciona con el hecho de que I B- tiene cierta preferencia por el dímero p65/c-Rel (15)

I B-

Esta isoforma de 607 aminoácidos se produce a partir de un empalme alternativo del precursor p105 (Fig. 2). Es decir a partir del mismo transcrito primario, codificado en el mismo gene (el mismo que codifica para p105 y p50) pueden traducirse distintas proteínas mediante un procesamiento particular del mRNA. Los primeros estudios bioquímicos demostraron que la región del extremo carboxilo de p105 es idéntica a la proteína I B- de 70-kDa. Se han identificado también otras dos isoformas de menor peso molecular que provienen del mismo gene, con pesos moleculares de 63 kDa y 55 kDa denominadas respectivamente I B-1 e I B-2. A I B-1 se le puede encontrar en el citoplasma y núcleo mientras que a I B-2 se le localiza preferentemente en el compartimiento nuclear, ambas formas tienen distintas actividades inhibitoras y tienen distintas afinidades relativas por p50.

I B- se expresa en un número muy discreto de tipos celulares y tiene una marcada preferencia por homodímeros de p50 y c-Rel. Por esta razón

existe poca literatura con respecto a su regulación.

Debido a que tanto p50 como I B- provienen del mismo gene que codifica también p105 (ver mas adelante), la translocación del dímero p50/p50 al núcleo puede provenir de mas de una fuente. Se ha propuesto que en modelos donde se observa translocación preferencial de homodímeros de p50, estos provienen de la degradación específica de I B- (16). En algunos modelos como en lesiones isquémicas se observa una translocación continua de p50/p50 activada por I B- y asociada a una disminución en los niveles de p105 (17)

Bcl-3

Fue caracterizada inicialmente como un oncogene a partir de un linfoma crónico de células B. Aunque estructuralmente es muy parecido al resto de los miembros de la familia I B- (tiene siete dominios de anquirina) su función parece ser completamente distinta (18).

De todas las isoformas conocidas de I B-, Bcl-3, es la única que no es degradada por acción de las vías clásicas de activación de NF- B. De hecho su localización es preferentemente nuclear y parece estimular el potencial transcripcional de NF- B. Bcl-3 generalmente captura dímeros p52/p50 y se cree que puede tener distintos efectos sobre la unión de estos al ADN dependiendo de su propio estado de fosforilación, de su concentración nuclear y de su interacción con otros factores nucleares (19). Lo que es claro, es que puede translocarse al núcleo ya sea libre o unida a NF- B y regular la actividad transcripcional del factor. Por ejemplo, puede disociar a p50 y p52 de la cromatina, o puede competir por p50 en la formación de un heterodímero con p52. Alternativamente, Bcl-3 puede formar complejos terciarios con los homodímeros de p50 o p52 unidos a ADN y actuar como un activador transcripcional (20). Esta interacción puede ser estimulada por la acetilasa de histonas *Tip60*.

La sobreexpresión de Bcl-3 aumenta las cantidades del dímero p50 en el núcleo de células de timo y células B. El mecanismo involucrado parece ser la captura de p50 de los complejos p105/p50 sin que se incremente el procesamiento de p105 (20).

La formación del complejo Bcl-3/p50 es inducida por una variedad de agentes activadores de NF- B y depende de la actividad enzimática del proteosoma pero es independiente de la translocación al núcleo de p50/p65, lo cual sugiere, que los homodímeros de p50 provienen de la degradación de p105 (19).

Regulación diferencial de I B- e I B-

Prácticamente todos los inductores conocidos de NF- B, producen degradación de I B-, sin embargo, solo una fracción de ellos induce degradación de I B-. Entre los estímulos que degradan I B- destacan LPS, IL-1 y la proteína tax de HIV-1. Aunque la caracterización inicial sugería que I B- resulta insensible al estímulo por PMA o TNF-, ahora se sabe que esto depende del tipo celular en cuestión y que la degradación en respuesta a TNF por ejemplo, ocurre con una cinética distinta a la de I B- (18).

Cuando NF- B se transloca al núcleo, uno de las primeras proteínas en producirse es I B-, que una vez en el citoplasma, secuestra el factor remanente inactivando la recién encendida señal. Cuando la señal de activación conlleva a la degradación de I B-, este se fosforila mas lentamente y puede secuestrar al NF- B remanente previniendo su interacción con I B-

En la mayoría de los modelos estudiados, la presencia persistente de NF- B se asocia a la lenta cinética de fosforilación y consecuente degradación de I B-. Esta diferencia con respecto a la acelerada degradación de I B- permite una aparente respuesta bifásica en la presencia de

NF- B en el núcleo.

In vivo, I B- parece ser un inhibidor más potente de la actividad de NF- B que I B-, esta habilidad correlaciona directamente con la afinidad de I B- para unir al factor de transcripción (21). Adicionalmente se han documentado para esta isoforma, otras vías de degradación independientes del proteosoma (22)

Los precursores de p52 y p50 son respectivamente p100 y p105

La proteólisis de las proteínas p100 y p105 da lugar a las proteínas p52 y p50 respectivamente. Sin embargo, poco se sabe acerca de la vía de señalización que genera estas formas de NF- B (Figs. 1 y 2). A partir del mismo gene puede producirse un precursor de mayor peso molecular que en el extremo amino, contiene la secuencia que corresponde al factor de transcripción y en el extremo carboxilo, las secuencias repetidas de anquirina que en la estructura tridimensional de la proteína, se asocian a la región amino terminal, inhibiendo la translocación nuclear y la actividad del factor (Fig. 2).

Aunque p50 y p52 pueden originarse a partir de la proteólisis parcial de p100 y p105, existe una poza constitutiva de estos homodímeros, que no proviene de la degradación de sus precursores. Esta poza (que después se asocia con p65 por ejemplo) se genera por proteólisis parcial de la proteína naciente en forma paralela a su traducción. Este procesamiento ocurre en el proteosoma y constituye un ejemplo de degradación parcial por este complejo de degradación (23). Por otro lado el precursor p105 también da lugar a la isoforma I B-. En la secuencia primaria de esta proteína, los residuos 376-404, son necesarios para el procesamiento y sirven como señal de término para la maquinaria del proteosoma y los residuos de lisinas localizadas en las posiciones 441 y 442 sirven como señal de ubiquitinación.

La vía de degradación de p105

para la obtención de p50, puede ser inducida por estímulos específicos. Estudios recientes sugieren que los estímulos clásicos de activación de NF- κ B como TNF- α , IL-1 y PMA inducen la degradación de p105 a través de IKK- α y IKK- β . En estos casos, una región de 23 aminoácidos cercana al extremo carboxilo y rica en residuos de glicina funciona como señal de procesamiento para generar p50. Esta misma secuencia es importante, ya que puede dirigir una proteólisis específica cuando se inserta a otras proteínas mediante técnicas de biología molecular (24).

La porción carboxilo terminal de p105 está involucrada en la regulación ya que en ella se localizan los sitios de fosforilación por la cinasa IKK. Por otro lado, el papel de p105 como inhibidor de NF- κ B, depende de fosforilación que se da en respuesta a un estímulo externo.

Es importante señalar que la degradación de p105 requiere de la activación del complejo de cinasas IKK, y del complejo SCF^{-TrCP} de ubiquitina-ligasa. Esta degradación inducida contrasta con la proteólisis constitutiva de p105 que genera la poza de la isoforma p50 (5). Esto quiere decir, que en el proteosoma pueden ocurrir distintos tipos de procesamiento del mismo precursor. Uno de ellos está dirigido por la señal de fosforilación de p105 y de los estímulos encargados de generar p50 activo que se transloca al núcleo, y el otro, para generar una población de p50 destinada a asociarse con p65 u otros heterodímeros que a su vez se unirán a inhibidores I κ B. Este último tipo de procesamiento ocurre contradiccionalmente, es decir en forma simultánea a la síntesis del precursor, sin que los mecanismos que controlan este procesamiento se hayan comprendido hasta el momento.

El gene que codifica para p100 (NF κ B1) fue uno de los primeros de esta familia en ser caracterizados. Fue originalmente descrito por su potencial de transformación celular, ya que su fusión con el gene C de inmuno-

globulinas (que puede ocurrir espontáneamente debido a su cercanía física) se asocia a algunas leucemias de células B. Por esta razón p100 (NF κ B1) fue bautizado inicialmente como el oncogen L γ t-10.

p100 es la única molécula inhibidora capaz de asociarse con la subunidad Rel-B. La regulación de Rel-B es distinta a la de las otras subunidades transactivadoras (p65, p50 y c-Rel) Su actividad no es regulada aparentemente por ninguna de las I κ Bs pequeñas. Solamente I

tiene una pobre capacidad de unión a esta proteína. Rel-B ha sido descrito como el miembro de la familia de NF-

B que contribuye a la poza constitutiva de este factor. Aunque fue originalmente descrito como un inhibidor de la actividad de NF- κ B, ya que no puede formar homodímeros y no une directamente ADN, Rel-B puede asociarse tanto con p50 como con p52 y adquirir así, una fuerte capacidad transcripcional. Sin embargo, la expresión de RelB está restringida a tejidos linfoides, como el timo, ciertas áreas del bazo y los nódulos linfáticos (25).

RelB se une a p100 en el citoplasma, para este proceso los residuos de aminoácidos del 623 al 900 de la secuencia primaria del factor son indispensables. Al igual que con p105, La porción carboxilo terminal de p100 contiene las señales de localización nuclear (18) (Fig. 2).

En el procesamiento de p100 también participa la vía NIK/IKK- de manera determinante. De hecho la cinasa NIK es responsable de la fosforilación directa de p100 y de la localización nuclear de Rel-B (24). Esta fosforilación de p100 que más tarde sirve como una señal para su ubiquitinación y subsecuente degradación en el proteosoma ocurre en los residuos de serina 867 y 870.

Por otro lado la proteólisis dirigida de p100 da origen a la subunidad p52 por un mecanismo muy similar al que da origen a p50, es decir ocurre en forma paralela a la traducción y que requiere regiones

ricas en residuos de glicina localizadas en el extremo amino (24).

Interacción de I κ B con el complejo IKK

Como se ha mencionado, IKK es el complejo multiproteico encargado de la fosforilación de las distintas I κ B's. Estudios *in vitro* han demostrado que las tres isoformas más comunes de I κ B (α y β) además de ser sustratos de la cinasa de I κ B (IKK) pueden interactuar con el complejo, y que prácticamente, todos los miembros de la familia Rel (p65, RelB, cRel, p100 y p105) también tienen esta capacidad. Todas estas proteínas son capaces de formar complejos estables que pueden ser co-purificadas con IKK. De hecho, si se utilizan como sondas péptidos que corresponden tanto al extremo carboxilo como al amino de I κ B- α , - β y γ se han observado interacciones de alta afinidad con el complejo multiprotéico IKK. Más aún, una vez unidos, estos péptidos son fosforilados *in vitro* en forma secuencial corroborando su papel como sustratos del complejo (26). El péptido correspondiente al extremo carboxilo de I κ B- α es capaz por sí solo, de activar esta actividad de cinasa *in vitro*, lo cual es congruente con los datos que sugieren que el extremo carboxilo juega un papel en la regulación de su degradación.

CONCLUSIÓN

Las distintas isoformas de I κ B, contribuyen a la compleja regulación de NF- κ B

Como se ha visto, la regulación de NF- κ B es un fenómeno complejo y multifactorial. Hay que resaltar que en una misma célula existen diferentes poblaciones del factor NF- κ B, que son sensibles a distintos estímulos y que están sujetos a complicados mecanismos de regulación. Por un lado, la posibilidad de formar distintos homo y heterodímeros, permite la translocación de variadas actividades

de NF- B al núcleo. Esta diversidad de formas de NF- B tiene consecuencias importantes considerando que cada homo- o heterodímero puede tener una actividad transcripcional antagónica y además muestran distintas afinidades por sus secuencias blanco en los promotores de diferentes genes. Por otro lado, una población de heterodímeros equivalentes puede estar secuestrada por distintas proteínas I B. Por ejemplo, el dímero formado por las subunidades p50/p65 puede estar retenido en el citoplasma tanto por I B- , como por I B- o por I B- , estableciéndose con ello tres subpoblaciones del mismo factor que pueden acceder al núcleo bajo distintos estímulos, o que pueden ser liberados secuencialmente de su inhibidor permitiendo una actividad sostenida del heterodímero de NF B p50/p65 (27). Es esta variedad de posibilidades la que permite la versatilidad que se ha encontrado en este factor y la multiplicidad de fenómenos en los que participa. A esto contribuyen además las distintas poblaciones de I B que pueden interactuar con NF- B.

Si bien las distintas isoformas no están presentes en todos los tipos celulares y muchos de estos mecanismos están restringidos a ciertas

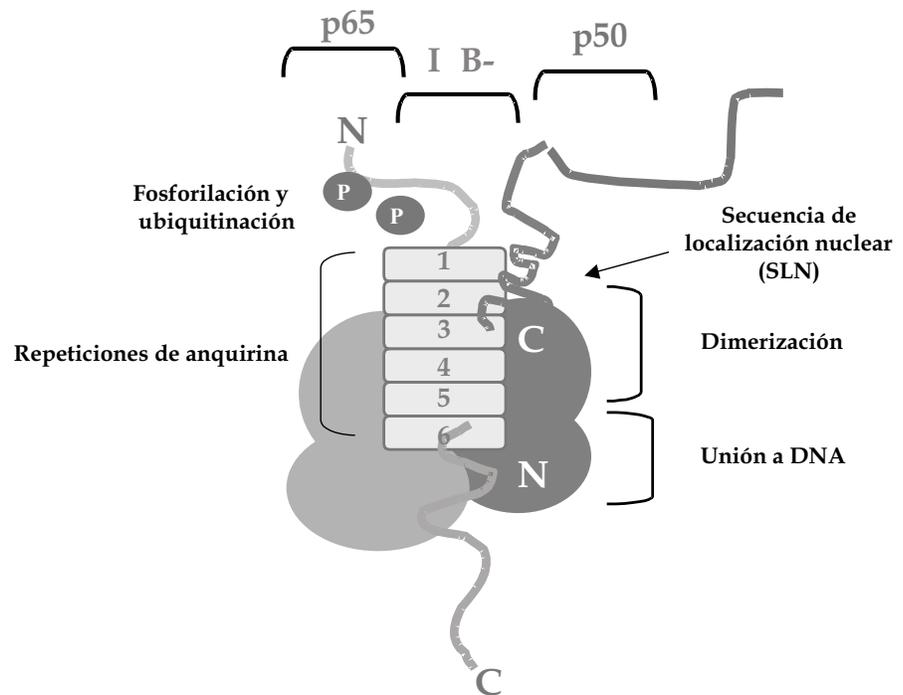


FIGURA 3. Representación de la estructura tridimensional de I B- unido al dímero p50/p65. Las repeticiones de anquirina interactúan directamente con la secuencia de localización nuclear (SLN) del factor de transcripción. N y C: extremos amino y carboxilo respectivamente (modificada de referencia 28).

condiciones, las vías que aquí se describen, constituyen interesantes ejemplos de los mecanismos bioquímicos que regulan la transducción de señales.

Así, en este momento queda claro que una parte importante de la regulación de NF- B recae en la manera en que participan los miem-

bros de la familia de proteínas inhibitoras I B. Por esta razón el estudio de las señales que controlan la fosforilación y degradación de estas proteínas, determinando en forma indirecta la activación de los miembros de la familia NF- B ha cobrado importancia.

REFERENCIAS

- Li Q y Verma I M (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-34.
- Muller C W, Rey F A, Sodeoka M, Verdine G L y Harrison S C (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373:311-7.
- Lopez-Bojorquez L N (2004). La regulacion del factor de transcripcion NF-kappaB: un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de Investigacion Clinica* 56:83-92.
- Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside S T, Weil R, Agou F et al. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93:1231-40.
- Karin M y Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annual Review of Immunology* 18:621-63.
- Baeuerle P A (1998) IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95:729-31.
- Luque I y Gelinas C (1998) Distinct domains of IkappaBalpha regulate c-Rel in the cytoplasm and in the nucleus. *Mol Cell Biol* 18:1213-24.
- Tam W F, Lee L H, Davis L y Sen R (2000) Cyto-

- plasmic sequestration of rel proteins by Ikappa-Balpa requires CRM1- dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 20:2269-84.
9. Renard P, Percherancier Y, Kroll M, Thomas D, Virelizier J L, Arenzana-Seisdedos F, et al (2002) Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear Ikappa-Balpa. *J Biol Chem* 275:15193-9.
 10. Haskill S, Beg A A, Tompkins S M, Morris J S, Yurochko A D, Sampson-Johannes A, et al (1991) Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes Ikappa B-like activity. *Cell* 65:1281-9.
 11. Ferlito M, Romanenko O G, Ashton S, Squadrito F, Halushka P V y Cook J A (2001) Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *J Leukoc Biol* 70:821-9.
 12. Suyang H, Phillips R, Douglas I y Ghosh S (1996) Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 16:5444-9.
 13. Bourke E, Kennedy E J y Moynagh P N (2000) Loss of Ikappa B-beta is associated with prolonged NF-kappa B activity in human glial cells. *J Biol Chem* 275:39996-40002.
 14. Whiteside S T, Epinat J C, Rice N R e Israel A (1997) Ikappa B epsilon, a novel member of the Ikappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16:1413-26.
 15. Spiecker M, Darius H y Liao J K (2000) A functional role of Ikappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J Immunol* 164:3316-22.
 16. Bell S, Matthews J R, Jaffray E y Hay R T (1996) IkappaB-gamma inhibits DNA binding of NF-kappaB p50 homodimers by interacting with residues that contact DNA. *Mol Cell Biol* 16:6477-85.
 17. Yeh K Y, Yeh M, Glass J y Granger D N (2000). Rapid activation of NF-kappaB and AP-1 and target gene expression in postischemic rat intestine. *Gastroenterology* 118:525-34.
 18. Ghosh S, May M J y Kopp E B (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-60.
 19. Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn F G y Scheidereit C (1999) NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *Embo J* 18:4766-78.
 20. Watanabe N, Iwamura T, Shinoda T y Fujita T (1997) Regulation of NFKB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50- p105 and nuclear translocation *Embo J* 16:3609-20.
 21. Rodriguez M S, Thompson J, Hay R T y Dargemont C (1999). Nuclear retention of IkappaBalpa protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274:9108-15.
 22. Schaecher K, Goust J M y Banik N L (2004). The effects of calpain inhibition on IkappaB-alpha cleavage sites. *Neurochem Res* 29:1443-1451.
 23. Orian A, Schwartz A L, Israel A, Whiteside S, Kahana C y Ciechanover A (1999) Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF- kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol* 19:3664-73.
 24. Lin L y Ghosh S (1996) A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit *Mol Cell Biol* 16:2248-54.
 25. Solan N J, Miyoshi H, Carmona E M, Bren G D y Paya C V (2002) RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 277:1405-18.
 26. Heilker R, Freuler F, Pulfer R, Di Padova F y Eder J (1999) All three IkappaB isoforms and most Rel family members are stably associated with the IkappaB kinase 1/2 complex. *Eur J Biochem* 259:253-61.
 27. Ghosh S y Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
 28. Huxford T, Huang D B, Malek S y Ghosh G (1998) The crystal structure of the IkappaBalpa/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 95:759-70.

MONO-ADP-RIBOSILACIÓN: IMPLICACIÓN EN LA FISIOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS*

ANGEL HILARIO ALVAREZ HERRERA

RESUMEN

La mono-ADP-ribosilación es la transferencia enzimática de una molécula de ADP-ribosa a partir del NAD^+ a una proteína aceptora. Esta reacción es catalizada por ADP-ribosiltransferasas presentes en múltiples organismos, desde los virus hasta los vertebrados. Hay dos subclases de estas enzimas: las exoenzimas, como son algunas toxinas bacterianas que inhiben irreversiblemente la función de proteínas blanco celulares en la patogénesis bacteriana y las enzimas intracelulares que regulan importantes actividades de proteínas involucradas en la señalización celular y el metabolismo. En este último caso, la regulación se efectúa con la ayuda de ADP-ribosilhidrolasas intracelulares que revierten la reacción de ADP-ribosilación hidrolizando el enlace ADP-ribosa-proteína. En este trabajo se revisan algunos de los hallazgos más importantes en el campo de la bioquímica de estas enzimas y se describen las funciones biológicas de tan extendida modificación química.

PALABRAS CLAVE: ADP-ribosilación, ADP-ribosiltransferasa, modificación postraducciona, proteína blanco, NAD^+ .

ABSTRACT

Mono-ADP-ribosylation is the enzymatic transfer of ADP-ribose from NAD^+ to acceptor proteins. It is catalyzed by ADP-ribosyltransferases found in diverse organisms, from virus to vertebrates. There are two subclasses of these enzymes: the exoenzymes, such as some bacterial toxins that inhibit irreversibly the function of cellular protein targets in bacterial pathogenesis, and the intracellular enzymes that regulate important activities of proteins involved in cell signaling and metabolism. In this latter case, the enzyme regulation is carried out with assistance of intracellular ADP-ribosylhydrolases that reverse the ADP-ribosylation reaction by hydrolyzing the proteinADP-ribose linkage. In this work are reviewed some important findings on the field of the biochemistry of these enzymes, and the biological functions of this widespread chemical modification are described.

KEY WORDS: ADP-ribosylation, ADP-ribosyltransferase, post-translational modification, target protein, NAD^+ .

INTRODUCCIÓN

Con el establecimiento en 1936 de la estructura de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y con el descubrimiento 30 años más tarde del mecanismo de la actividad de la toxina de la difteria, en 1968 se marcó el comienzo de la descripción de una nueva familia de enzimas que regulan la función de muchas proteínas mediante la mono-ADP-ribosilación. Esta actividad enzimática se ha descrito en muchas formas de vida y en casi todos los compartimentos celulares (1). La ADP-ribosilación es

considerada como una de las modificaciones postraduccionales más generales con la que los seres vivos modifican la estructura y las funciones de las proteínas.

Las mono-ADP-ribosiltransferasas (mADPRTs) modifican la función de muchas proteínas, de manera similar a la fosforilación, transfiriendo un monómero de ADP-ribosa a partir de la molécula de NAD^+ , a un aminoácido crucial en la función de la proteína blanco, liberando la nicotinamida (Fig. 1). El aminoácido aceptor de la ADP-

ribosa en las proteínas puede ser arginina y cisteína principalmente y además, asparagina e histidina en algunos casos (Fig. 2). En general, la mono-ADP-ribosilación conlleva a la inhibición de la función de la proteína blanco, aunque también puede modificarla a un estado permanentemente activo. Existen dos subclases de las mADPRTs: 1) las exoenzimas, muchas de ellas importantes toxinas bacterianas, que modifican de forma irreversible a sus proteínas blanco y 2) las enzimas intracelulares, que actúan regulando

* Recibido: 11 de mayo de 2004 Aceptado: 05 de octubre de 2004

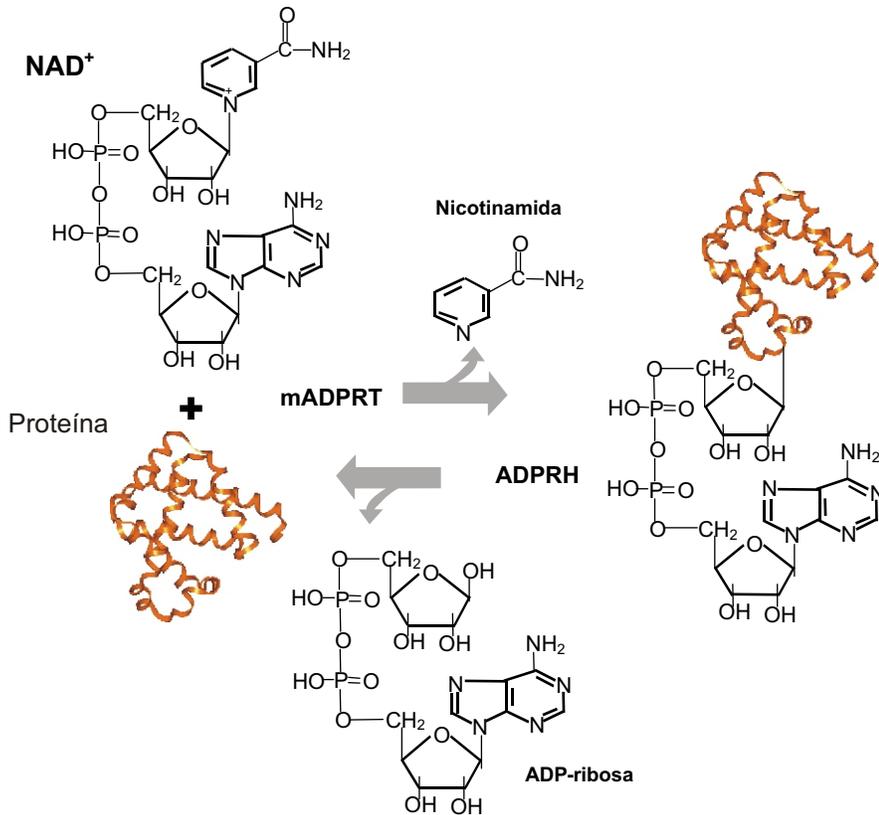


FIGURA 1. Reacción de mono-ADP-ribosilación. Las mono-ADP-ribosiltransferasas (mADPRTs) usan β NAD⁺ para transferir una molécula de ADP-ribose a una proteína blanco, liberando nicotinamida. En algunos casos, esta reacción puede ser reversible por la actividad de ADP-ribosilhidrolasas (ADPRH), liberando la ADP-ribose de la proteína.

de forma reversible algunos procesos celulares endógenos tales como la actividad de algunas enzimas metabólicas y la transducción de señales (1,2).

1. mADPRTs BACTERIANAS

Las reacciones de mono-ADP-ribosilación mejor caracterizadas son las que son catalizadas por algunas toxinas de bacterias patógenas, debido a que muchas son los principales factores de virulencia producidos por las bacterias (Tabla I). La gran mayoría de estas toxinas pertenecen a la clase de toxinas tipo A-B, donde el componente A posee la actividad catalítica de mADPRT y B es el componente de unión al receptor de la célula blanco, necesario para la translocación del fragmento A por la membrana de la célula. Ambos dominios A y B pueden estar en el mismo péptido, como en las toxinas DTx y ExoA de *Corynebacterium*

diphtheriae y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, o bien, en diferentes subunidades como en las toxinas LTx, CTx y PTx, de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis*, respectivamente. Un segundo grupo de mADPRTs toxigénicas carecen del dominio B y son inyectadas por la bacteria directamente al citoplasma de la célula blanco, como las toxinas ExoS y ExoT de *P. aeruginosa*, o bien, en el caso de las exoenzimas C3 y EDIN de *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* respectivamente, todavía se desconoce el mecanismo por el cual entran a la célula blanco y si son o no verdaderos factores de virulencia (3). Otra clase de mADPRTs no toxigénicas se localizan en el interior de algunas bacterias y regulan importantes actividades metabólicas relacionadas con la asimilación de nutrientes (4).

a) Toxinas bacterianas

Muchas de las mADPRTs de bacterias se han asociado a procesos de patogénesis (5), donde la mayoría se trata de enzimas secretadas que tienen actividad toxigénica sobre las células de sus hospederos (Tabla I). Además, con base en su mecanismo de acción, algunas de ellas se han utilizado como una herramienta molecular para estudiar y caracterizar distintos fenómenos intracelulares (6) como por ejemplo, las mADPRTs bacterianas del género *Clostridium*, cuyas mADPRTs están involucradas en la desorganización de la red de microfilamentos del citoesqueleto. La toxina C2 que es secretada por *C. botulinum*, se une a la membrana de la célula blanco y se transloca directamente a su citoplasma, donde ADP-ribosila a la actina monomérica (actina G). Por otra parte, *C. perfringens*, *C. spiroforme* y *C. difficile* producen las toxinas iota, "iotalike" y CDTa, respectivamente, que al igual que la toxina C2 bloquean irreversiblemente la polimerización de los filamentos de actina, impidiendo el ensamblaje de los monómeros de actina G ahora ADP-ribosilados, causando que la célula pierda su morfología lo que la lleva posteriormente a su lisis. *C. botulinum* produce además otra enzima con actividad de mADPRT, la exoenzima C3, la cual al menos *in vitro*, ADP-ribosila específicamente a la GTPasa Rho de muchos tipos celulares; la proteína Rho participa en la regulación del citoesqueleto de actina, por lo que la enzima C3 también causa la destrucción de los filamentos de actina. Otras mADPRTs capaces de ADP-ribosilar, al menos *in vitro*, a la proteína Rho son las proteínas denominadas EDIN (A, B y C) aisladas de *S. aureus*, desconociéndose si son verdaderos factores de virulencia. Sin embargo, las exoenzimas C3 y EDIN se han utilizado como una herramienta farmacológica para estudiar fenómenos intracelulares de transducción de señales que involucran a las GTPasas Rho (3,6).

Otras mADPRTs bien caracteri-

TABLA I

mADPRTs DE BACTERIAS Y SUS SUSTRATOS

BACTERIA	mADPRT	AMINOÁCIDO MODIFICADO	PROTEÍNA BLANCO
<i>Escherichia coli</i> ETEC	Toxina LTx	Arginina	G _{αs} (G alfa estimulatoria)
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina CTx	Arginina	G _{αs}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Toxina ExoS	Arginina	Ras
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Toxina ExoT	Arginina	CrkI y CrkII
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina C2	Arginina	Actina
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxina iota	Arginina	Actina
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina DTx	Diftamida	EF-2 (Factor de elongación 2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Toxina ExoA	Diftamida	EF-2
<i>Bordetella pertussis</i>	Toxina PTx	Cisteína	G _{αi} (G alfa inhibitoria)
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina C3	Asparagina	Rho
<i>Staphylococcus aureus</i>	Toxina EDIN	Asparagina	Rho
<i>Salmonella typhimurium</i>	Toxina SpvB	NR ^a	Actina
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Enzima DRAT	Arginina	Nif (Dinitrogenasa reductasa)
<i>Rhizobium meliloti</i>	NR ^a	Arginina	GSIII (Glutamino sintetasa III)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	NR ^a	Cisteína	MalE (proteína de unión a maltosa)

^a NR: no reportado.

zadas son la toxina del cólera (CTx) de *V. cholerae*, y la toxina termolábil (LTx) de *E. coli* ETEC, las cuales poseen una similitud superior al 80% en su secuencia primaria de aminoácidos. Estas toxinas, junto con la toxina pertussis (PTx) de *B. pertussis*, pertenecen a una familia de mADPRTs que ADP-ribosilan la subunidad alfa de las proteínas G (G_α) ubicadas en el lado interno de la membrana plasmática de la célula blanco y que participan en procesos de transducción de señales. La PTx es uno de los distintos factores de patogenicidad secretados por *B. pertussis* que al ADP-ribosilar la subunidad alfa de la proteína G inhibitoria (G_{αi}) induce una actividad constitutiva de la adenilato ciclasa causando la elevación permanente de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) intracelulares y la inhibición de la movilización intracelular de iones Ca²⁺ (3, 5).

En el caso de las toxinas CTx y LTx, mucho se ha avanzado en el estudio de los mecanismos moleculares de su acción debido a la letalidad de ambas toxinas. Mientras que la

CTx es codificada por un bacteriófago localizado en el genoma de la bacteria, la LTx es codificada por un plásmido bacteriano. La CTx es secretada directamente por la bacteria al medio, no así la LTx, la cual permanece en el periplasma hasta que se libera dentro de vesículas que la bacteria desprende de su membrana externa; esto es un reflejo de la diferente letalidad entre las dos toxinas. Mientras que la infección de un individuo con *V. cholerae* puede ser mortal, la infección con *E. coli* ETEC suele ser menos agresiva y se relaciona tan sólo con una diarrea moderada. Se ha descubierto que ambas toxinas se unen al gangliósido GM₁ de la célula blanco a la que se introducen por medio de transporte vesicular retrógrado. Ya en el interior celular, las toxinas ADP-ribosilan la subunidad alfa de la proteína G estimuladora (G_{αs}) acoplada a la adenilato ciclasa, causando así la activación persistente de la enzima y una sobreproducción de AMPC lo cual tiene como consecuencia una hipersecreción de electrolitos tales como el cloruro y el bicarbonato, así

como la inhibición de la absorción de sodio, lo que conlleva a una pérdida celular excesiva de agua, causando la deshidratación masiva del individuo infectado (3, 6).

Por otro lado, otro grupo de mADPRTs con una alta actividad toxigénica son la toxina de la difteria (DTx) producida por *C. diphtheriae* y la exoenzima A (ExoA) de *P. aeruginosa* (3). La toxina DTx está codificada por el gen *tox* del corynebacteriófago beta integrado al genoma de la bacteria y ExoA es codificada por el gen *toxA* de *P. aeruginosa*. Las dos toxinas son sintetizadas y secretadas por las bacterias bajo deprivación de hierro durante el proceso infeccioso. Aunque no poseen ninguna similitud considerable en su secuencia primaria y se unen a diferentes receptores en la célula blanco, las dos toxinas se introducen a la célula por transporte vesicular retrógrado y poseen el mismo mecanismo de acción, catalizan la transferencia de ADP-ribosa al factor de elongación 2 (EF-2) de células eucariotes y al inactivarlo impiden la síntesis de proteínas causando la muerte celular. El aminoácido ADP-ribosilado en el EF-2 por estas toxinas es la diftamida: 2-[3-carboxiamido-3-(trimetilamonio) propil] histidina, un aminoácido de esta proteína semejante a la histidina (Fig. 2).

Otras mADPRTs que son importantes factores de patogenicidad son las exoenzimas S y T (ExoS y ExoT) de *P. aeruginosa*. Las toxinas son inyectadas por la bacteria directamente al citoplasma de la célula blanco por un sistema de secreción tipo III. La ExoS ADP-ribosila algunas GTPasas de bajo peso molecular tales como las proteínas Ras, Rab5, Ral4 y Rap (3). Por otro lado, ExoT ADP-ribosila a las proteínas intracelulares CrkI y CrkII, que son importantes activadores de la fagocitosis, causando una reorganización del citoesqueleto de actina en la célula blanco. ExoT podría ser un factor que contribuye a evitar que la

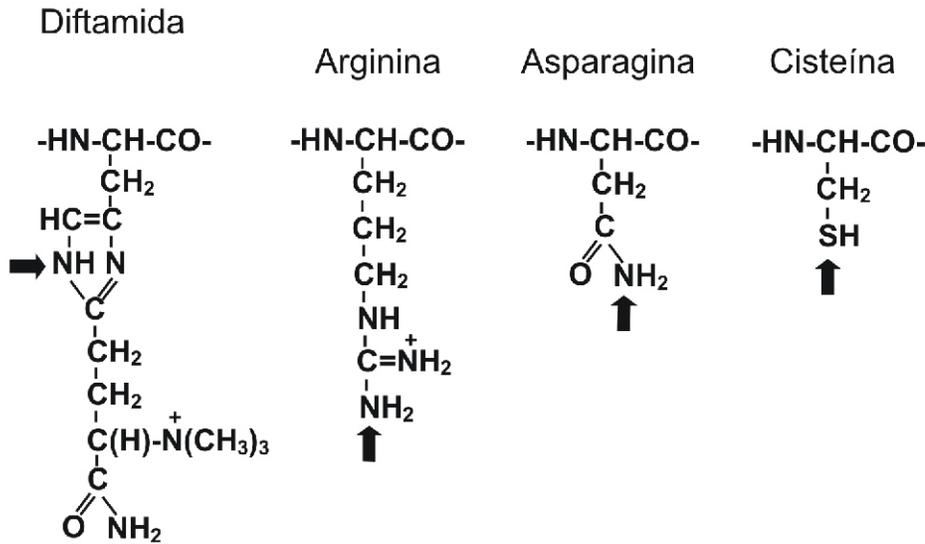


FIGURA 2. Aminoácidos que son ADP-ribosilados en reacciones de mono-ADP-ribosilación. El aminoácido varía según el sustrato modificado por la mADPRT. La flecha indica el sitio de enlace con la ADP-ribosa.

bacteria sea fagocitada durante el proceso infeccioso. De esta manera, ExoS, ExoT y ExoA contribuyen en gran medida en la patogénesis provocada por *P. aeruginosa* inhibiendo algunos procesos celulares tales como la adhesión, la endocitosis, la proliferación y la diferenciación celular, y además causando la apoptosis de las células infectadas.

Recientemente con la secuenciación completa de algunos genomas bacterianos, se ha llegado a la identificación de al menos 21 genes de posibles mADPRTs tanto de bacterias Gram-positivas como de Gram-negativas (7). En algunos casos ya se ha comprobado la función del gen, por ejemplo, de un plásmido de *Salmonella typhimurium* se identificó y se clonó el gen de la proteína SpvB, la que posteriormente se demostró que puede ADP-ribosilar a la proteína actina y que puede despolimerizar la red de microfilamentos en la célula infectada, convirtiéndose así en un importante factor de patogenicidad durante el mecanismo de invasión bacteriano. Por otro lado, en la bacteria *Neisseria meningitidis* se identificó el gen de la proteína NarE, demostrándose que es una mADPRT que

posee una semejanza estructural con la toxina LTx, aunque no se ha descrito su sustrato fisiológico (8).

b) mADPRTs intracelulares bacterianas

Algunas mADPRTs bacterianas son enzimas intracelulares que regulan importantes procesos fisiológicos propios de las bacterias (Tabla I). En las bacterias fotosintéticas *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter capsulatus* se han descrito mADPRTs que regulan la actividad de enzimas endógenas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno. En estas bacterias existe la enzima DRAT (ADP-ribosiltransferasa de la dinitrogenasa reductasa) que ADP-ribosila a la dinitrogenasa reductasa (Nif) inhibiendo su actividad fijadora de nitrógeno, y la cual recupera posteriormente su función gracias a una ADP-ribosilhidrolasa la que libera la ADP-ribosa unida a la enzima Nif. Este sistema enzimático se considera entonces un importante regulador de la fijación de nitrógeno y fue prácticamente el primer reporte de una actividad enzimática regulada mediante la reversibilidad de la ADP-ribosilación (4, 5).

La bacteria *Rhizobium meliloti*, fijadora de nitrógeno y simbiote en

los nódulos de las raíces de algunas leguminosas, posee a la glutamino sintetasa III (GSIII) que es ADP-ribosilada por una mADPRT endógena. La ADP-ribosilación disminuye su actividad, lo que parece permitir a la bacteria regular la asimilación de nitrógeno bajo diferentes condiciones de crecimiento.

Por otro lado, en la bacteria *Streptomyces coelicolor* se identificaron algunas proteínas de membrana que pueden ser ADP-ribosiladas por una mADPRT intracelular, una de éstas es la proteína MalE, una proteína clave que induce la utilización de maltosa mediante el transporte membranal de este disacárido. Es probable que la ADP-ribosilación de MalE impida su ensamblaje en la membrana y su función transportadora, por los que esta actividad de mADPRT pudiera ser parte del control en el transporte membranal para la asimilación de nutrientes.

2. mADPRTs VIRALES

Las pocas mADPRTs de origen viral descritas hasta el momento son codificadas por algunos fagos, ya sea integrados en los genomas bacterianos, como en el caso de las toxinas CTx y DTx de *V. cholerae* y *C. diphtheriae*, respectivamente, o bien, por fagos como el T4 que infectan a *E. coli*. El genoma del fago T4 codifica para tres mADPRTs cuyo blanco de acción es la RNA polimerasa bacteriana. Durante la replicación intracelular del fago, cualquiera de las proteínas virales Alt, ModA y ModB, ADP-ribosila una arginina de la subunidad α de la RNA polimerasa bacteriana, lo que causa rearrreglos estructurales de ésta que llevan a la inhibición de la transcripción de los genes de la bacteria huésped, ocupándose ahora la RNA polimerasa ADP-ribosilada de la transcripción de los genes virales (9). Cabe señalar que ésta fue la primera actividad de ADP-ribosilación descrita intracelularmente en bacterias (5).

3. mADPRTs EN EUCARIOTES

El descubrimiento de las mADPRTs bacterianas impulsó la búsqueda de estas enzimas en células de distintos eucariotes (7, 10). Así, estas enzimas se han encontrado desde organismos unicelulares hasta vertebrados como las aves y los mamíferos (5 y referencias incluidas). Algunas son abundantes en fracciones citosólicas (Tabla II), mientras que otras están localizadas en la membrana celular como exoenzimas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), otras al no poseer dominios de unión a GPI, se postula que son proteínas secretadas (11).

Distintas mADPRTs se han encontrado prácticamente en todos los tejidos en donde se han buscado, tales como el músculo esquelético de conejo, hígado, cerebro y corazón de bovino, células de médula ósea y sangre periférica de aves, roedores y del humano (2, 5). De acuerdo a los distintos sustratos ADP-ribosilados que se han observado, se ha propuesto que tales enzimas podrían desempeñar funciones regulatorias tales como el control del transporte celular de diferentes sustratos, el mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico vesicular y la estructura del aparato de Golgi. Además, con base en un mayor número de evidencias, se propone fuertemente que las mADPRTs participan en la transducción de señales, la proliferación celular y en regular la activación de los linfocitos T, inhibiendo su citotoxicidad y secreción de citocinas (12).

Aunque se ha tenido un gran progreso en la caracterización bioquímica de las distintas mADPRT observadas, aún muy pocos genes de estas enzimas han sido descritos y clonados (10). A la fecha se han identificado siete genes de las mADPRTs extracelulares (denominadas ART1-ART7) de células humanas, del conejo, roedores y del pollo (2, 10, 11). Por su parte, en algunos tejidos como el músculo esquelético de la rata y el ratón, eritrocitos del pavo y cerebro del

humano, también se han identificado ADP-ribosilhidrolasas intracelulares que revierten la reacción de ADP-ribosilación (Fig. 1), lo que sugiere la existencia de una regulación fisiológica de la ADP-ribosilación, sin embargo, aún la función de muchas de las ARTs se desconoce, en parte debido a que en algunos casos se ha observado que una misma ART puede ADP-ribosilar a distintos sustratos (2).

a) mADPRTs extracelulares y sus funciones

Entre las mADPRTs mejor caracterizadas están las proteínas ART1 y ART2, las cuales son exoenzimas ancladas a la membrana plasmática. La proteína ART1, originalmente purificada en músculo esquelético de conejo, ADP-ribosila varias proteí-

nas de superficie tales como la integrina $\alpha 7$, involucrada en la miogénesis; sin embargo, también se encontró en la superficie de linfocitos T citotóxicos donde se observó que ADP-ribosila a los antígenos LFA-1, CD27, CD43, CD44 y CD45, causando una incorrecta asociación y formación del receptor de la célula T (TCR), lo que lleva a la inactivación del linfocito (11, 12).

Por su parte, la ART2 es la proteína de superficie denominada RT6.2 en los linfocitos T maduros de roedores, la cual es capaz de ADP-ribosilar algunas proteínas de superficie del propio linfocito, causando una inhibición de su función citotóxica. Además, la ART2 liberada de la célula mediante metaloproteasas extracelulares, puede actuar como un factor extrace-

TABLA II

mADPRTs DE BACTERIAS Y SUS SUSTRATOS

FUENTE DE mADPRT	LOCALIZACIÓN	AMINOÁCIDO	PROTEÍNA MODIFICADO
BLANCO			
Neutrófilos de humano NP-1	Extracelular	Arginina	Defensina
Plaquetas de humano	Citosol	Arginina	G _{as}
Eritrocitos de humano	Citosol	Cisteína	G _{ai}
Polimorfocitos de gallina	Secretable	Arginina	Tuftsina
Linfocitos T de rata y ratón CD38	Extracelular	Arginina	RT6.2,
Músculo esquelético de conejo integrina $\alpha 7$	Citosol, extracelular	Arginina	Desmina,
Reticulocitos de conejo	Citosol	NR ^a	EF-2
Células CHO heterotrimérica	Citosol	Arginina	G _{β}
Células CHO	Citosol	Histidina	EF-2
Células Hep-G2	Mitocondria	Cisteína	GDH
Células U937	Citosol	NR ^a	GAPDH
Células HL-60	Citosol	NR ^a	Actina
Células Hepa BiP/GRP78	R. endoplásmico	NR ^a	Chaperona
<i>Trypanosoma brucei</i> H2A	Núcleo	NR ^a	Histona
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	Citosol	Arginina	GAPDH
<i>Entamoeba histolytica</i>	Secretable	Arginina	NR ^a

^a NR: no reportado.

lular importante en la regulación intercelular. La ART2 también puede auto ADP-ribosilarse en presencia de concentraciones elevadas de NAD^+ extracelular, situación que se puede alcanzar en sitios donde hay inflamación y lisis celular. Es probable que de esta forma el linfocito T autorregule su citotoxicidad por una disminución en su capacidad adhesiva, o bien, por la inducción de su apoptosis, como un posible mecanismo de protección contra su acción destructiva sobre el tejido celular normal en los sitios de la inflamación (11, 12).

Asimismo, la ADP-ribosilación del antígeno CD38 observada en la superficie de los linfocitos T de ratón, es quizá otro ejemplo de una actividad de mADPRT que posiblemente está involucrada en la regulación de la actividad de los linfocitos T activados. Bajo concentraciones elevadas de NAD^+ extracelular, el antígeno CD38 es ADP-ribosilado por una mADPRT anclada a la membrana del propio linfocito, lo que lleva a un decremento intracelular de ADP-ribosa cíclica (ADPRc) y por ende de los niveles de calcio intracelulares, causando la apoptosis del linfocito T (13). Probablemente este mecanismo también sea parte de un sistema de regulación de la respuesta inmune celular.

Una mADPRT que es secretada se encontró en los gránulos citoplásmicos de leucocitos polimorfonucleares (PMN) del pollo. Se ha visto que una vez liberada del gránulo citotóxico, su actividad puede ser ejercida sobre una molécula del plasma sanguíneo: la tuftsina. La tuftsina es un tetrapéptido (TKPR) con afinidad por los neutrófilos y macrófagos, que estimula la fagocitosis y la quimiotaxis. La ADP-ribosilación de la tuftsina inhibe dicha estimulación, posiblemente como resultado de una baja afinidad de la molécula ADP-ribosilada por la célula receptora (14), por lo que podría estar involucrada en la regulación de la respuesta inmune de estas células.

Las ADP-ribosilación de las

defensinas es quizá hasta ahora el único reporte de una regulación molecular fisiológica mediada por mADPRTs en el ser humano. Las defensinas son moléculas de 29 a 33 aminoácidos con actividad bactericida y citolítica, secretadas por los leucocitos PMN de humano como un mecanismo de inmunidad innata. Estas moléculas se han aislado en su estado ADP-ribosilado en lavados bronquiales de pacientes con tabaquismo crónico, en los cuales se acumulan los leucocitos PMN en las vías respiratorias. La ADP-ribosilación de las defensinas inhibe su actividad citotóxica, por lo que es posible que esta modificación sea parte de un sistema celular de protección del epitelio respiratorio contra un efecto secundario dañino de estas moléculas (15). Es probable que las defensinas sean ADP-ribosiladas por las mADPRTs de los propios leucocitos PMN, ya que se ha reportado su existencia en la superficie de estas células. Otros leucocitos de humano que también poseen mADPRTs en su superficie son los monocitos. Cuando los monocitos se incuban con NAD^+ y lipopolisacárido (LPS) bacteriano, varias proteínas de su superficie son ADP-ribosiladas, posiblemente como un mecanismo de activación celular.

b) mADPRTs intracelulares y sus funciones

Se ha observado que la regulación de algunas actividades enzimáticas intracelulares se lleva a cabo por la acción conjunta de mADPRTs y ADP-ribosilhidrolasas, en ciclos de ADP-ribosilación y desADP-ribosilación (Fig. 1). Tal es el caso de una actividad de mADPRT intracelular generada en respuesta al estrés por acumulación de metabolitos tóxicos, que tiene su efecto sobre la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) mitocondrial en células Hep-G2, un hepatoma humano. La GDH es inhibida por su ADP-ribosilación en un residuo de cisteína en respuesta a las altas concentraciones de su

sustrato el glutamato, lo que evita que se acumule amoníaco, un subproducto de la actividad de esta enzima, el cual es tóxico para la célula. Cuando los niveles de glutamato bajan, la actividad de la GDH es restablecida por una ADP-ribosilhidrolasa mitocondrial específica de residuos de cisteína (16).

En células de ovario de hámster chino (CHO), la subunidad β de las proteínas G heterotriméricas (G_{β}) es ADP-ribosilada por una mADPRT intracelular. Esta modificación es revertida por una ADP-ribosilhidrolasa citoplásmica específica para residuos de arginina. Este sistema parece controlar la transducción de señales mediada por proteínas G, y es importante en la modulación de la proliferación y diferenciación celular, en la organización del citoesqueleto y el tráfico vesicular (17). Otros sistemas endógenos que también consisten en la ADP-ribosilación reversible de las subunidades heterotriméricas $G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha s}$ que conllevan a la regulación intracelular de la adenilato ciclasa, fueron descritos en eritrocitos y plaquetas de humano.

En células Hepa, un hepatoma de ratón, se ha observado la ADP-ribosilación de la chaperona BiP/GRP78 en respuesta a una baja concentración de glucosa y aminoácidos esenciales como el triptófano. Esta chaperona está situada en el lumen del retículo endoplásmico y participa en el ensamble de proteínas destinadas a la secreción. La ADP-ribosilación de la chaperona probablemente sea una respuesta al estrés nutricional, causando una disminución de la secreción de proteínas para evitar la salida excesiva de proteínas y la pérdida celular de aminoácidos.

Por otro lado, se ha observado que la síntesis de proteínas está regulada por mADPRTs intracelulares. En células CHO y reticulocitos de conejo se encontró una ADP-ribosilación endógena del EF-2, un componente indispensable en la extensión de la cadena polipeptídica

en los ribosomas, que inactiva su función (18).

c) mADPRTs en eucariotes unicelulares

En algunos eucariotes unicelulares también se ha observado que las mADPRTs regulan ciertas actividades metabólicas. En el hongo *Phycomyces blakesleeanus* se ADP-ribosila la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima clave en la glucólisis; la ADP-ribosilación inhibe su actividad, posiblemente como una respuesta de adaptación del hongo a cambios ambientales o diferentes condiciones de crecimiento. En el parásito *Trypanosoma brucei* se encontró que la ADP-ribosilación de la histona H2A, por la proteína Sir2 de localización nuclear, está implicada en la relajación de la cromatina, formando parte del sistema de reparación del ADN de este microorganismo. En otro parásito, en el protozoario *Entamoeba histolytica* se encontró que secreta una mADPRT, la cual ADP-ribosila en residuos de arginina algunas proteínas que también son secretadas por el parásito, posiblemente como un mecanismo de regulación de la función de algún factor extracelular que puede estar involucrado en la interacción de la amiba con su huésped (19).

4. MONO-ADP-RIBOSILACIÓN DE OTRAS MOLÉCULAS

Aunque la ADP-ribosilación ocurre sobre una gran cantidad de proteínas, existen dos moléculas completamente diferentes que son mono-ADP-ribosiladas: la rifampicina, un antibiótico antimicobacteriano y el ADN. En el primer caso, una micobacteria no patógena, *Mycobacterium smegmatis*, utiliza la mono-ADP-ribosilación como un mecanis-

mo de resistencia en contra de la rifampicina. La bacteria secreta una mADPRT que modifica la rifampicina en el radical 23-OH formando 23-(O-ADP-ribosil)rifampicina, incrementando su tolerancia al antibiótico. En el segundo caso, la ADP-ribosilación del ADN está causada por la pierisina-1, una toxina que se descubrió en las pupas de larvas de la mariposa *Pieris rapae* de la col y que se comenzó a estudiar por sus propiedades citotóxicas contra células cancerosas. La pierisina-1 es un factor inductor de apoptosis que es letal para una gran mayoría de tipos celulares, y se encontró que ADP-ribosila secuencias ricas en desoxiguanosinadesoxicidina (dG-dC) del ADN. La modificación por la pierisina-1 ocurre sobre la guanosina y forma N²-(ADP-ribos-1-il)-2'-desoxiguanosina, lo que provoca mutaciones por sustitución de bases en el ADN durante la replicación celular. Debido a que la pierisina-1 se acumula en la etapa larvaria del insecto, este mecanismo de modificación del ADN podría ser importante durante los eventos de la metamorfosis del insecto (20).

CONSIDERACIONES FINALES

La función fisiológica de la ADP-ribosilación está más clara en el caso de las enzimas bacterianas, en las que ya se ha comprobado su función *in vivo*, no así en la mayoría de los sistemas de eucariotes, donde muchos de los casos se han descrito en modelos *in vitro*, utilizando células transformadas. Por otro lado, se ha observado la presencia de genes de mADPRTs en elementos genéticos móviles como fagos y plásmidos en bacterias, sin dejar de mencionar que las distintas mADPRTs descritas desde los fagos hasta los mamíferos poseen una semejanza en su estructura secundaria, y además, poseen aminoácidos que son muy conserva-

dos en los sitios catalíticos. Todo esto hace suponer que la ADP-ribosilación es un mecanismo de regulación proteica muy conservado que muy probablemente se ha transmitido por transferencia genética horizontal a través de las distintas especies. Ahora bien, los genes de las ART1 ART5 tanto del humano como del ratón, se identificaron en el mismo tipo de tejido celular de ambos seres vivos. ART1 es una proteína específica del músculo esquelético, ART2 de los linfocitos T, ART3 y ART5 de los testículos y ART4 del corazón, hígado, pulmón y bazo; lo que también demuestra la conservación de este sistema de regulación postraduccional en la filogenia de las especies. Durante los últimos años, un número cada vez mayor de disciplinas han coincidido en el estudio de la ADP-ribosilación, contribuyendo en la comprensión de los sistemas de ADP-ribosilación en los organismos, tanto unicelulares como multicelulares. Con un mejor entendimiento de la fisiología de la ADP-ribosilación en el ser humano, es posible que las futuras investigaciones se enfoquen al diseño de estrategias moleculares que sirvan para el tratamiento de diversas afecciones, entre ellas el cáncer. Por ejemplo, algunos avances en la terapia oncológica ya contemplan el uso de toxinas quiméricas, las cuales son moléculas híbridas compuestas por una proteína con afinidad por un tejido específico (como un anticuerpo, el factor de crecimiento o la interleucina-13), acoplada a una mADPRT bacteriana (como ExoA). Estos agentes específicos con una alta citotoxicidad podrían ser utilizados en un futuro no muy lejano para combatir distintos tipos de células cancerosas.

REFERENCIAS

1. Ziegler M (2000) New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* 267: 1550-1564.
2. Corda D y Di Girolamo M (2003) Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J* 22: 1953-1958.
3. Rappuoli R y Pizza M (2000) Bacterial toxins. En: *Cellular Microbiology*. Editores: Cossart P, Boquet P, Normark S y Rappuoli R. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp 193-220.
4. Ludden P (1994) Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol Cell Biochem* 138: 123-129.
5. Koch-Nolte F y Haag F (1997) Mono(ADP-ribosyl) transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging Gene Families. En: *ADP-Ribosylation in Animal Tissues*. Editores: Haag F y Koch-Nolte F. Plenum Press, Nueva York. pp 1-13.
6. Koch-Nolte F, Reche P, Haag F y Bazan F (2001) ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets. *J Biotechnol* 92: 81-87.
7. Pallen M, Lam A, Loman N y McBride A (2001) An abundance of bacterial ADP-ribosyltransferases-implications for the origin of exotoxins and their human homologues. *Trends Microbiol* 9: 302-307.
8. Massignani V, Balducci E, Di Marcello F, Savino S, Serruto D, Veggi D, Bambini S, Scarselli M, Arico B, Comanducci M, Adu-Bobie J, Giuliani M, Rappuoli R y Pizza M (2003) NarE: a novel ADP-ribosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 50: 1055-1067.
9. Koch T, Raudonikiene A, Wilkens K y Ruger W (1995) Overexpression, purification, and characterization of the ADP-ribosyltransferase (gpAlt) of bacteriophage T4: ADP-ribosylation of *E. coli* RNA polymerase modulates T4 "early" transcription. *Gene Expr* 4: 253-264.
10. Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrije M, Leiter E, Haag F y Koch-Nolte F (2002) The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* 11: 1657-1670.
11. Okazaki I y Moss J (1998) Glycosylphosphatidylinositol anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases. *J Biol Chem* 273: 23617-23620.
12. Okamoto S, Azhipa O, Yu Y, Russo E y Dennert G (1998) Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotin-amide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol* 160: 4190-4198.
13. Han M, Cho Y, Kim Y, Yim C y Kim U (2000) Interaction of two classes of ADP-ribose transfer reactions in immune signaling. *J Biol Chem*. 275: 20799-20805.
14. Terashima M, Hara N, Badruzzaman M, Shimoyama M y Tsuchiya M (1997) ADP-ribosylation of tuftsin suppresses its receptor-binding capacity and phagocytosis-stimulating activity to murine peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 412: 227-232.
15. Paone G, Wada A, Stevens L, Matin A, Hirayama T, Levine R y Moss J (2002) ADP-ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8231-8235.
16. Herrero-Yraola A, Bakhit S, Franke P, Weise C, Schweiger M, Jorcke D y Ziegler M (2001) Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *EMBO J* 20: 2404-2412.
17. Lupi R, Corda D y Di Girolamo M (2000) Endogenous ADP-ribosylation of the G protein β subunit prevents the inhibition of type 1 adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 275: 9418-9424.
18. Iglewski W y Dewhurst S (1991) Cellular mono(ADP-ribosyl) transferase inhibits protein synthesis. *FEBS Lett* 283: 235-238.
19. Delgado-Corona P, Martinez-Cadena G, Alvarez AH, Torres-Calzada H y Avila EE (2002) An extracellular monoADP-ribosyl transferase activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol* 49: 454-459.
20. Takamura-Enya T, Watanabe M, Totsuka Y, Kanazawa T, Matsushima-Hibiya Y, Koyama K, Sugimura T y Wakabayashi K (2001) Mono(ADP-ribosyl)ation of 2'-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein, pierisin-1, from cabbage butterfly. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12414-12419.

LA UNIDAD Y LA DIVERSIDAD DE LOS COMPLEJOS DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN PROMOTORES BASALES DE TIPO II*

MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO, GLORIA SOLÍS GUZMÁN Y YAZMÍN CARREÓN ABUD

RESUMEN

El inicio de la transcripción de un gen por la ARN polimerasa II a partir de la región núcleo de un promotor, requiere de varios factores de iniciación, los cuales forman un complejo de preiniciación. Aunque estos factores están conservados en los diferentes eucariotes, existe evidencia reciente de que los diferentes promotores son reconocidos en su región núcleo por una maquinaria de transcripción altamente diversificada, lo cual permite regular de manera específica la iniciación de la transcripción.

PALABRAS CLAVE: Transcripción, iniciación, promotor.

ABSTRACT

Initiation of transcription of a gene by RNA polymerase II from a core promoter region requires the assembly of several initiation factors to form a preinitiation complex. Although these factors are well conserved in the different eukaryotic organisms, there is recent evidence for highly diversified transcription machinery responsible for recognizing distinct core promoters with specific regulatory activities.

KEY WORDS: Transcription, initiation, promoter.

INTRODUCCIÓN

La transcripción del ADN se lleva a cabo por las ARN polimerasas, sin embargo, mientras que sólo una enzima es responsable de este trabajo en eubacterias y arqueas, los eucariotes tienen tres ARN polimerasas que comparten la tarea de transcribir los genes nucleares. Estas últimas son: la ARN polimerasa I, la cual es responsable de sintetizar la mayor parte de los precursores del ARN ribosomal (18S, 5.8S y 28S); la ARN polimerasa II sintetiza el ARN mensajero y la mayoría de los ARN nucleares pequeños (ARNsn U1, ARNsn U2, etc.); la ARN polimerasa III sintetiza los ARN de transferencia (ARNt), el ARN ribosomal 5S y los ARN nucleares pequeños U6 (ARNsn U6). Todas las ARN polimerasas son complejos de proteínas, con dos subunidades grandes y un intrincado arreglo de pequeños componentes cuyos tamaños varían de 10 a 90 kDa. Las subunidades B220 y C160 de las

polimerasas II y III, respectivamente, son más similares entre sí con respecto a la subunidad grande A190 de la polimerasa I, lo que sugiere que las polimerasas II y III tienen un precursor común más cercano en términos evolutivos (1).

LAS REGIONES PROMOTORAS PRESENTAN ELEMENTOS DE SECUENCIA ESPECÍFICOS

Los promotores se definen de manera general como secuencias en el ADN que tienen la capacidad de causar la transcripción en un sistema de prueba *in vivo* o *in vitro*. Aunque existen variaciones entre los promotores reconocidos por las tres diferentes ARN polimerasas, éstos comparten algunas características:

a) Los promotores reconocidos por la ARN polimerasa I consisten de dos regiones separadas, una de ellas llamada el núcleo del promotor, que se extiende hacia ambos lados del sitio de inicio de la transcripción, desde -45

hasta +20, generalmente con secuencias ricas en GC, excepto por una secuencia corta rica en AT alrededor del sitio de inicio, y que se conoce como Inr. La otra región importante del promotor (UPE) se ubica desde -180 a -107 y también contiene una secuencia rica en GC. La región UPE es reconocida por el polipéptido UBF, de 85-97 kDa y la región núcleo es reconocida por un factor que consiste de 4 proteínas, de las cuales una de ellas (TBP) es un factor que es requerido para la iniciación por las ARN polimerasas II y III. Una vez que UBF y el factor que se une a la región núcleo están en posición, la ARN polimerasa I puede entrar al complejo del promotor (1).

b) La característica más asombrosa e inusual de los promotores usados por la ARN polimerasa III es que la mayoría incluyen elementos de secuencia importantes hacia delante del sitio de inicio de la transcripción, entre las posiciones +55 y +80. En

* Recibido: 11 mayo 2004 Aceptado: 05 octubre 2004

estos casos existen dos secuencias o cajas separadas, una caja A combinada ya sea con una caja B o C. Estas cajas son unidas por TFIIC, ya sea independientemente o en conjunción con TFIIA. La presencia de TFIIC permite que TFIIB se una al sitio de inicio y esto es suficiente para permitir que la ARN polimerasa III se una al sitio de inicio de la transcripción (1). Otro tipo de promotores usados por la polimerasa III se encuentran antes del sitio de inicio de la transcripción y contienen elementos similares a los reconocidos por la polimerasa II, los cuales serán mencionados más adelante.

c) La organización de los promotores reconocidos por la ARN polimerasa II consisten de un promotor núcleo, definido como la secuencia más corta en la que la ARN polimerasa II puede iniciar la transcripción y su funcionamiento es de una eficiencia baja. Antes del promotor núcleo, a pocas decenas de bases, se encuentran secuencias que varían de acuerdo al promotor y a las cuales se unen proteínas activadoras para incrementar la eficiencia de transcripción. Entre estas secuencias se encuentran las cajas CAAT y GC. De esta manera, el promotor núcleo con las secuencias cercanas que unen proteínas activadoras, conforman un promotor más eficiente. Es necesario hacer una distinción entre las secuencias cercanas que forman parte del promotor y secuencias más alejadas, a cientos o miles de bases respecto al sitio de inicio de transcripción, que permiten incrementar o potenciar la transcripción. Este último tipo de secuencias son conocidas como "enhancers" o potenciadores y contienen los mismos elementos de secuencia que son encontrados en los promotores, pero tienen como característica que pueden funcionar de manera bidireccional y tanto antes como delante del promotor (1).

LOS PROMOTORES NÚCLEO O BASALES RECONOCIDOS POR LA ARN POLIMERASA II

PUEDEN TENER VARIACIÓN EN SUS SECUENCIAS

Los elementos núcleo del promotor mejor caracterizados son el elemento o caja TATA, localizado entre 25 y 30 bases antes del sitio de inicio de la transcripción, con una secuencia consenso TATAa/tAa/t y el elemento iniciador (Inr), centrado en el sitio de inicio de la transcripción que es rico en pirimidinas, aunque su secuencia precisa es variable (YYANa/tYY) (2). La caja TATA está presente en la mayoría de los promotores y puede combinarse con el elemento iniciador. En otros promotores en que no hay caja TATA el elemento iniciador generalmente está presente, aunque puede faltar. Los promotores con caja TATA presentan elementos iniciadores débiles, ya que la eliminación de la caja TATA ocasiona la pérdida de la actividad del promotor y en estos casos el elemento iniciador tiene la función de precisar el sitio correcto de inicio del transcrito (3). Otro elemento presente en el núcleo del promotor es el DPE ("downstream promoter element") o elemento que se encuentra después del núcleo del promotor y que se ha reportado en algunos promotores de *Drosophila* y humanos, con una secuencia consenso a/gGa/tCGTG ubicada 30 nucleótidos después del sitio de inicio de transcripción (4). En un estudio de 205 promotores de *Drosophila* se encontró que existe una mayor flexibilidad en la secuencia DPE y que es tan común como la caja TATA (5). Se ha descrito un nuevo elemento presente en la región núcleo del promotor, BRE (elemento reconocido por TFIIB), con la secuencia consenso G/C-G/C-G/A-CGCC, el cual probablemente juegue un papel en determinar la fuerza del promotor (6).

Existen promotores sin las secuencias mencionadas anteriormente y en cambio presentan secuencias ricas en guaninas y citosinas (GGGGCG), que se han reportado como sitios de unión del factor Sp1, que consiste en una proteína de unión a ADN con dedos de zinc. Estas secuencias se han

reportado en genes de humanos, murinos y recientemente en plantas, particularmente en el promotor del gen de la sacarosa fosfato sintasa de arroz (7).

LOS FACTORES GENERALES DE TRANSCRIPCIÓN PERMITEN EL ENSAMBLAJE DE LA ARN POLIMERASA II Y EL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN

No es posible iniciar la transcripción de un gen *in vitro* cuando se utiliza sólo la ARN polimerasa II purificada; en cuyo caso es necesario adicionar componentes proteicos aislados de extractos celulares crudos. Este hecho demuestra que se requieren factores de transcripción, los cuales son definidos como cualquier proteína que es necesaria para la iniciación de la transcripción, pero que no es parte propiamente de la ARN polimerasa. El estudio de la transcripción *in vitro* ha permitido encontrar los componentes mínimos necesarios para este proceso, que corresponde a la transcripción basal. Los factores necesarios adicionales a la ARN polimerasa se han definido como factores generales de transcripción y se han nombrado de acuerdo al orden en que fueron aislados: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH y TFIIJ. Los factores y el proceso de iniciación de la transcripción se esquematizan en la figura 1 y han sido descritos de la manera siguiente (6): **a)** Reconocimiento de los elementos del núcleo del promotor por el factor TFIID; **b)** Reconocimiento del complejo TFIID-promotor por TFIIB; **c)** Reclutamiento de la ARN polimerasa y el factor TFIIF; **d)** Unión de TFIIE y TFIIH para completar el complejo de preiniciación; **e)** Formación de un complejo de iniciación abierto, por la separación de cadenas del ADN; **f)** Síntesis del primer enlace fosfodiéster en el transcrito nascente de ARNm; **g)** Liberación de los contactos de la ARN polimerasa II y aclaramiento del promotor y **h)** Alargamiento del transcrito de ARN. TFIIA puede unirse al complejo en cualquier etapa

después de la unión de TFIID, estabilizando el complejo de iniciación.

EL FACTOR TFIID PARTICIPA EN EL RECONOCIMIENTO DE ELEMENTOS NÚCLEO DEL PROMOTOR

TFIID es un complejo de proteínas formado por TBP (proteína de unión a TATA) y de 8 a 12 factores asociados a TBP, conocidos como TAF_{II}s (factores que se asocian a TBP), que han sido estudiados en levadura, *Drosophila* y humanos (8)(Fig. 2). El reconocimiento del elemento TATA es a través de la proteína TBP en el surco menor del ADN, lo que ocasiona una distorsión del mismo y al doblarse forma una curvatura a manera de un sable que permite un mejor reclutamiento para otros factores (9). Estudios de interacción *in vitro* entre dominios de activación y TAF_{II}s aislados y estudios de reconstitución de TFIID muestran que los TAF_{II}s son los blancos obligatorios de los activadores. Existe evidencia de que los TAF_{II}s desempeñan un papel en el reconocimiento del promotor, principalmente en lo que respecta a TAF_{II}150 que en algunos promotores con elemento iniciador permite el funcionamiento eficiente de éstos (10). Estudios de unión *in vitro* proporcionan evidencia de que es el complejo dimérico TAF_{II}250-TAF_{II}150 el que reconoce al elemento iniciador (11). Diferentes estudios demuestran que las funciones primarias tanto de TATA como del elemento iniciador consisten en reclutar a TFIID al núcleo del promotor, resultando en ambos casos en un complejo TFIID/ADN. Estudios de entrecruzamiento ("cross-linking") sugieren que el reconocimiento del elemento situado después del promotor (DPE), en promotores de *Drosophila* se lleva a cabo por TAF_{II}60 y TAF_{II}40 (4)(Fig. 2).

EL FACTOR TFIIB FUNCIONA COMO UNA PLATAFORMA

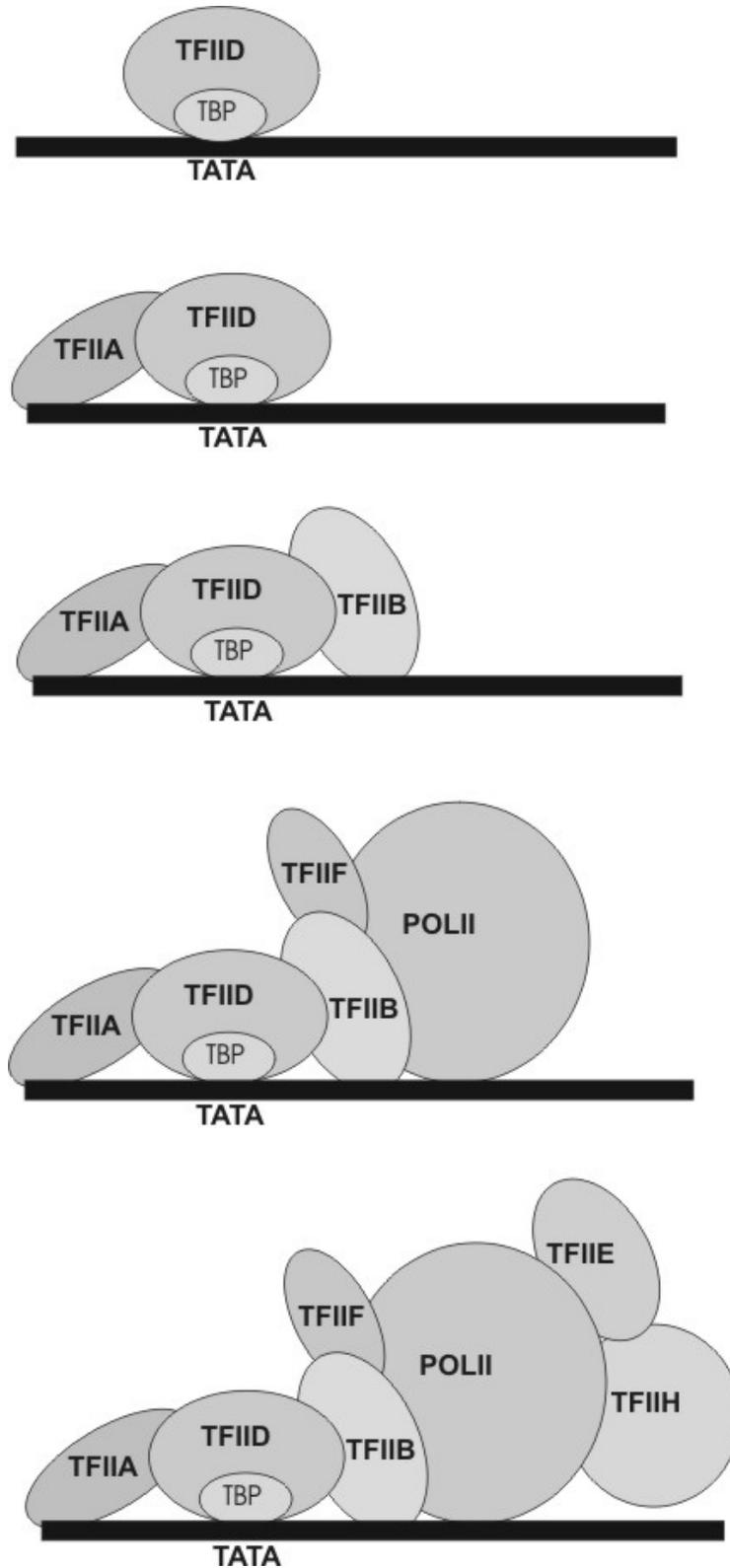


FIGURA 1. Orden de ensamblaje de los factores generales de transcripción y la ARN polimerasa II en el promotor típico de Adenovirus ML. El reconocimiento del promotor se lleva a cabo por la unión de TBP a la caja TATA. TBP funciona como parte del complejo TFIID y el resto del factor representa a los TAFs. TBP unido al ADN recluta a TFIIA y TFIIB, el cual proporciona una plataforma para que la polimerasa II unida al factor TFIIF se incorpore al complejo. TFIIE y TFIIH son reclutados al final mediante interacciones con la ARN polimerasa II. (Figura adaptada de la referencia 1).

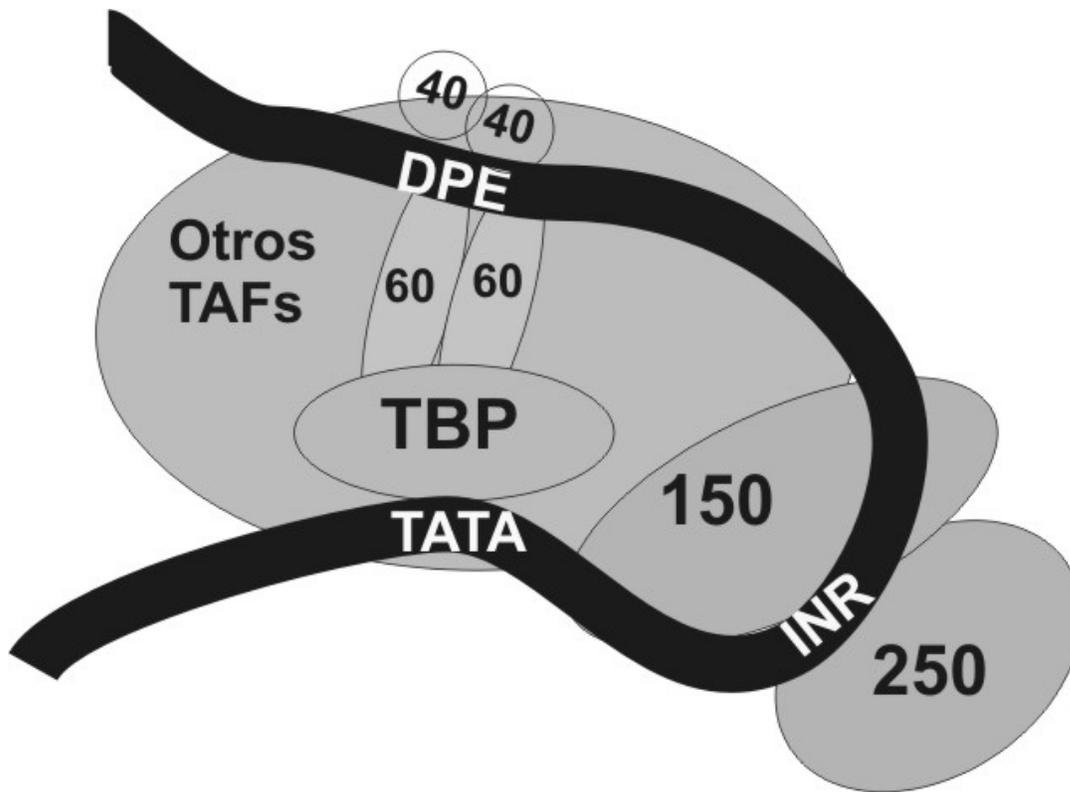


FIGURA 2. Modelo de unión de TFIID a un promotor idealizado con 3 elementos del núcleo del promotor: El DNA se representa como una banda negra con los elementos de secuencia (TATA, INR, DPE). Dentro del complejo, TBP se une a la caja TATA. El complejo TAF_n150-TAF_n250 se une al elemento iniciador y TAF_n60-TAF_n40 se unen a DPE. Aunque se conocen las interacciones mencionadas, el acomodo de los TAFs se desconoce. De manera natural los promotores pueden carecer de uno ó más de los elementos que se muestran o bien tener una secuencia altamente degenerada. (Figura adaptada de referencia 13).

PARA LA ARN POLIMERASA II

Este factor es un polipéptido de 35 kDa, el cual presenta sitios de interacción para el complejo TFIID-promotor, TFIIF y para la ARN polimerasa II, proporcionando una plataforma para el reclutamiento de la polimerasa y el factor TFIIF. Estudios *in vitro* en los que se hicieron intercambios de TFIIB de levadura y mamíferos demostraron que este factor es, junto con la polimerasa, el único responsable en la determinación del sitio de iniciación de transcripción; lo cual fue confirmado por estudios de cristalografía. Adicionalmente se ha demostrado que este factor interactúa con el elemento de secuencia BRE (elemento que reconoce la secuencia B), que se localiza en algunos promotores antes de la caja TATA y es posible que esta interacción juegue un papel en la fuerza del promotor o el orden de

ensamblaje del complejo de preiniciación (12).

EL FACTOR TFIIF ESCOGE A LA ARN POLIMERASA II

Este factor, formado por los polipéptidos RAP30 y RAP74, de 30 y 74 kDa respectivamente, se encuentra fuertemente asociado a la polimerasa II incluso en ausencia de ADN y suprime interacciones inapropiadas entre la polimerasa II y sitios que no son promotores (13). RAP30 ha evolucionado claramente de un factor bacteriano sigma. En estos organismos, sigma se une al resto de la ARN polimerasa, formada por las subunidades α y α' y permite de esa manera el reconocimiento de los promotores. RAP30 no sólo tiene homología con el factor sigma de bacterias, sino que puede unirse directamente a la ARN polimerasa de *Escherichia coli*.

TFIIE Y TFIIF PRESENTAN MÚLTIPLES ACTIVIDADES

El tetrámero TFIIE está compuesto de dos subunidades de 56 kDa y 34 kDa y entra al complejo de iniciación después de la polimerasa y TFIIF, aunque es posible que entre simultáneamente. Una vez que TFIIE es incorporado establemente, recluta a TFIIF al promotor (14), completando el proceso de ensamblaje y haciendo competente a la polimerasa para iniciar la transcripción. TFIIF es un factor complejo de 9 subunidades y múltiples actividades enzimáticas: **a)** dos subunidades son helicasas dependientes de ATP, que pueden desenrollar el DNA duplex, una en cada dirección **b)** la ciclina H y la cinasa dependiente de ciclina (cdk7) son otras subunidades, las cuales junto con un polipéptido regulatorio forman una actividad de cinasa activadora de cdk (CAK); **c)** cinco subunidades

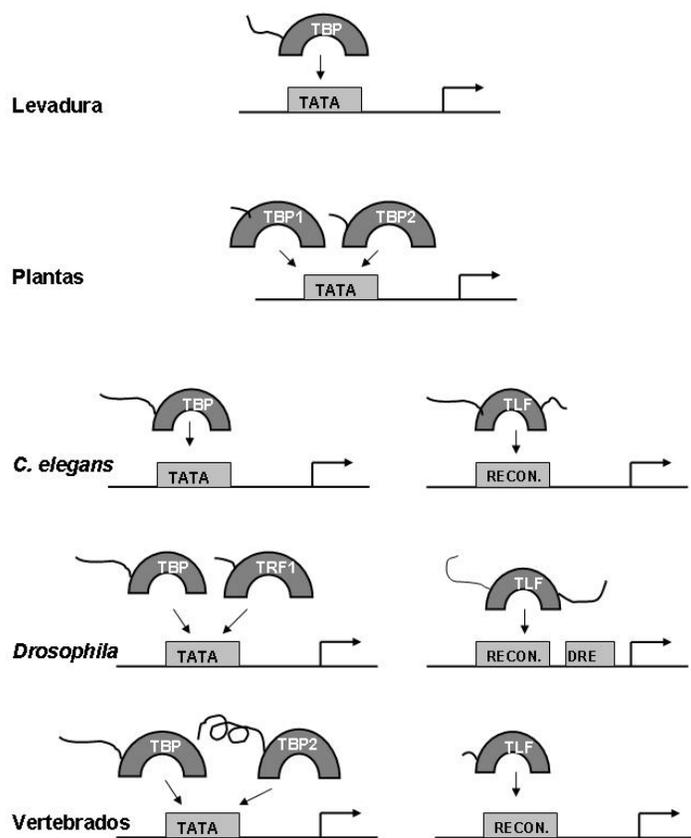


FIGURA 3. Factores TBP relacionados a TBP codificados por diferentes genomas. Los dominios conservados de estos factores se presentan de una manera semicircular y los extremos amino y carboxilo no conservados aparecen como proyecciones lineales. La caja TATA es obvia y las secuencias de reconocimiento diferentes a TATA se describen como RECON. Se indica en *Drosophila* un elemento DRE. (Figura adaptada de la referencia 16)

tienen un papel en la reparación de ADN, lo que permite acoplar la transcripción a la reparación (6).

DIVERSIDAD DE LOS COMPLEJOS DE TRANSCRIPCIÓN QUE RECONOCEN AL PROMOTOR

Inicialmente se pensaba que la formación de los complejos de iniciación de la transcripción en la secuencia núcleo del promotor eran invariables y se tenía solamente un tipo de complejo. La secuenciación de genomas y otros estudios demuestran que existe diversidad tanto en los miembros de las familias TBP como en los TAFs que se asocian a TBP para formar a TFIID. Se ha encontrado que además del gen que codifica para el TBP típico, puede haber otros genes con alta homología (más del 90%) los

cuales codifican para TBPs que difieren en el extremo amino terminal de la proteína, pero que son capaces de unirse a cajas TATA (15) (Fig. 3). En el caso de plantas y vertebrados se han denominado TBP2 y en *Drosophila* TRF1 (TBP-related factor 1). Este último (TRF1) se expresa a niveles altos en el sistema nervioso y gónadas de *Drosophila*, sugiriendo que su función es específica de tejido y sólo relacionada con ciertos genes. Además, se ha encontrado una familia de genes adicionales que codifican para factores relacionados a TBP, conocidos como TLFs (“TBP like factors”) y que comparten alrededor de un 60% de similitud con TBP (15). Se ha demostrado que a diferencia de TBP, los factores TLF no reconocen cajas TATA y pueden unirse al ADN con una especificidad completamente

diferente, por lo que pueden funcionar en promotores sin caja TATA (16). En *Caenorhabditis elegans* un TLF, TRF2 (“TBP-related factor 2”) es importante en el desarrollo embrionario, ya que la inactivación del gen correspondiente detiene el desarrollo del embrión. En murinos otro TLF (TRF2) se expresa principalmente en los testículos, ya que su inactivación ocasiona esterilidad y en *Drosophila* otro TLF (dTRF2) está relacionado con la expresión de un grupo de genes (17).

Además de la diversidad de factores relacionados con TBP se ha encontrado que existe diversidad en los factores que se asocian a TBP (TAFs) para conformar a TFIID (Fig. 4). Por ejemplo, en ovario de ratón (Fig. 4b) el TAF_{II}130 (TAF4b) es sustituido por TAF_{II}105, permitiendo la activación selectiva de un grupo pequeño de genes; la inactivación específica de TAF4b produce hembras que son estériles. De manera similar, TAF_{II}80 es reemplazado por TAF5b (“cannonball”) en los testículos de *Drosophila* (Fig. 4c), y su presencia es necesaria para la espermatogénesis (16).

Otro nivel de complejidad es adicionado por la presencia de complejos multiproteicos de TAFs que carecen de TBP y factores relacionados, y que han sido aislados de levaduras, *Drosophila* y células humanas (18). Estos complejos de TAFs libres de TBP (TFTC) pueden reemplazar a TFIID y funcionar en ensayos de transcripción *in vitro*, tanto en promotores con caja TATA o sin ella. Entre las proteínas que conforman a estos complejos se encuentran homólogos de TAF, la enzima acetil transferasa GCN5 y TRRAP (“transformation-transactivation domain-associated protein”) que se requiere para la activación de la oncoproteína Myc y la proteína del ciclo celular E2F. La presencia de enzimas acetil transferasas en estos complejos sugiere que puedan participar en la regulación de la transcripción al nivel de remodelación de la cromatina, mediante la acetilación de histonas.

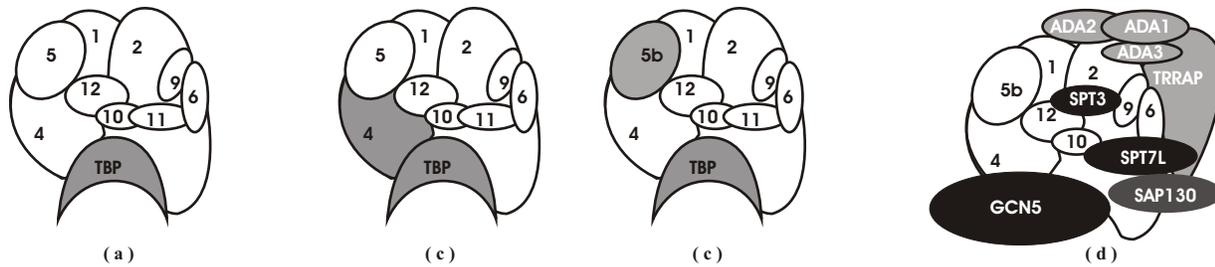


FIGURA 4. Representación esquemática de varios complejos que tienen TAFs. Los esquemas a, b y c representan formas de TFIID que presentan TBP y reconocen secuencias con cajas TATA. (a) TFIID estándar; utilizado en la formación de complejos de transcripción de la mayoría de los genes. (b) TFIID utilizado en células de ovario de ratón. (c) TFIID utilizado durante la espermiogénesis en los testículos de *Drosophila*. (d) Complejo de transcripción sin TBP utilizado en células humanas. (Figura adaptada de la referencia 18).

CONCLUSIÓN

Por lo anteriormente reportado es evidente que la diversidad de factores TBP y TAFs en los organismos metazoarios les permiten la formación

de diferentes complejos de iniciación de la transcripción al nivel del núcleo o región basal del promotor, lo que permite acomodar programas de transcripción más complejos, relacio-

nados con la expresión de grupos específicos de genes que permiten coordinar el desarrollo y la expresión específica en tejidos.

REFERENCIAS

- White R J (2001) *Gene transcription*. Blackwell Science, Glasgow UK. Pp 273.
- Nikolov D V y Burley SK (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 15-22.
- Zhu Q, Dabi T y Lamb C (1995) TATA box and Initiator functions in an accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro. *Plant Cell* 7:1681-1689.
- Burke T W y Kadonaga J T (1997) The downstream promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF_{II}60 of *Drosophila*. *Genes and Dev.* 11: 3020-3031.
- Kutach A K y Kadonaga J T (2000) The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol. Cell Biol.* 20: 4754-4764.
- Orphanides G, Lagrange T y Reinberg D (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes and Dev.* 10: 2657-2683.
- Martínez-Trujillo M, Chávez-Bárceñas T, Limones-Briones V, Simpson J y Herrera-Estrella L (2004) Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (*sps1*). *Plant Science* 166: 131-140.
- Burley S K y Roeder R G (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* 65: 769-799.
- Hernández N (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor. *Genes and Dev.* 7: 1291-1308.
- Martínez E, Chiang C M, Ge H y Roeder RG (1994) TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J.* 13: 3115-3126.
- Chalkey G y Verrijzer CP (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAK_{II}250-TAF_{II}150 complex recognizes the Initiator. *EMBO J.* 18: 4835-4845.
- Lagrange T, Kapanidis A N, Tang H, Reinberg D y Ebright R H (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes and Dev.* 12: 34-44.
- Killen M y Greenblatt J (1992) The general transcription factor RAP30 binds to RNA polimerasa II and prevents it from binding nonspecifically to DNA. *Mol. Cell. Biol.* 12: 30-37.
- Flores O, Ha I y Reinberg D (1990) Factors

involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 265: 5629-5634.

15. Müller F y Tora L (2004) The multicoloured world of promoter recognition complexes. *EMBOJ.* 23: 2-8.
16. Levine M y Tjian R (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424: 147-151.
17. Hochheimer A y Tjian R (2003) Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes and Dev.* 17: 1309-1320.
18. Muratoglu S, Georgieva S, Papai G, Scheer E, Enunlu I, Komonyi O, Cserpan I, Levedeva L, Nabirovchkina E, Udvardy A, Tora L y Boros I (2003) Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol. Cell. Biol.* 23: 306-321.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Emma Saavedra

Correo E: emma_saavedra2002@yahoo.com

Diseño de un oligonucleótido para su utilización como sonda de hibridación

En ocasiones, en los laboratorios de investigación se requiere diseñar un oligonucleótido a partir de una secuencia corta de aminoácidos obtenida por digestión y secuenciación de aminoácidos de una proteína purificada, para utilizarlo como sonda en la búsqueda del gen respectivo en bibliotecas genómicas o de cADN.

Ya que la mayoría de los aminoácidos son codificados por 2-6 codones, sería difícil predecir la secuencia de nucleótidos exacta que codificaría para ese péptido. Por ejemplo, existen 64 posibles oligonucleótidos de 18 bases que pueden codificar para la secuencia Asn,Phe,Tyr,Ala,Trp,Lys.

Una estrategia común es utilizar mezclas de oligonucleótidos degenerados para incrementar las posibilidades de hibridación con el gen blanco. Estas son mezclas que contienen todas las combinaciones posibles de oligonucleótidos que pueden codificar para un péptido (Sambrook y Russell, 2001). Los oligonucleótidos de secuencia única son sintetizados por la adición química sucesiva de cada nucleótido (de acuerdo a la secuencia deseada) a un nucleótido unido a un soporte de fase sólida. Las mezclas de oligonucleótidos degenerados por lo tanto, se sintetizan por la adición de hasta las cuatro bases en una misma posición, creando oligonucleótidos con diferentes combinaciones en dicha posición (Sambrook y Rusell, 2001).

La digestión proteolítica y secuenciación de dos proteínas de los parásitos *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi* (causantes de la amibiasis y de la tripanosomiasis humanas), fueron obtenidas por el mismo procedimiento de purificación y dieron como resultado el siguiente péptido, idéntico en ambas proteínas:

NH₂-AQHRNDILISHPMETL

PREGUNTA 1

Considerando (i) el uso de codones que se muestra en la Tabla I, (ii) el número de codones que codifica para cada aminoácido y (iii) el hecho de que los genes de estos organismos no contienen intrones, diseñar para *Entamoeba histolytica* la mejor opción de una mezcla de oligonucleótidos degenerados con una longitud de 18 bases.

Explicar el razonamiento seguido para el diseño de la mezcla.

PREGUNTA 2

¿Esta mezcla de oligonucleótidos diseñado para *E. histolytica* sería también adecuada para localizar el gen en una biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi*? Si no es el caso, indicar la secuencia de la nueva mezcla de oligonucleótidos degenerados para este parásito

-Sambrook J, Russell, DW. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. NY. Vol. 2, p 10.1-10.52.

TABLA I.

Uso de codones de *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi* (consultado en la base de datos <http://www.kazusa.or.jp/codon/>)

		Eh		Tc				Eh		Tc				Eh		Tc	
UUU	F	30.2	22.6	UCU	S	17.0	10.9	UAU	Y	31.9	7.9	UGU	C	19.8	6.5		
UUC	F	12.5	13.2	UCC	S	1.6	13.7	UAC	Y	4.1	17.7	UGC	C	2.3	12.5		
UUA	L	39.8	4.9	UCA	S	28.4	9.5	UAA	*	2.0	0.5	UGA	*	0.4	1.3		
UUG	L	6.5	15.7	UCG	S	0.7	12.9	UAG	*	0.1	0.6	UGG	W	9.2	11.6		
CUU	L	26.1	20.8	CCU	P	8.5	8.5	CAU	H	15.4	9.3	CGU	R	4.3	14.7		
CUC	L	2.2	14.8	CCC	P	0.6	12.0	CAC	H	2.4	13.7	CGC	R	0.1	17.8		
CUA	L	2.7	3.7	CCA	P	27.8	12.3	CAA	Q	35.0	12.0	CGA	R	2.9	7.1		
CUG	L	0.6	28.4	CCG	P	0.2	15.5	CAG	Q	1.7	24.4	CGG	R	0.2	10.1		
AUU	I	57.4	20.5	ACU	T	25.5	10.9	AAU	N	46.5	16.5	AGU	S	16.5	11.0		
AUC	I	5.9	14.2	ACC	T	3.0	15.2	AAC	N	8.4	20.8	AGC	S	1.8	15.4		
AUA	I	14.0	5.1	ACA	T	26.7	15.4	AAA	K	63.6	16.1	AGA	R	27.4	4.3		
AUG	M	26.8	25.1	ACG	T	1.1	24.6	AAG	K	18.9	35.5	AGG	R	1.7	7.3		
GUU	V	42.2	18.1	GCU	A	28.5	17.3	GAU	D	45.9	22.4	GGU	G	18.1	18.5		
GUC	V	4.6	13.2	GCC	A	2.9	25.1	GAC	D	8.5	26.7	GGC	G	0.8	26.4		
GUA	V	16.4	6.0	GCA	A	28.1	19.4	GAA	E	65.6	23.8	GGA	G	43.9	12.8		
GUG	V	2.6	36.3	GCG	A	0.5	29.6	GAG	E	6.5	44.4	GGG	G	2.6	14.9		

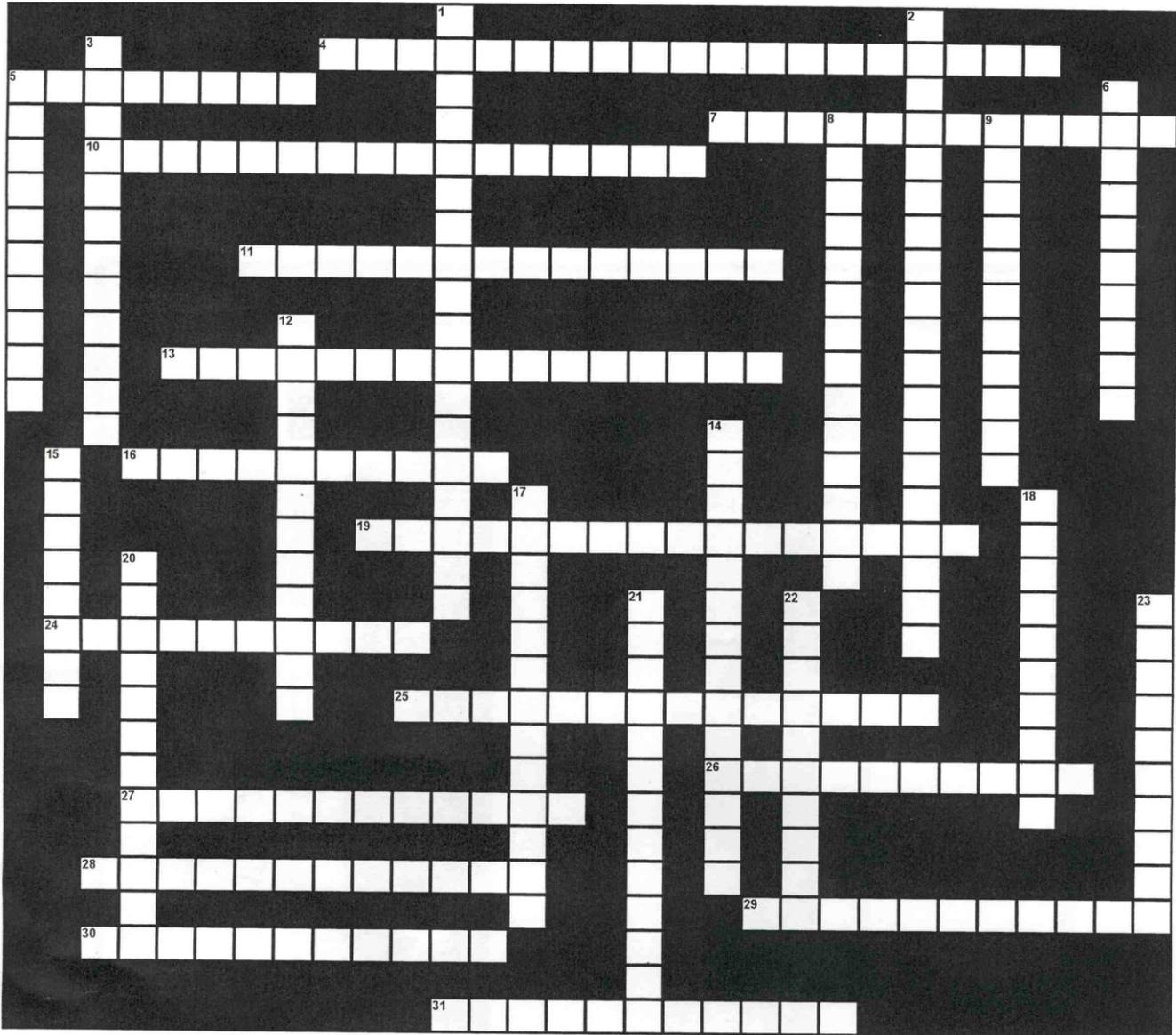
Eh= *E. histolytica*: Código GC 31.45%; primera letra GC 44.86%; segunda letra GC 35.32%; tercera letra GC 14.17%

Tc= *T. cruzi*: Código GC 54.34%; primera letra GC 58.20%; segunda letra GC 44.24%; tercera letra GC 60.57%

* indica codón de término

CRUCIBIOQ

COLESTEROL Y SUSTANCIAS ASOCIADAS



HORIZONTALES

- 4 Moléculas de 21 átomos de carbono, la aldosterona pertenece a este grupo y tienen como función actuar sobre el túbulo distal del riñón, aumentando la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ e H^+ .
- 5 Hormona que se produce en la corteza de la glándula suprarrenal y regula el metabolismo de la glucosa, es transportada por una globulina llamada transcortina.
- 7 Análogo estructural del cortisol al que se le ha añadido un átomo de flúor en el carbono 9, es utilizado en terapéutica y disminuye algunos efectos secundarios, como por ejemplo la retención de agua y sales minerales.
- 10 Grupo de hormonas que promueven la gluconeogénesis y para ello, el aumento en la degradación de las grasas y de las proteínas.
- 11 Tipo de circulación mediante la cual los ácidos biliares que se absorben en el intestino delgado, regresan en un porcentaje muy alto al hígado.
- 13 Acción del cortisol ya que puede estimular la síntesis de lipomodulinas, proteínas que impiden la síntesis y la liberación de prostaglandinas, que son mediadores

de la inflamación.

- 16 Producto de la reducción de la 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima con la participación de NADPH, al bloquear su síntesis por estatinas, se disminuye la producción de colesterol.
- 19 Con este término se designan a las hormonas cortisol, corticosterona y aldosterona.
- 24 Hormonas que poseen en su estructura al ciclopentanoperhidro-fenantreno.
- 25 Vitamina D₂ es un compuesto formado por el cornezuelo de centeno, hongo que es parásito a este grano.
- 26 Hormonas que participan en el ciclo ovárico y son necesarias para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en las hembras.
- 27 Síndrome ocasionado por la deficiencia de vitamina D que se expresa con reblandecimiento y debilidad en los huesos.
- 28 Hormona responsable del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en el hombre.
- 29 Tiene como función solubilizar a los lípidos de la dieta y es el producto de la reacción entre colil-coenzima A y un aminoácido.
- 30 Tiene azufre en su estructura, actúa como detergente propiciando la formación de micelas y con ello permite que haya una mejor acción de las lipasas hidrosolubles.
- 31 Se excreta en las heces y ayudado por bacterias intestinales, es el producto de degradación del colesterol.

VERTICALES

- 1 Por la acción de la luz ultravioleta da lugar a colecalciferol.
- 2 La deficiencia o carencia de receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) impide que éstas se endociten y por lo tanto permanezcan altas en plasma, ocasionando esta patología.
- 3 Es un gestágeno, prepara los revestimientos del útero

- 5 Hormona que se forma a partir de la vitamina D mediante reacciones de hidroxilación.
- 6 Hormonas anabólicas que estimulan la síntesis de proteínas, aumentan la masa muscular y disminuyen la reserva de lípidos del tejido adiposo.
- 8 Patología ocasionada por la producción no regulada de colesterol lo cual induce su acumulación en forma de placas en los vasos sanguíneos.
- 9 Hormona que se produce en las glándulas suprarrenales y tiene como función regular la reabsorción de Na⁺, Cl⁻ y HCO₃⁻ en el riñón.
- 12 Es el resultado en la deficiencia de la 21-hidroxilasa, enzima que interviene en la síntesis de glucocorticoides, como consecuencia se eleva la producción de hormona adrenocorticotrófica y finalmente se incrementa la producción de andrógenos.
- 14 Vitamina D₃, es precursor de la hormona 1,25-dihidroxicolecalciferol la cual regula la fijación o eliminación de Ca⁺⁺ en huesos.
- 15 Se le llama _____ activo y es el producto de la fosforilación y descarboxilación del mevalonato.
- 17 Forma en la que el colesterol y sus ésteres se transportan en la sangre.
- 18 Producto de ciclización del escualeno, la reacción requiere NADPH, O₂ y es catalizada por una ciclasa.
- 20 Tipo de radiación que abre el anillo B del 7-dehidrocolesterol para iniciar la síntesis de las vitaminas D.
- 21 Partículas formados por colesterol, una gran cantidad de triacilglicérols y la apoproteína B-48, esta última tiene una región hidrofílica.
- 22 Esteroide que modula la fluidez de la membrana y que es precursor de glucocorticoides, mineralocorticoides y estrógenos entre otras moléculas- .
- 23 Así se conoce a la patología ocasionada por la deficiencia de vitamina D en niños y que se caracteriza por una calcificación inadecuada de huesos y cartílagos.

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Respuesta 1.

A pesar de que la secuencia de aminoácidos de dos proteínas puede ser idéntica en una región pequeña (por ejemplo la secuencia de unión de sustratos o cofactores o de aminoácidos involucrados en la catálisis), el uso de codones de cada organismo puede ser muy diferente y esto determina la secuencia de nucleótidos que codifica para dicho fragmento.

En la Tabla I se puede apreciar que el uso de codones entre los dos organismos es bastante diferente. *E. histolytica* tienen un bajo contenido de G y C en sus secuencias codificantes (31.45%) mientras que los genes de *T. cruzi* tienen en sus genes un mayor contenido de GC (54.3%). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que se obtendrá en el primero mostrará un alto contenido de A y T, mientras que el segundo tendrá mayor porcentaje de G y C

Para el diseño de un oligonucleótido es necesario atender a ciertas recomendaciones:

- Evitar escoger regiones donde existan aminoácidos que son codificados por muchos codones; por ejemplo arginina (R), leucina (L) y serina (S) son codificados por seis codones, mientras que alanina (A), glicina (G), prolina (P), treonina (T) y valina (V) son codificados por cuatro codones. Esto evita tener que insertar los cuatro nucleótidos en las tres posiciones de cada triplete codificante.
- Evitar que al final del oligonucleótido queden este tipo de aminoácidos.
- Si existen aminoácidos que son codificados por un número grande de codones, tratar de que estos queden en medio del oligonucleótido, mientras que en los extremos escoger aminoácidos codificados por pocos codones.
- Por lo tanto, de preferencia hay que escoger regiones donde haya aminoácidos codificados por 1-3 codones. Esto favorecería una mayor hibridación entre la sonda y el DNA blanco.

Los oligonucleótidos deben tener una longitud de 18 bases, esto es, deben corresponder a una secuencia contigua de 6 aminoácidos.

El análisis de las sextetas de aminoácidos posibles y considerando las recomendaciones anteriores tenemos las siguientes combinaciones posibles para diseñar el oligonucleótido:

Oligo 1. Esta región inicial contiene en su mayoría aminoácidos codificados por dos codones, excepto la R que es codificado por 6 y está en un posición intermedia; el inconveniente radica en que la A está también codificada

AQHRNDILISHPMETL	secuencia obtenida
AQHRND	oligo 1
QHRNDI	oligo 2
HRNDIL	oligo 3
RNDILI	oligo 4
NDILIS	oligo 5
DILISH	oligo 6
ILISHP	oligo 7
LISHPM	oligo 8
ISHPME	oligo 9
SHPMET	oligo 10
HPMETL	oligo 11

por cuatro codones

Oligo 2. Esta región tiene en su mayoría aminoácidos codificados por dos codones excepto R y a diferencia con el oligo 1 termina con I, que es codificado por tres codones. Sin embargo, la diferencia con el oligo 1 termina con I, que es codificado por tres codones. Sin embargo, la diferencia en estos tres radica únicamente en la tercera base del codón por lo que podría no representar un problema mayor. Por lo tanto, esta es una buena región para hacer un oligonucleótido.

Oligos 3-11 tienen en los extremos o en medio aminoácidos codificados por 6 codones (R, L, S) o 4 codones (P y T) lo que podría desfavorecer la hibridación en estas regiones debido a las diferentes posibilidades en cada posición de estos codones.

Por lo tanto la secuencia de aminoácidos más favorecida es la que presenta el oligo 2:

QHRNDI

De acuerdo al uso de codones de *E. histolytica* (Tabla I), los nucleótidos con mayores posibilidades de encontrarse serían los siguientes:

	Q	H	R	N	D	I
5´	CAA	CAT	AGA	AAT	GAT	ATT
			CGT			ATA

La mezcla de oligonucleótidos degenerados contendría oligonucleótidos que difieren en la base donde existen las dos posibilidades de nucleótido, por lo que la mezcla final contendría en total ocho oligonucleótidos diferentes.

Un problema que tendría un oligo como este es que su contenido de AT es muy alto. Ya que solamente se establecen dos puentes de hidrógeno entre estas dos bases, se tendrían que utilizar temperaturas de hibrida-

ción bajas, así como la utilización de altas concentraciones de sales en la solución de hibridación para favorecer la unión de la sonda al DNA blanco

Respuesta 2

De acuerdo a la misma secuencia de aminoácidos anterior, para *T. cruzi* los codones más representados para dichos aminoácidos serían los siguientes:

	Q	H	R	N	D	I
5´	CAA	CAT	CGC	AAT	GAT	ATT
	CAG	CAC	CGT	AAC	GAC	ATC
			CGG			
			AGG			
			CGA			

Para los oligonucleótidos de este parásito se escogieron más variedad de codones que para el caso anterior ya que como se puede observar en la Tabla I, para algunos aminoácidos *T. cruzi* no muestra una preferencia marcada en un codón. La mezcla de oligonucleótidos degenerados sería más compleja en este caso.

Como se había predicho del uso de codones, la sonda para este parásito presenta codones que tienen mayor contenido de GC que el de *E. histolytica*; por lo tanto la sonda diseñada para éste último no serviría para buscar el gen de *T.*

cruzi. Por otro lado, a pesar de que la sonda de *T. cruzi* contiene los codones que codificarían para la mayoría de los aminoácidos de la secuencia de la amiba, el problema radica en que la R estaría codificada por codones extremadamente diferentes y podría dificultar el proceso de hibridación. Por lo tanto, es más adecuado sintetizar sondas independientes para cada organismo.

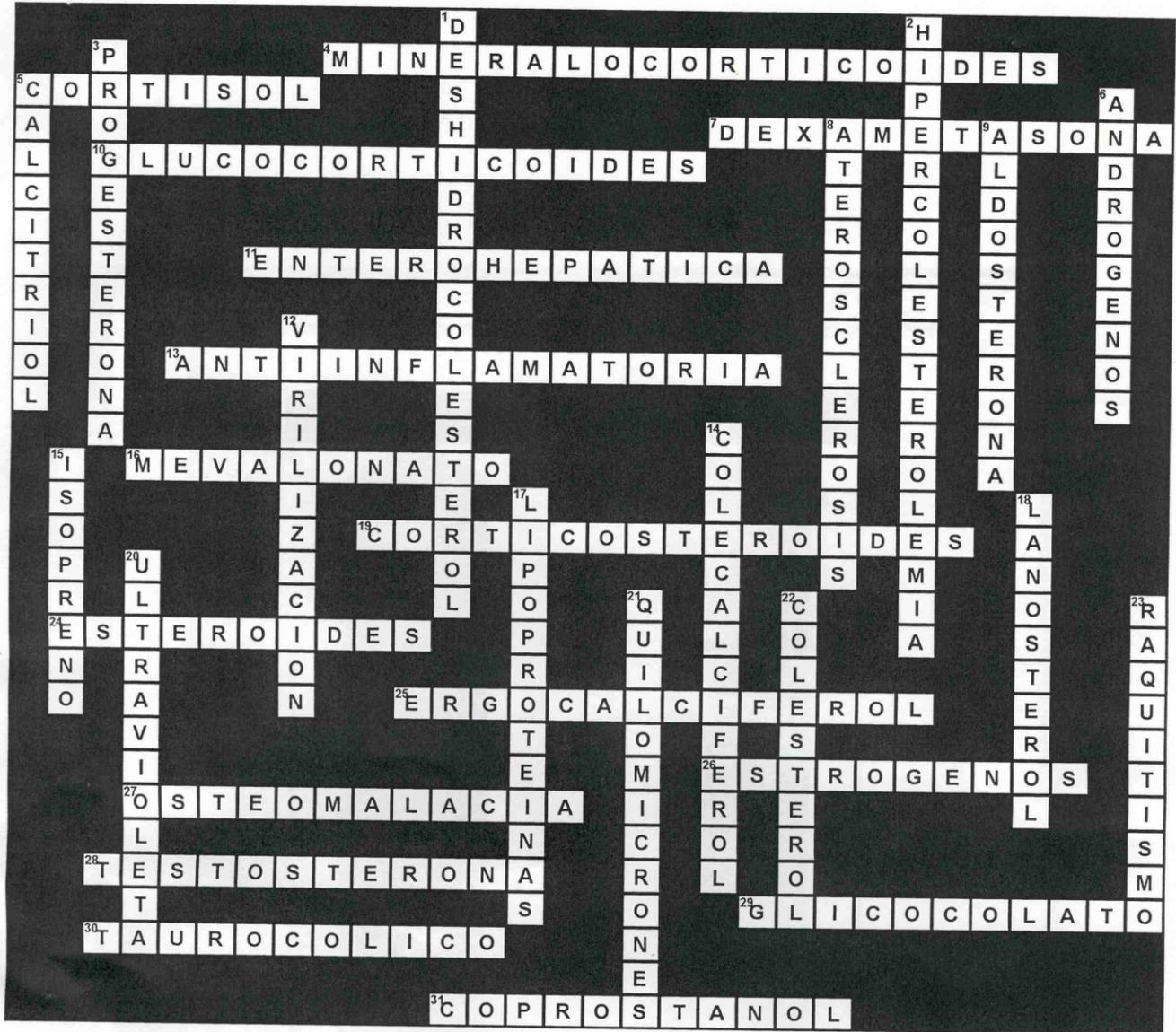
Conclusión

Con este ejercicio se trata de demostrar que cuando se requiere diseñar oligonucleótidos para usarlos como sonda de hibridación en procedimientos de búsquedas de genes en bibliotecas genómicas o de cDNA, o alternativamente, en el diseño de pares de oligonucleótidos para utilizarlos como primers en reacciones de PCR, lo más adecuado es basarlos en el uso de codones del organismo de estudio.

Siguiendo el mismo razonamiento, se debe de poner especial atención al uso de genes o segmentos de un gen de un organismo para ser utilizados como sonda para buscar el gen de otro organismo que pertenezca a un grupo taxonómico muy diferente, ya que si el uso de codones es tan divergente como en el presente ejercicio, las probabilidades de tener hibridación exitosa disminuyen en alto grado, con resultados desalentadores.

SOLUCIÓN CRUCIBIOQ

COLESTEROL Y SUSTANCIAS ASOCIADAS



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

ÍNDICE ANUAL DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2004

AUTORES DE EDITORIALES

Calderón Salinas José Víctor. La Revista de Educación Bioquímica es ya una Revista Electrónica; en plena modernidad, entre la alegría y la nostalgia. REB 23(1):1-2

Cravioto Ma. del Carmen y Larrea Fernando. La Píldora anticonceptiva de emergencia. REB 23(1):57-58

Garriz Ruiz Andoni. Conocimiento pedagógico del contenido: Un nuevo concepto para caracterizar la buena docencia. REB 23 (3): 95-98

Meza Ruiz Graciela. Las mujeres "Nobel". REB 23(4):139

AUTORES DE LOS ARTÍCULOS

Alvarez Herrera Ángel Hilario. Mono-ADP-ribosilación: Implicación en la fisiología de los organismos. REB 23(4):149-156

Castro Guerrero Norma Angélica y Moreno Sánchez Rafael. Biosíntesis del grupo hemo. REB 23(3):99-106

Cortina Ramírez G Emelí y Calderón Salinas José Víctor. Modelos de experimentación para el estudio del tejido óseo. REB 23(3):107-116

Escobedo González Galileo y Morales Montor Jorge. Tras-regularización por hormonas del hospedero de la fisiología parasitaria. Una nueva visión de la relación hospedero-parásito. REB 23(1):12-17

Jauregui-Zuñiga David y Moreno Cárcamo Abel. La biomineralización del oxalato de calcio en plantas: Retos y potencial. REB 23(1):18-23

Jiménez-García Ernesto, Tapia Vieyra Juana Virginia y Mas-Oliva Jaime. El esplaiceosoma: Corte y empalme pre-ARNm. REB 23(2):59-63

Loeza Lara Pedro D, Váldez Alarcón Juan J, Baizabal Aguirre Víctor M y López Meza Joel E. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. REB 23(2):71-78

López Bojórquez Lucia Nikolaia. Papel de las isoformas de la proteína inhibidora I- B en la activación del factor transcripción NF- B REB 23(4):140-148.

Martínez Trujillo Miguel, Solís Guzmán Gloria y Carreón Abud Yazmín. La unidad y la diversidad de los complejos de iniciación de la transcripción en promotores basales de tipo II. REB 23(4):157-163

Martínez Velázquez Moisés, Morán Andrade Julio, Maldonado Lagunas Vilma y Meléndez Zajgla Jorge. SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis. REB 23(2): 64-70

Mayoral Chávez Miguel Ángel, Zenteno Galindo Edgar, Espinosa Mancilla Blanca, Martínez Cairo Salvador y Guevara Fonseca Jorge. Enfoques moleculares de la metástasis tumoral. REB 23(3):117-122

Moreno-Sánchez Rafael y Saavedra Emma. Productividad científica del Instituto Nacional de Cardiología de 1996 a 2002. REB 23(1):24-29

Sosa Garrocho y Macías-Silva Marina. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): Funciones y vías de transducción. REB 23(1):3-11

AUTORES DE OTRAS COMUNICACIONES

Claros Gonzalo, Saladrigas Verónica y González Halphen Diego. Vocabulario Inglés-Español de Bioquímica y Biología Molecular (4.^a entrega). REB 23(1):42-54

Calderón Salinas José Víctor. Foros de discusión. REB 23(3):125

Flores Herrera Oscar, Riveros Rosas Héctor, Sosa Peinado Alejandro y Vázquez Contreras Edgar. Programa del XXXI Taller de Actualización Bioquímica. REB 23(1):41

Flores Herrera Oscar, Riveros Rosas Héctor, Sosa Peinado Alejandro y Vázquez Contreras Edgar. Programa del XXXI Taller de Actualización Bioquímica. REB 23(2):91

Meza Ruiz Graciela. Las mitocondrias en la herencia

materna. El caso de la sordera. REB 23(3):123-124

Meza Ruíz Graciela. Foro de discusión sobre los científicos. REB 23(3):125

Meza Ruíz Graciela. Los científicos: ¿Quiénes somos? REB 23(3):125

Río Gabriel del. ¿Por qué invertir en la Ciencia Mexicana? REB 23(3):126-127

Rodríguez-Enríquez Sara y Mendoza-Cózatl David G. PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Control Metabólico. REB 23(3):128 y 131-132

Saavedra Emma. PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Biología Molecular: Construcción de un mapa de restricción de DNA. REB 23 (1):30 y 33

Saavedra Emma. PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Diseño de un oligonucleótido para su utilización como sonda de hibridación. REB 23(4):164,167-168

Saldaña Balmori Yolanda, Sánchez Meza Virginia y Salceda Sacanelles Rocío. Convocatoria al XII Congreso de Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. REB 23(1): 36-40

Saldaña Balmori Yolanda, Sánchez Meza Virginia y Salceda Sacanelles Rocío. Convocatoria al XII Congreso de Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. REB 23 (2): 86-90

Saldaña Balmori Yolanda. CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Genética. REB 23(1): 31-32 y 34

Saldaña Balmori Yolanda. CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Bioenergética. REB 23(2):80-81 y 84

Saldaña Balmori Yolanda. CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Aminoácidos, péptido y proteínas. REB 23(3):129-130 y 133

Saldaña Balmori Yolanda. CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Colesterol y sustancias asociadas. REB 23(4):165-166 y 169

Semana de Educación Bioquímica. REB 23(1): 35

Semana de Educación Bioquímica. REB 23(2): 85

Varela-Gómez Marcela Lilián. PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Mecanismo cinético

propuesto para la asparagina sintetasa A. REB 23(2):79 y 82-83

TÍTULOS DE EDITORIALES

Conocimiento pedagógico del contenido: Un nuevo concepto para caracterizar la buena docencia. Garriz Ruiz Andoni. REB 23 (3): 95-98

La Píldora anticonceptiva de emergencia. Cravioto Ma. del Carmen y Larrea Fernando. REB 23(1):57-58

La Revista de Educación Bioquímica es ya una Revista Electrónica; en plena modernidad, entre la alegría y la nostalgia. Calderón Salinas José Víctor. REB 23(1):1-2

Las mujeres "Nobles". Meza Ruiz Graciela. REB 23(4):139

TÍTULOS DE LOS ARTÍCULOS

biomineralización del oxalato de calcio en plantas: Retos y potencial. La Jauregui-Zuñiga David y Moreno Cárcamo Abel. REB 23(1):18-23

Biosíntesis del grupo hemo. Castro Guerrero Norma Angélica y Moreno Sánchez Rafael. REB 23(3):99-106

Enfoques moleculares de la metástasis tumoral. Mayoral Chávez Miguel Ángel, Zenteno Galindo Edgar, Espinosa Mancilla Blanca, Martínez Cairo Salvador y Guevara Fonseca Jorge. REB 23(3):117-122

esplaiçosoma: corte y empalme pre-ARNm. El Jiménez-García Ernesto, Tapia Vieyra Juana Virginia y Mas-Oliva Jaime. REB 23(2):59-63

factor de crecimiento transformante beta (TGF-β): Funciones y vías de transducción. El Sosa Garrocho y Macías-Silva Marina. REB 23(1): 3-11

Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. Loeza Lara Pedro D, Váldez Alarcón Juan J, Baizabal Aguirre Víctor M y López Meza Joel E. REB 23(2):71-78

Modelos de experimentación para el estudio del tejido óseo. Cortina Ramírez G Emelí y Calderón Salinas José Víctor. REB 23(3):107-116

Mono-ADP-ribosilación: Implicación en la fisiología de los organismos. Alvarez Herrera Ángel Hilario. REB

23(4):149-156

Papel de las isoformas de la proteína inhibidora I- B en la activación del factor transcripción NF- B. López Bojórquez Lucia Nikolaia. REB 23(4):140-148

Productividad científica del Instituto Nacional de Cardiología de 1996 a 2002. Moreno-Sánchez Rafael y Saavedra Emma. REB 23(1):24-29

SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis. Martínez Velázquez Moisés, Morán Andrade Julio, Maldonado Lagunas Vilma y Meléndez Zajgla Jorge. REB 23(2):64-70

Tras-regularización por hormonas del hospedero de la fisiología parasitaria. Una nueva visión de la relación hospedero-parásito. Escobedo González Galileo y Morales Montor Jorge. REB 23(1):12-17

unidad y la diversidad de los complejos de iniciación de la transcripción en promotores basales de tipo II. La Martínez Trujillo Miguel, Solís Guzmán Gloria y Carreón Abud Yazmín. REB 23(4):157-163

TÍTULOS DE OTRAS COMUNICACIONES

Convocatoria al XII Congreso de Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Saldaña Balmori Yolanda, Sánchez Meza Virginia y Salceda Sacanelles Rocío. REB 23(1):36-40

Convocatoria al XII Congreso de Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Saldaña Balmori Yolanda, Sánchez Meza Virginia y Salceda Sacanelles Rocío. REB 23 (2):86-90

CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Genética. Saldaña Balmori Yolanda. REB 23(1): 31-32 y 34

CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Bioenergética. Saldaña Balmori Yolanda. REB 23(2): 80-81 y 84

CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Aminoácidos, péptido y proteínas. Saldaña Balmori Yolanda. REB 23(3):129-130 y 133

CRUCIBIOQ y SU SOLUCIÓN. Colesterol y sustancias asociadas. Saldaña Balmori Yolanda. REB 23(4):165-166 y 169

Foro de discusión sobre los científicos. Meza Ruíz Graciela. REB 23(3):125

Foros de discusión. Calderón Salinas José Víctor. REB 23(3):125

Las mitocondrias en la herencia materna. El caso de la sordera. Meza Ruíz Graciela. REB 23(3):123-124

Los científicos: ¿Quiénes somos? Meza Ruíz Graciela. REB 23(3):125

¿Por qué invertir en la Ciencia Mexicana? del Río Gabriel. REB 23(3):126-127

PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Biología Molecular: Construcción de un mapa de restricción de DNA. Saavedra Emma. REB 23 (1): 30 y 33

PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Mecanismo cinético propuesto para la asparagina sintetasa A. Varela-Gómez Marcela Lilián. REB 23(2):79, 82 -83

PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Control Metabólico. Rodríguez-Enríquez Sara y Mendoza-Cózatl David G. REB 23(3):128,131-132

PROBLEMA BIOQUÍMICO y SU RESPUESTA. Diseño de un oligonucleótido para su utilización como sonda de hibridación. Saavedra Emma. REB 23(4):164,167-168

Programa del XXXI Taller de Actualización Bioquímica. Flores Herrera Oscar, Riveros Rosas Héctor, Sosa Peinado Alejandro y Vázquez Contreras Edgar. REB 23(1):41

Programa del XXXI Taller de Actualización Bioquímica. Flores Herrera Oscar, Riveros Rosas Héctor, Sosa Peinado Alejandro y Vázquez Contreras Edgar. REB 23(2):91

Semana de Educación Bioquímica. REB 23(1):35

Semana de Educación Bioquímica. REB 23(2):85

Vocabulario Inglés-Español de Bioquímica y Biología Molecular (4.^a entrega). Claros Gonzalo, Saladrigas Verónica y González Halphen Diego. REB 23(1):42-54

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.