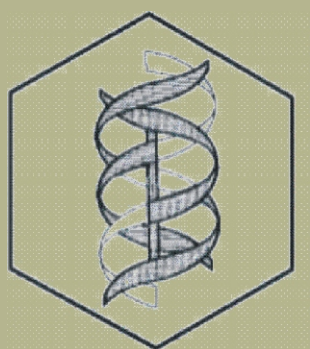


REB 2005

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. 24

No. 1

MARZO 2005

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

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GRACIELA MEZA RUIZ
Instituto de Fisiología Celular
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

ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Salvador Zubirán"

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS
Facultad de Ciencias Médicas
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ALMA LETICIA BORBOA OSUNA
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Sinaloa

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

EVA IRMA VEJAR RIVERA
Facultad de Química
Universidad de Sonora

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

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

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

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

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC.
Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de
Contenido: 8397 No. de expediente 1/432"2"/15792; Reserva al título en derecho de autor No. 04-2002-030616225500-102. Diseño: Ruth Carolina
Castañeda Cortes; Tiraje 750 ejemplares. Impresión: Departamento de Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM, Distribuidor: Servicio Postal
Mexicano, Reg. No. PP09-1001; UNAM-Depto. de Bioquímica y Facultad de Medicina.

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

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

EL FUTURO DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA Jorge Joel Reyes Méndez.....	1
---	---

ARTÍCULOS

LAS MAP KINASAS: ELEMENTOS DE SEÑALIZACIÓN EN LA DEFENSA DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS Mariana Saucedo García y Marina Gavilanes Ruíz	4
---	---

INTERFERENCIA MOLECULAR EN LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN NF- κ B POR BACTERIAS PATÓGENAS Javier Oviedo Boyso, Alejandra Ochoa Zarzoza, Joel E. López Meza, Juan J. Valdéz Alarcón y Víctor M. Baizabal Aguirre.....	12
---	----

LAS LECTINAS VEGETALES COMO MODELO DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-CARBOHIDRATO Pedro Hernández Cruz, Eduardo Pérez Campos, Lucía Martínez Martínez Blanca Ortiz y Gisela Martínez.....	21
---	----

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CONTROL METABÓLICO. ESTRATEGIA PARA INCREMENTAR EL FLUJO DE UNA VÍA METABÓLICA David G. Mendoza Cózatl.....	28
--	----

CRUCIBIOQ. MEMBRANAS Yolanda Saldaña Balmori.....	29
---	----

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO David G. Mendoza Cózatl.....	31
--	----

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ Yolanda Saldaña Balmori.....	33
---	----

CONVOCATORIAS

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....	34
--	----

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....	35
---	----

EDITORIAL

EL FUTURO DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Esta vez quiero comenzar este editorial, con dos aspectos que se relacionan con nuestra enseñanza pasada y presente, y con una visión de futuro. Durante el XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, el Doctor José Macarulla del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, dictó la conferencia: Los Textos de Bioquímica. En ella afirmó que los libros de texto de Bioquímica constituyen una herramienta insustituible y que los buenos libros ofrecen una visión ordenada, inteligible y meditada de toda la asignatura. A lo largo de la segunda mitad del siglo XX y ahora, a principios del XXI, aparecen unos hitos muy claros que definen su evolución histórica.

Antes de 1955 la Bioquímica se desarrollaba dentro de la Fisiología o la Química Orgánica. El libro clásico de Cantarow supuso la independencia respecto a esas disciplinas. En 1960, Karlson integra en una visión sinóptica la BQ Estructural con el Metabolismo. En 1970, el Lehninger se convierte en el paradigma de la modernidad: incluye problemas que obligan a profundizar en las materias estudiadas. Stryer, en 1975, introduce la policromía y la amenidad en los títulos de los epígrafes. Alberts y Darnell integran la Biología Molecular con la Celular. Rawn, con sus gafas, ofrece una visión tridimensional de las biomoléculas. En 1992, Smith y Wood aglutinan a múltiples autores para editar la colección titulada "Molecular and Cell Biochemistry". A finales del siglo XX el número de libros de esa materia crece exponencialmente. En 2002, Stryer desarrolla las verdaderas estructuras espaciales de numerosas macromoléculas y aborda con rigor la quiralidad de muchos metabolitos. También amplía los problemas habituales en otros textos con visiones estructurales, figuras en movimiento y diversos recursos multimedia: la Bioquímica ya está en la Red.

Finalmente recomendó lo que debe contener un buen libro: un 20% de material propio e inédito, un 40% de contenido clásico expuesto de forma didáctica, otro 20% de temas accesorios y un 20% de ejercicios prácticos o teóricos, problemas e incluso formulación de exámenes. Por otra parte, Seymour Papert asevera que: La cercanía del siglo XXI ha producido un coro de declaraciones que

dicen que la "sociedad de la información" demanda y posibilita nuevas formas de educación (1). Y podemos estar de acuerdo con lo expresado por este autor, pero no estoy de acuerdo en que el retraso en convertir estas declaraciones en acciones, se deba a factores como la falta de recursos, la tecnología, los estándares o el entrenamiento de los educadores. Obviamente existe una necesidad de mejoramiento en todas esas áreas, pero la principal ausencia es algo enteramente diferente - la falta de una visión intrépida, coherente, inspiradora pero realista, de lo que la educación puede llegar a ser en diez o veinte años- entendiendo por visión, una postura mental con dos características: aquella que rehusa a que se la limite por presunciones de que lo que ha sido, siempre será; y la que está dispuesta a realizar un trabajo arduo y hacer riguroso un gran esfuerzo mental para producir alternativas elaboradas.

El trabajo que requiere construir visiones enriquecidas y realistas, necesita condiciones que desafortunadamente son raras. Tales como: tiempo para pensar, comunidades de personas que piensen con un propósito común con las que se pueda compartir, formas diversas de conocimiento que alimenten el proceso de pensamiento y experiencias reales que lo mantengan bajo control.

Ya sabemos que no hay nada nuevo en la idea de que la educación va a sufrir un cambio radical con el surgimiento de las nuevas tecnologías que capacitan y de las nuevas necesidades que deben ser satisfechas. Los futuristas han estado diciendo esto en forma vaga durante muchos años, y los investigadores, como nosotros, hemos estado laborando para darle un contenido concreto a esta promesa abstracta. Además, debemos reconocer que para los sistemas educativos de los países en desarrollo, y en particular los latinoamericanos, todos estos avances tecnológicos implican grandes desafíos y grandes oportunidades.

Lo verdaderamente nuevo, es que por primera vez tenemos la posibilidad de que este cambio se ubica dentro del horizonte de tiempo de quienes planean la práctica de la educación. Por supuesto esto no implica que se espere que se implementen cambios radicales en la educación para el próximo año, pues con la clara excepción de los países ricos, para los demás la

tecnología no tiene todavía un precio que la haga accesible y de todas maneras siempre hay retrasos entre la planeación y la realización de un cambio profundo. Pero por primera vez se puede presentar un caso irrefutable de la urgencia de desarrollar la visión para un cambio muy grande. Si fracasamos en este empeño, el resultado será un desperdicio muy costoso de potencial humano y económico, en el futuro cercano y predecible. Podemos afirmar que el principal desafío para los ciudadanos del siglo XXI, es la exigencia de nuevas competencias, habilidades cuyo aprendizaje y desarrollo deben ser satisfechos por el sistema escolar. Concretamente en el caso de la enseñanza de la bioquímica y la biología molecular:

Considerables habilidades de manejo cuantitativo de los datos y de manejo preciso de la preparación de soluciones que posibiliten la repetibilidad de experimentos.

Entendimiento de los principios básicos de la química y la biología, así como de los conceptos fundamentales de la bioquímica y la biología molecular.

Estar atentos a los temas frontera en la disciplina. Capacidad para valorar de manera crítica artículos especializados.

Habilidad para diseñar experimentos y entender las limitaciones que el enfoque experimental tiene para ayudarnos a entender la realidad.

Capacidad para disectar un problema en sus partes clave.

Ser capaces de interpretar datos experimentales e identificar consistencias e inconsistencias en el análisis de los datos.

Poder diseñar experimentos reproducibles.

Capacidad para trabajar eficazmente y con seguridad en un laboratorio.

Administrar y utilizar adecuadamente los recursos, así como desarrollar la capacidad de trabajo colaborativo con otros investigadores.

Capacidad analítica y prospectiva para integrar y resolver problemas desde diferentes perspectivas (2).

Como sociedades estamos pasando de una época en la que contábamos con muy poca información, especialmente información escrita, a una en la que Internet nos ofrece un exceso de información de fácil acceso. En países avanzados, el desarrollo de una competencia en el manejo de la información es ya una tradición. Nuestros sistemas escolares deben comenzar a formar a sus estudiantes en el reconocimiento de la necesidad de información, en su búsqueda, en la evaluación de la calidad de la información obtenida y en su uso efectivo. Herbert Simon, ganador del Premio

Nobel de Economía, ha dicho: El significado de 'saber' ha cambiado de ser capaz de recordar y repetir información, a ser capaz de encontrarla y usarla.

La globalización de las comunicaciones, la economía y el comercio es una realidad difícilmente reversible. Eso exige para todos, cada vez con mayor apremio, comprender la interrelación política, cultural, económica entre los países y los pueblos. Y comprender también la diversidad de esos países y esos pueblos. Ese aprendizaje debe ser otro objetivo de la escuela latinoamericana.

Finalmente, el inglés es hoy el idioma de las ciencias, y es el segundo idioma de gran parte de la población educada del mundo. Además, se estima que más de las dos terceras partes de los contenidos de Internet están en Inglés. Es fundamental que nuestros sistemas educativos atiendan esta demanda para los ciudadanos del siglo XXI.

Entre las oportunidades que se abren con el uso de las tecnologías de la comunicación, tales como la Internet, está el fácil acceso al "World Wide Web", ese inmenso y creciente repositorio de conocimientos. Miles de escuelas y colegios que han tratado de cumplir su misión con bibliotecas y laboratorios precarios o inexistentes pueden, de pronto, y con inversiones muy bajas acceder a documentos, libros, revistas, enciclopedias, diccionarios y mapas en grandes cantidades; pueden también emplear laboratorios virtuales para diversos campos de las ciencias; y pueden organizar viajes virtuales a lugares lejanos o visitas a museos famosos de artes o de ciencias. Quizá la oportunidad más importante que ofrecen Internet y las llamadas tecnologías de la información y comunicación (TIC) a la educación es la de enriquecer los ambientes de aprendizaje. Los más recientes hallazgos de la investigación en pedagogía señalan que, para mayor efectividad, los ambientes de aprendizaje deben estar centrados en el Aprendizaje, en el Conocimiento, en la Evaluación y en la Comunidad. Las TIC facilitan el diseño y el uso de ese tipo de aprendizaje.

Sumado a lo anterior, debemos pensar también en cambiar nuestra forma de evaluar los conocimientos, no podemos hablar de la educación del futuro, con métodos de calificación que venimos utilizando en la educación desde hace siglos. Cuando fuimos formados, la educación se centraba en el conocimiento, ninguno pensaba en la purificación de las proteínas, de las cuales ignorábamos tanto su estructura como su función. Los profesores dictaban su cátedra, las tecnologías eran pensadas para su uso en el laboratorio y los estudiantes utilizaban exclusivamente libros de texto y ocasionalmente literatura original. Lo cual sucede en gran cantidad de centros educativos en la actualidad. La enseñanza basada en problemas (PBL) ha trazado rutas en la enseñanza médica y es quizás parte de la solución,

pero comúnmente se le utiliza desde el punto de vista estático de la asimilación e interpretación de hechos, y se le considera como parte de la educación para grupos especiales, en lugar de ser integrada en todo el currículum. Los exámenes siguen evaluando lo factual, lo cual ha contribuido enormemente a muchos de los problemas que afrontamos en nuestras escuelas y facultades.

Pero ¿cuáles son entonces los fundamentos que debe aprender el estudiante de bioquímica en la actualidad? Idealmente, al finalizar sus estudios, el estudiante de bioquímica en la licenciatura debe poseer las siguientes habilidades:

- Determinar los fundamentos de la estructura y función de las macromoléculas.
- Entender los modos de interacción macromolécula-ligando y los distintos enfoques en su estudio.
- Comprender los conceptos avanzados de biocatálisis.
- Dominar el entendimiento de la cinética enzimática y de inhibición.
- Saber los mecanismos básicos del control de los procesos y reacciones celulares.
- Dominar las técnicas de aislamiento y caracterización macromolecular.
- Utilizar bases de datos de secuencias y estructuras.
- Tener la capacidad de utilizar la química computacional y el modelado molecular.
- El uso de tecnologías como la clonación, PCR, mutagénesis dirigida, etc.
- Dominar el conocimiento de la estructura y compartimentalización celular y subcelular.
- Mecanismos básicos de la división celular y la síntesis de macromoléculas.
- Fundamentos de desarrollo y diferenciación de tejidos.
- Conocer las enfermedades genéticas.
- La evolución molecular y las diferencias entre organismos procariotes y eucariotes.

- Dominar los fundamentos de la inmunología celular y molecular, y conocer los ciclos de vida de los patógenos tales como virus, bacterias y protozoos.
- Fundamentos de la proteómica y la genómica (2).

En las próximas décadas debemos esperar equipos y sistemas de comunicación más poderosos, más rápidos y más económicos. Así mismo debemos esperar unos recursos mejores, más ricos y de más fácil acceso por Internet. Para satisfacer las nuevas demandas y para aprovechar mejor las grandes oportunidades, los sistemas educativos latinoamericanos deben enfrentarse responsablemente a las nuevas tecnologías.

Administradores y educadores deben prepararse para su comprensión y su utilización efectiva, y deben buscar el apoyo decidido de sus comunidades y de sus gobiernos locales y nacionales. Si este esfuerzo se enfoca particularmente en los sistemas públicos y en la educación de las poblaciones menos favorecidas, la educación cumplirá satisfactoriamente su propósito de cerrar brechas y ofrecer igualdad de oportunidades para todos.

Referencias:

1. Papert S y Caperton G (1999) Vision for Education: The Caperton-Papert Platform. Presentado en la 91st annual National Governors' Association meeting, celebrado en St. Louis, Missouri en agosto.
2. Bell E (2001) The future of education in the molecular life sciences. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:221-225.
3. Bransford JD (1998) Designing environments to reveal, support, and expand our children's potentials. En: *Perspectives on Fundamental Processes in Intellectual Functioning*. Vol. 1. Editor: Soraci SA y McIlvane W. Greenwich, CT: Ablex, pp 313350.

Jorge Joel Reyes Méndez
Departamento de Atención a la Salud,
UAM-Xochimilco

LAS MAP KINASAS: ELEMENTOS DE SEÑALIZACIÓN EN LA DEFENSA DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS*

MARIANA SAUCEDO GARCÍA Y MARINA GAVILANES RUÍZ

RESUMEN

Como todos los organismos eucarióticos, las células vegetales han desarrollado evolutivamente diversos sistemas de transducción de señales que les permiten responder de forma específica a los estímulos externos. Las cascadas de MAP kinasas (kinasas de proteína activadas por mitógenos) son frecuentemente empleadas en estos sistemas y se han asociado con diversos procesos fisiológicos y con diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos. En células de mamíferos y levaduras, las MAP kinasas son enzimas que se han subdividido de acuerdo a la especificidad por su sustrato y al estímulo extracelular que regula su actividad, mientras que en plantas no existe una co-relación que permita dividir a las MAP kinasas de forma análoga.

En este trabajo, se hace una revisión general de la función y conformación de las cascadas de MAP kinasas y de su participación y asociación en la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos.

PALABRAS CLAVE: MAP kinasas. Defensa contra patógenos. Plantas.

ABSTRACT

As all eukaryotic organisms, plant cells have developed signal transduction pathways to specifically react to environmental stimuli. MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinases) are frequently involved in these systems, associated to physiological processes and to responses to different biotic and abiotic stresses. In yeast and mammalian cells, MAP kinases have been classified according to their substrate specificity and the extracellular stimuli that regulate their activity, however, an analogous interrelation has not been found in plants. In this work, the function and configuration of the MAP kinase cascades is briefly reviewed, as well as the participation and association of these enzymes to the defense response of plants against pathogens.

KEY WORDS: MAP kinases, plant defense, pathogens

INTRODUCCIÓN

Los organismos han desarrollado mecanismos de comunicación complejos para coordinar las funciones de las células de un tejido con las de otro, las de las células del mismo tejido y de manera fundamental, para ajustar el funcionamiento del organismo con respecto a las condiciones ambientales externas. Por lo tanto, los mecanismos de comunicación son circuitos de información manejada y transmitida por moléculas con el objetivo final de producir cambios en el metabolismo acordes con el estímulo que desencadenó tal respuesta. Estos sistemas celulares de producción, reconocimiento, transmisión y procesamiento de una señal extracelular son los llamados sistemas de transducción de

señales.

Las MAP kinasas han sido muy estudiadas en levaduras y mamíferos, en donde su activación está asociada a respuestas de hipo e hiperosmolaridad, luz ultravioleta, agentes genotóxicos, mediadores inflamatorios, choque de calor y estiramiento mecánico; si bien, también están involucradas en la patogénesis de enfermedades como cáncer, diabetes, distrofia muscular, enfermedad de Parkinson y otros desórdenes neurológicos caracterizados por muerte celular anormal. Su participación a nivel molecular, se da en procesos de apoptosis, de transcripción, traducción y síntesis de ácidos nucleicos, en la dinámica del citoesqueleto y en la respuesta inmune (1).

Las cascadas de kinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP kinasas) son componentes frecuentes en la transducción de señales de células eucarióticas. Su principal función consiste en transducir los estímulos extracelulares reconocidos por los receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco que en relevo integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial (2).

I. MAP KINASAS: PROTEÍNAS KINASAS ESPECÍFICAS DURANTE LA SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Las cascadas de MAP kinasas están integradas por tres elementos consecutivos: MAPKKK (kinasa de la kinasa

* Recibido: 10 diciembre 2004 Aceptado: 19 enero 2005 (*Este número se ha impreso extemporáneamente*)

Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D. F. México
Teléfono: 5622 5275 Fax: 5622 5329 Correo-e: julieta_anairam@yahoo.com.mx, gavilan@servidor.unam.mx

de la MAP cinasa), MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) y MAPK (MAP cinasa); su secuencia indica el orden en el que los componentes se van activando consecutivamente mediante reacciones de fosforilación. Las MAPKKs no se encuentran asociadas directamente con el receptor membranar, necesitan activarse por componentes intermediarios cuya actividad sí puede depender de él, ejemplo de ellos son la cinasa de proteína C (PKC) y las proteínas de unión a GTP (proteínas-G) monoméricas y/o heterotriméricas (3), si bien estos elementos transductores pueden activarse por cross-talking. Los intermediarios que activan a las MAPKKs fosforilan residuos localizados en los sitios catalíticos de la MAP cinasa sustrato y que pueden corresponder a dominios homólogos de pleckstrina (secuencias con estructuras típicas que facilitan la interacción proteína-proteína o proteína-lípido), secuencias ricas en prolina involucradas en la unión a SH3, motivos de dedos de Zinc, cierres de leucina, secuencias de unión a proteínas G o los residuos de fosforilación Ser/Thr (3). Las MAPKKs así activadas fosforilan los residuos de Ser/Thr catalíticos de las MAPKKs, que se encuentran conservados entre los subdominios VII y VIII de su estructura primaria. Las MAPKKs finalmente activan al último miembro de la cascada fosforilando los residuos de Tyr y Thr localizados en la secuencia característica TxY, donde x representa a cualquier residuo (3). Una vez activada, la MAPK puede fosforilar directamente a proteínas que contengan al motivo fosfo-receptor Ser/Thr-Pro y regiones denominadas sitios de acoplamiento. La fosforilación del sustrato puede efectuarse tanto en el citoplasma como en el núcleo, pues muchos de sus blancos son factores o correguladores transcripcionales (Fig.1).

a) MAPKKs

Las estructuras primarias de las MAPKKs no están conservadas

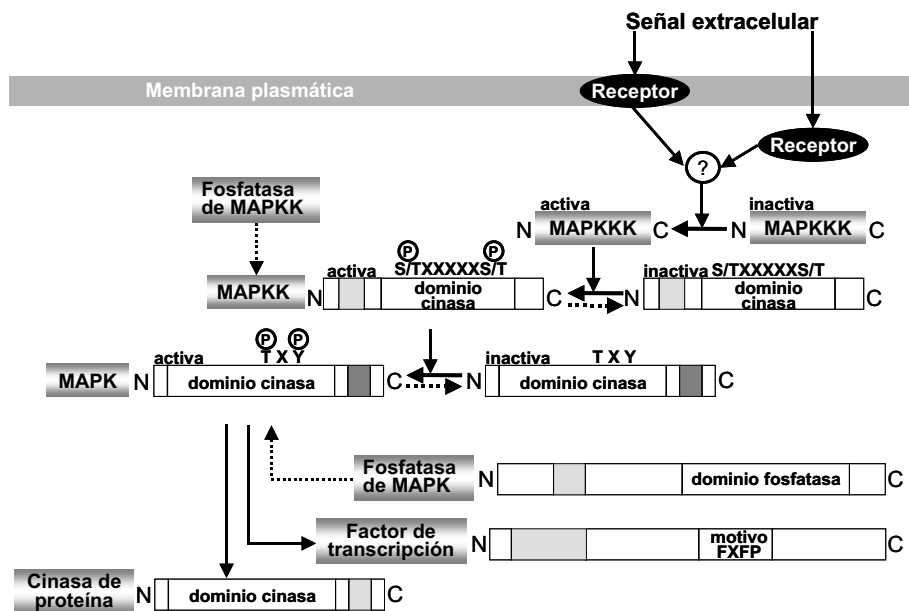


Figura. 1 Relación estructura-función de MAP cinasas y configuración de las cascadas de MAP cinasas en células animales. Cada MAP cinasa se representa como una barra segmentada con sus extremos amino (N) y carboxilo (C). Los segmentos sombreados indican los sitios de unión (CD, D) a las MAP cinasas corrientes arriba. También dentro de las barras se designan los dominios típicos de cinasas, de fosfatasa y de factores de transcripción (FXFP). Sobre la barra se indican los residuos fosforilables S (serina), T (treonina) y Y (tirosina) flanqueados por residuos variables (X). La señal extracelular percibida por un receptor membranar origina la activación de la cascada, en la que la MAPKKK es activada por un componente cuya actividad depende de un receptor membranar o de un receptor intracelular. La MAPKKK activada activa a la MAPKK corrientes abajo y ésta a su vez activa a la MAPK. La activación de la cascada requiere de varias reacciones río arriba como la activación de proteínas G, mientras que río abajo, la MAPK puede activar a otras cinasas de proteína, fosforilar componentes citoesqueléticos o trasladarse al núcleo para activar factores de transcripción que lleven a cabo la expresión de ciertos genes. La fosforilación de los miembros de la cascada puede ser reversible por la acción de fosfatasa de tipo Ser/Thr, Tyr o de doble especificidad.

entre sí. Su heterogeneidad estructural y la de sus dominios reguladores confieren una serie de características muy peculiares a las cascadas de MAP cinasas, como son la flexibilidad para responder a una gran variedad de estímulos y la capacidad de activar varias cascadas simultáneamente (3).

En células de mamíferos y levaduras, las MAPKKs se clasifican en cuatro grupos: MEKK/STE11, RAF, MLK y MOS; mientras que en plantas se reconocen al menos dos: A o PMEKKs, que tienen similitud a las MEKK/STE11, y los grupos B y C o PRAF cuyos componentes son similares a las RAF cinasas (2).

b) MAPKKs

Las MAPKKs se consideran proteínas con doble especificidad, pues además de ser activadas por una MAPKKK corrientes arriba, activan a una MAPK

corrientes abajo. Las MAPKKs poseen una especificidad muy limitada hacia su sustrato, pues únicamente se ha identificado a las MAPKs. Funcionan exclusivamente en una o dos cascadas distintas de MAP cinasas, por lo que se consideran puntos de convergencia que integran diferentes señales en una misma ruta (3).

En plantas se han identificado un total de 21 MAPKKs cuyas estructuras primarias difieren a las de mamíferos; su secuencia consenso en el sitio de fosforilación es S/TXXXXXS/T, mientras que en mamíferos es S/TXXXXS/T. Con respecto a las regiones N-terminal de las MAPKKs vegetales, éstas son muy similares a las de mamíferos, pues ambas presentan un sitio común denominado dominio D (de anclaje o Docking), que se une a las MAPKs. El dominio D consiste de una región definida por la secuencia

de residuos [KR][K/R][K/R]X(1-5)[L/I]XL/I (en donde X representa cualquier residuo y, R y K representan los residuos básicos indispensables para la interacción con las MAPKs. Los residuos básicos a su vez están flanqueados en un extremo por los residuos hidrofóbicos L o I) (2).

c) MAPKs

La activación de MAPKs requiere la fosforilación de los residuos de Thr y Tyr localizados entre los subdominios VII y VIII del núcleo catalítico; su estructura primaria, además de incluir esta región catalítica, posee un dominio CD (de anclaje común o Common Docking) cuya secuencia permite la unión con sus MAPKKs activadoras, con fosfatasa que las inactivan o bien, con los sustratos a los que fosforila, siendo todas éstas, interacciones excluyentes entre sí. Las interacciones electrostáticas que se establecen entre los residuos con carga de los sitios D y CD son fundamentales, pues el dominio CD contiene en su secuencia [LY][LHY]DXX[DE]XX[DE]EPXC, residuos ácidos (D y E) e hidrofóbicos (L, H y Y) que interaccionan con los residuos básicos (K y R) e hidrofóbicos (LXLXL) de las MAPKKs (2). La mayoría de las MAPKs tienen regiones N- y C-terminales cortas, ya que la mayor parte de su longitud lo ocupa el dominio catalítico que contiene aproximadamente 300 residuos (4).

En células de mamíferos y de levaduras se ha demostrado que la activación de las MAPKs en el citoplasma las puede trasladar hacia el núcleo donde activan factores de transcripción, o a otros sitios del citoplasma en que fosforilan enzimas específicas como cinasas de proteínas, fosfatasa, lipasas, o bien, componentes citoesqueléticos. En plantas únicamente se ha identificado un sustrato *in vivo* de las MAPKs, el cual es una proteína catalítica que interviene en la síntesis de etileno y que necesita de la fosforilación para incrementar su estabilidad (5).

Asimismo, con base a otras evidencias reportadas en plantas, se ha sugerido que las MAPKs participan en la activación de enzimas metabólicas, de otras cinasas y de factores de transcripción.

Las MAPKs de plantas comúnmente son denominadas PERK (Plant ERK) por su similitud a las MAPKs de la subfamilia ERK de mamíferos. Las PERKs se clasifican en dos subtipos: las que contienen un motivo TEY en el sitio de fosforilación y las que contienen un motivo TDY. En las MAPKs de plantas no se han identificado homólogos del motivo TGY, que se encuentra en las estructuras primarias de algunas MAPKs de levaduras y mamíferos ni del motivo TPY presente en éstos últimos (2).

En la actualidad no existe una nomenclatura definida para la clasificación de MAPKs vegetales; sin embargo, una propuesta ampliamente divulgada considera cuatro grupos denominados: A, B, C y D (2).

Las MAPKs de los grupos A, B y C contienen una secuencia TEY en el sitio catalítico, mientras que el D comprende la secuencia TDY (2). El análisis filogenético de las MAPKs propone un cambio evolutivo entre los grupos A, B y C, ya que los ortólogos de los grupos A y B contienen motivos CD muy conservados en su región C-terminal, a diferencia del motivo CD del grupo C el cual tiene una longitud mayor y su secuencia posiblemente determina la localización subcelular de este tipo de proteínas diferente a las MAPKs de los grupos A y B. Las MAPKs del grupo D no contienen el dominio CD (2).

II. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR MAPKs DE PLANTAS.

a) Respuestas de defensa de las plantas ante patógenos

Al igual que en la mayoría de los organismos animales, las plantas incurren en el estado de enfermedad como excepción durante su ciclo de vida y cuando la presentan, ésta generalmente se limita a una pequeña

parte del tejido vegetal, ya que las plantas han adquirido y desarrollado diversas defensas constitutivas e inducidas que previenen o evitan la propagación de bacterias, hongos, virus, invertebrados y otras especies de plantas (6).

En las interacciones planta-patógeno, ambos organismos desarrollan diversos mecanismos de defensa y de ataque, respectivamente y, dependiendo de la intensidad, temporalidad y mecanismos estratégicos, se establece la enfermedad o la resistencia en el sitio de infección de la planta hospedera y eventualmente, en toda la planta.

Las células vegetales atacadas por patógenos activan rápidamente una serie de mecanismos de defensa dirigidos a evitar el crecimiento y reproducción del agente invasor. Las principales reacciones que genera la planta son la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el incremento en el flujo de Ca^{2+} , la activación de cascadas de MAP cinasas y de genes de defensa y la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas como las fitoalexinas, o con capacidad de reforzar la estructura de la pared celular, como la callosa o la lignina. Cuando la activación de estas respuestas es suficiente para evitar el crecimiento y reproducción del patógeno en el sitio de penetración, se produce la respuesta de hipersensibilidad (HR), cuyo fenotipo característico es la muerte celular localizada en la región de invasión. Esta respuesta ocurre en la mayoría de las interacciones incompatibles que se establecen entre un patógeno avirulento y una planta resistente. De forma contraria, cuando la activación de las respuestas de defensa no logra detener el crecimiento y propagación del patógeno en el sitio de infección, se producen síntomas de enfermedad que durante su curso desarrollan la necrosis, que se inicia en el sitio de infección, pero que logra extenderse inclusive a la totalidad de la planta. Este tipo de interacción es de tipo compatible y se establece entre un patógeno virulento y una

planta susceptible (6).

En las interacciones incompatibles la planta puede percibir la presencia del invasor mediante dos mecanismos diferentes, que se describen a continuación:

1) *Modelo gen-por-gen*: Este modelo propone la interacción física entre un producto codificado por un gen de avirulencia (Avr) contenido en el genoma del patógeno y un producto codificado por un gen de resistencia (R) del genoma de la planta. Su asociación es altamente específica y complementaria tanto a nivel de la variedad de la planta como del patovar del patógeno, y generalmente produce una HR en la planta resistente (7). El mecanismo de interacción proteína-proteína está bien establecida para el gene *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* (bacteria que produce el manchado del jitomate) y el gene *Pto* del jitomate. Este último codifica a una cinasa Ser/Thr citosólica que reconoce específicamente a la proteína *AvrPto*, tras lo cual se activan múltiples respuestas de defensa.

2) *Reconocimiento de evocadores*: Ocurre cuando la planta detecta compuestos de naturaleza química muy diversa que son secretados por la planta o bien, por el invasor. Ejemplo de ellos son algunas proteínas, oligosacáridos, glicoproteínas y lípidos, los cuales se conocen como evocadores endógenos, si son secretados por la planta, o exógenos, si son secretados por los patógenos (7). Esta interacción, si bien produce resistencia, no es específica a nivel de subespecies entre genes específicos complementarios.

Por el contrario, las plantas que establecen una interacción de tipo compatible con el patógeno, no poseen el primer mecanismo mencionado anteriormente, por lo que no obedecen al modelo gen por gen; sin embargo, aunque pueden llegar a reconocer la presencia del invasor por la presencia de evocadores endógenos o exógenos, las respuestas de defensa

TABLA I

Especie vegetal/ Nombre específico de la MAP cinasa	ESTÍMULO	ESTÍMULO																		
		División celular	Auxina	Citocinina	Giberelina	Etileno	Frío	Sequía	Sal	Estrés hipoosmótico	Ozono	Contacto	Heridas	UV-B	Ácido salicílico	Ácido jasmónico	H ₂ O ₂	Ácido abscísico	Oxido nítrico	Evocadores
	Tipo de MAP cinasa																			
<i>Arabidopsis thaliana</i>																				
AtMPK1	MAPK																			
AtMPK2	"																			
AtMPK3	"																			
AtMPK4	"																			
AtMPK6	"																			
MEK1	MAPKK																			
CTR1	MAPKKK																			
EDR1	MAPKKK																			
ANP1,2,3	MAPKK																			
ATHK1	Cinasa de His																			
CKI1	"																			
CRE1	"																			
Familia ETR1	"																			
<i>Nicotiana tabacum</i>																				
NTF4	MAPK																			
NTF6	"																			
WIPK	"																			
SIPK	"																			
NPK1	MAPKK																			
<i>Medicago sativa</i>																				
MKK2	MAPK																			
MKK3	"																			
MKK4 (SAMK)	"																			
MSK7 (SIMK)	"																			
SIMKK	MAPKK																			
<i>Petroselinum crispum</i>																				
ERMK	MAPK																			
<i>Avena sativa</i>																				
ASMAP1	MAPK																			
<i>Zea mays</i>																				
ZmMPK5	MAPK																			
<i>Lycopersicon spp</i>																				
P48	MAPK																			
LeMPK1	MAPK																			
LeMPK2	MAPK																			
LeMPK3	MAPK																			
<i>Glycine max</i>																				
LAPK	MAPK																			
GmSIPK	MAPK																			
<i>Hordeum vulgare</i>																				
ERK1																				
<i>Oryza sativa</i>																				
OsMAPK5	MAPK																			
OsEDR1	MAPKKK																			

MAP cinasas de plantas inducidas por estímulos bióticos y abióticos. ■ Indica un cambio en la producción de los transcritos del gen de la MAPCinasa, de su actividad catalítica o de la manifestación fenotípica asociada a una mutación en el gen de la cinasa. ■ Indica que el estímulo no produce cambios en los mismos parámetros medidos (modificado de 8).

¹⁻⁴ Son fitohormonas

⁵ Nombre genérico que incluye moléculas específicas como proteínas u oligosacáridos

resultantes no son lo suficientemente intensas y persistentes para detener el crecimiento y reproducción del patógeno.

b) MAPKs en las respuestas de las plantas contra patógenos

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa que les permiten responder de forma rápida y eficaz a

los cambios que se presentan en su entorno. Si la inducción de estas respuestas es lo suficientemente intensa y persistente temporalmente, la planta se adapta a las modificaciones de su ambiente. Uno de los mecanismos que la planta emplea con frecuencia para activar la defensa, es la cascada de MAP cinasas, la cual se caracteriza por responder a una gran variedad de estímulos de tipo biótico y

abiótico, a hormonas y a procesos de división y desarrollo celular (2) (Tabla I).

i. MAP cinasas y su asociación con el patrón de defensa basado en la interacción gen por gen

Recientemente se ha identificado una gran cantidad de genes de resistencia (*R*) en plantas; no obstante, poco se sabe de la transducción de señales que se generan después del reconocimiento *R*/Avr. El único reporte que evidencia la activación de MAP cinasas seguida del reconocimiento entre los productos de los genes de *R* y *Avr*, fue publicado en 1999 por el grupo de investigadores dirigidos por Romeis (9), quienes demostraron que el producto de la expresión del transgen de resistencia *Cf-9* de *Lycopersicon peruvianum* en *Nicotiana tabacum* reconoce a su producto complementario de avirulencia (*Avr9*) para activar posteriormente a las MAPKs, SIPK (cinasa de proteína inducida por ácido salicílico) y WIPK (cinasa de proteína inducida por herida) (Tabla II). Estos resultados sugieren además, que la activación de cascadas de MAP cinasas seguida del reconocimiento *R*/Avr es un mecanismo universal en plantas.

ii. MAP cinasas y su asociación con el patrón de defensa basado en la acción de evocadores fúngicos y bacterianos

En la literatura se ha reportado la activación de algunos componentes de cascadas de MAP cinasas en plantas estimuladas con diferentes evocadores fúngicos y bacterianos, así como con algunas infecciones (Tablas II y III). Estas evidencias indican que las cascadas de MAP cinasas son fundamentales en la señalización que conduce a la activación de las respuestas de defensa (10) y sugieren además que las cascadas amplifican las señales con el objetivo de incrementar la inducción de la resistencia.

iii. MAP cinasas y su asociación con la acción del ácido salicílico

De manera simultánea al estudio de la activación de MAP cinasas por evocadores, se ha evaluado su activación inducida por diversas moléculas de señalización implicadas en la defensa de la planta ante patógenos (Tabla I), tales como el ácido salicílico (SA), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO), etileno

(ET) y ácido abscísico (ABA). De estas moléculas el más estudiado ha sido el SA, ya que en las interacciones planta-patógeno incompatibles: a) los niveles endógenos de SA se incrementan; b) el SA induce la expresión de diversos genes relacionados con la defensa y, c) probablemente el SA es la molécula de la que depende el establecimiento y mantenimiento de la Respuesta Sistémica Adquirida

TABLA II

Especie vegetal hospedera/estímulo	MAPK activada		
	^e SIPK	^f WIPK	^g 40 kDa
<i>Nicotiana tabacum</i>			
^a Evocador derivado de pared celular de <i>Phytophthora infestans</i> (PiE)			
^a Xilanasas (TvX), evocador fúngico producido por <i>Trichoderma viride</i>			
^a Evocador derivado de la pared celular de <i>Phytophthora parasitica</i>			
^a Criptogeína, evocador fúngico de <i>Phytophthora infestans</i>			
^a Parasiticeína			
^b Virus del Mosaico de Tabaco (TMV)			
^b Harpina, evocador bacteriano producido por <i>Erwinia amylovora</i>			
^a Evocadores de la pared celular de <i>Phytophthora parasitica</i>			
<i>Nicotiana tabacum</i> con el gen de resistencia <i>Cf-9</i> de jitomate			
^{a,b} Proteína Avr9 del hongo patógeno <i>Cladosporium fulvum</i>			
<i>Nicotiana benthamiana</i>			
^b Virus del Mosaico de Tabaco (TMV)			
<i>Medicago sativa</i>			
^a Evocador de levadura (YE)			
^a Quitina			
^a -glucana			
^a Ergosterol			
<i>Glycine max</i>			
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
^{a,b} Xilanasas (TvX)			
^{a,b} Ig22, péptido derivado de la flagelina, proteína flagelar bacteriana			
^{a,b} fragmentos pépticos (oligogalacturónidos)			
^{a,b} fragmentos de quitina			
^b <i>Pseudomonas syringae</i>			
^b <i>Peronospora parasitica</i>			
^{a,b} Harpina			
<i>Lycopersicon peruvianum</i>			
^a Sistemia			
^a Quitosano			
^a Glucano			
^a PGA (ácido poligalacturónico)			
<i>Oryza sativa</i>			
^c <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>			
^c <i>Magnaporthe grisea</i>			
<i>Petroselinum crispum</i>			
^d Pep-13, péptido derivado de <i>Phytophthora</i> spp.			

Evocadores o infecciones con patógenos que inducen la activación de MAPKs. ■ indica un cambio en la producción de los transcritos del gen de la MAP cinasa, de su actividad catalítica o de la manifestación fenotípica asociada a una mutación en el gen de la cinasa. ■ indica que se ha demostrado una asociación entre la activación de las MAPKs y la manifestación de reacciones de defensa en forma de respuesta de hipersensibilidad (HR).

El efecto fue determinado en: ^acélulas en suspensión, ^bhojas, ^craíz, ^dprotoplastos

^eSIPK, cinasa de proteína inducida por ácido salicílico

^fWIPK, cinasa de proteína inducida por herida

^g40 kDa, cinasa de proteína inducida por patógenos y con la masa molecular

^hSIMK, cinasa de proteína inducida por varios tipos de estrés incluyendo patógenos

ⁱSAMK, cinasa de proteína inducida por varios tipos de estrés incluyendo patógenos

TABLA III

Especie de la planta	Tipo de MAP cinasa	Nombre específico de la cinasa	Estímulo
<i>Nicotiana tabacum</i>	MAPKK	NtMEK2	^b Virus del Mosaico de Tabaco (TMV)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	MAPKKK	NPK-1	^b Virus del Mosaico de Tabaco (TMV)
	MAPKK	MEK1/NQK1	
<i>Petroselinum crispum</i>	MAPKK	PcMKK5	^c Pep-13, péptido derivado de <i>Phytophthora</i> spp.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAPKK	MKK4/MKK5	^{a,b} flg 22, péptido derivado de la flagelina, proteína flagelar bacteriana
	MAPKKK	MEKK1	

MAPKKs y MAPKKKs activadas por evocadores o infecciones con patógenos. ■ indica que se ha demostrado una asociación entre la activación de las MAPKs y la manifestación de reacciones de defensa en forma de respuesta de hipersensibilidad (HR).

El efecto fue determinado en: ^a células en suspensión, ^b hojas, ^c protoplastos

(SAR), la cual protege a todos los tejidos de la planta (11).

En al menos tres especies de plantas, se ha identificado al SA como inductor de la activación de MAPKs. Sin embargo sólo en dos de las especies (*Glycine max* y *Nicotiana tabacum*), el SA activa a las mismas MAPKs inducidas por diferentes evocadores o infecciones con patógenos. Estos resultados propusieron al SA como una señal activadora de las cascadas de MAP cinasas durante la defensa de la planta ante patógenos. Fueron Lebrun-García y colaboradores quienes demostraron en el 2002 (12), que la activación de la SIPK de *N. tabacum* inducida por criptogéina, era independiente del SA. Sin embargo, no se descarta una asociación indirecta entre ambos estímulos, ya que la acidificación citoplasmática y/o los eventos subsecuentes relacionados a ésta podrían estar actuando como señales secundarias que activan cascadas de MAP cinasas de forma similar a lo demostrado en células animales.

iv. MAP cinasas y su asociación con la HR

La HR es un mecanismo de defensa relacionado con la actividad de MAP cinasas. Este mecanismo se ha observado durante la mayoría de interacciones que involucran una resistencia raza-específica y en varios

casos de resistencia no hospedera. La inducción de la muerte celular después del reconocimiento del patógeno invasor resulta en la formación de una zona de células muertas alrededor del sitio de infección, su establecimiento requiere del metabolismo activo de la planta y depende de la maquinaria de transcripción y traducción del hospedero. Se ha planteado que la HR resulta: a) de la activación de un programa de muerte celular intrínseco que es codificado dentro del genoma de la planta, y b) de la activación de una vía de señalización. La HR se considera como un tipo de muerte celular programada y comparte algunas características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (13). La asociación entre la activación de MAP cinasas y la HR se sustenta en varios reportes de la literatura que relacionan la activación prolongada de MAPKs con la manifestación de la HR (Tablas II y III). El papel putativo de estas enzimas en la HR podría ser muy similar al reportado en células animales, donde las subfamilias SAPK/JNK y p38 participan en la apoptosis inducida por estrés (3).

v. MAP cinasas y su participación en la activación de genes de defensa

La activación de genes de defensa ha

sido un tema de gran interés en el estudio de las respuestas de las plantas ante patógenos. Los genes activados en respuesta a agentes invasores se clasifican utilizando inhibidores de síntesis de proteínas en: eventos transcripcionales inmediatos, tempranos y tardíos. Los transcritos inmediatos y tempranos incluyen a los factores de transcripción WRKY y los genes relacionados a patógenos (PR), respectivamente. Los factores de transcripción WRKY activan la expresión de genes que contienen dentro de su promotor a la caja-W, el cual es el elemento *cis* responsable de inducir la transcripción de varios genes de defensa correspondientes a glucanasas, quitinasas, osmotinas, lipooxigenasas y proteínas relacionadas con la SAR (14).

No existen evidencias en plantas sobre una fosforilación de factores de transcripción mediada directamente por MAPKs y que conduzca a la activación transcripcional de genes de defensa. Sin embargo, la inhibición o activación de MAP cinasas conduce a la modificación correspondiente de la expresión del gene *WRKY* por las cascadas de señalización conformadas en *Nicotiana tabacum* por el módulo de NtMEK2 y SIPK/WIPK (MAPKK y MAPK, respectivamente), en *Nicotiana benthamiana* la integrada por MEK1 y NTF6 (MAPKK y MAPK, respectivamente) y en *Arabidopsis thaliana* por MEK1, MKK4/MKK5 y MPK3/MPK6 (MAPKKK, MAPKK y MAPK respectivamente). Las cascadas de MAP cinasas que inducen la transcripción del factor WRKY son activadas por el TMV (virus del mosaico del tabaco), en las dos especies de *Nicotiana* y por el péptido flg-22, en *Arabidopsis thaliana* (14, 15, 16).

Otras evidencias que refuerzan la hipótesis de una asociación directa entre las MAPKs y los factores de transcripción se fundamenta en dos reportes que demuestran el transporte del citosol al núcleo de MAPKs activadas (17, 18). Estos resultados

proponen que durante las respuestas de defensa, se requiere de cambios dinámicos que transporten y acumulen MAPKs dentro del núcleo, pues en ese compartimento se encuentran algunos de los sustratos de MAPKs, incluyendo factores de transcripción que participan en el control de la expresión de genes.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las cascadas de MAP cinasas en plantas son un grupo de proteínas que responden a una gran variedad de estímulos. Particularmente en las interacciones planta-patógeno incompatibles, las MAP cinasas contribuyen al papel defensivo, pues existen evidencias que indican una asociación entre la inducción de su

actividad y la manifestación de distintas respuestas de defensa.

Aparentemente, una vez que reconoce al patógeno, la planta resistente requiere de la transducción de señales mediadas por MAP cinasas para expresar uno o más mecanismos de defensa. Sin embargo, la complejidad de los diferentes mecanismos de regulación tanto positivos como negativos, la convergencia de varias rutas de señalización en un punto común, así como la cinética y magnitud de la activación de MAP cinasas que inducen diferentes respuestas, limitan el entendimiento funcional y mecanístico de las cascadas en la señalización de defensa.

Para dilucidar la función y los mecanismos de las rutas de señalización en los cuales se incluyen a las

cascadas de MAP cinasas como parte de la defensa de la planta contra patógenos, se requiere la combinación de técnicas bioquímicas y moleculares, que permitan identificar y caracterizar a los receptores membranales, activadores de las cascadas de MAP cinasas, moléculas de andamiaje, reguladores negativos, sustratos de las MAPKs y los genes blanco de las cascadas de señalización que inducen las respuestas de defensa específicas.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo ha sido auspiciado por los proyectos 40311-Q (CONACYT, México) y CN-03-118 (UC-MEXUS, Universidad de California, EU y CONACYT, México).

REFERENCIAS

1. Yang S, Sharrocks A y Whitmarsh A (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320: 3-21.
2. Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B E, Morris P C, Innes R W, Ecker J R, Scheel D, Klessig D F, Machida Y, Munsy J, Ohashi Y y Walker J C (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301-308.
3. Meskiene I y Hirt H (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol* 42: 791-806.
4. Kültz D. (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* 46: 571-588.
5. Liu Y y Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 3386-3399.
6. Dangl J L, Dietrich R A y Richberg M H (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
7. Dangl J L y Jones J D G (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
8. Morris P C (2001) MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytologist* 151: 67-89.
9. Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig D F, Hirt H y Jones J D (1999) Rapid Avr-9 and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell* 11: 273-287.
10. Cardinale F, Jonak C, Ligterink W, Niehaus K, Boller T y Hirt H (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* 275: 36734-3674.
11. Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* 6: 365-371.
12. Lebrun-García A, Chiltz A, Gout E, Bligny R y Pugin A (2002) Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogin in tobacco cells. *Planta* 214: 792-797.

13. Suzuki K, Yano A y Shinshi H (1999) Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol* 119: 1465-1472.
14. Kim C Y y Zhang S (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J* 38: 142-151.
15. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann M R, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel F M y Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983.
16. Liu Y, Jin H, Yang K-Y, Kim C Y, Baker B y Zhang S (2003) Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling. *Plant J* 34: 149-160.
17. Cheong Y H, Moon B C, Kim J K, Kim M C, Kim I H, Park C Y, Kim J C, Park B O, Koo S C, Yoon H W, Chung W S, Lim C O, Lee S Y y Cho M J (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol* 132: 1961-1972.
18. Lee J, Rudd J J, Macioszeck V K y Scheel D (2004) Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (*PR*) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem* 279: 22440-22448.

INTERFERENCIA MOLECULAR EN LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE NF- B POR BACTERIAS PATÓGENAS*

JAVIER OVIEDO BOYSO, ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA,
JOEL E. LÓPEZ MEZA, JUAN J. VALDEZ ALARCÓN
Y VÍCTOR M. BAIZABAL AGUIRRE[†]

RESUMEN

La interacción entre bacterias patógenas y las células de mamífero (huésped) puede resultar en una infección, seguida de la inflamación del tejido y el establecimiento de una enfermedad. NF- B es un factor de transcripción pleiotrópico que desempeña una función central en la respuesta inmune innata y en la adquirida induciendo la expresión de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y reguladores de la apoptosis. La activación de NF- B ocurre en respuesta a patógenos virales y bacterianos, lo cual se asocia al desarrollo de la inmunidad protectora. Sin embargo, algunas bacterias pueden modular esta respuesta inmune al interferir con la regulación de NF- B, a nivel de su interacción con: la proteína inhibidora B (IB), co-activadores transcripcionales, el DNA o el complejo basal de transcripción.

PALABRAS CLAVE: Bacterias patógenas, NF- B, interferencia molecular, transducción de señales

ABSTRACT

The interaction between pathogenic bacteria and mammalian cells (host) may result in infection followed by tissue inflammation and disease development. NF- B is a pleiotropic transcription factor which function is crucial in the innate and adaptive immunity by inducing the expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and apoptosis regulators. NF- B activation occurs in response to viral and bacterial pathogens and it is associated with the development of protective immunity. However, some bacteria can modulate this immune response by interfering with the NF- B regulation at the level of its interaction with: the inhibitor protein B (IB), transcriptional co-activators, the DNA, and the basal transcriptional complex.

KEY WORDS: Pathogenic bacteria, NF- B, molecular interference, signal transduction

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune innata de los mamíferos [primera respuesta contra patógenos] es fundamental durante la etapa inicial de la defensa del huésped contra la infección por bacterias o virus, antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida antígeno-específica. Para sobrevivir dentro del ambiente hostil del huésped, las bacterias patógenas utilizan un conjunto de proteínas capaces de interferir con las rutas de transducción de señales, cuyo objetivo final es eliminar a los microorganismos.

Se han estudiado los mecanismos que emplean las bacterias patógenas para sobrevivir dentro del huésped y evitar que la respuesta inmune innata

y/o la adquirida las elimine. El balance entre la capacidad de los macrófagos para reconocer a los patógenos bacterianos y la habilidad del patógeno para modular las rutas de transducción de estas células determina con frecuencia el resultado final de una infección. Una de las rutas de transducción de señales más importantes en las respuestas inmunes innata y adquirida es la mediada por la activación del factor nuclear B (NF- B). La actividad de NF- B da como resultado la transcripción de genes que codifican citocinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmuno-receptores, otros factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, proteínas virales y regulado-

res de la apoptosis. Durante el curso de una infección causada por bacterias patógenas, la inhibición o activación de NF- B bloquea o induce, respectivamente, la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, las cuales tienen como función principal reclutar macrófagos y polimorfonucleares al sitio del daño tisular, para eliminar al invasor por fagocitosis.

Esta revisión integra el conocimiento sobre la importancia de NF-

B en la respuesta inmune de mamíferos y la modulación de su actividad transcripcional por diferentes bacterias patógenas. La primera parte se centra en la descripción de las moléculas que participan en la activación de NF- B, las rutas de transducción que

* Recibido: 29 de septiembre 2004 Aceptado: 17 febrero 2005 (*Este número se ha impreso extemporáneamente*)

[†]Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Apartado Postal 53, Administración Chapultepec, CP 58262, Morelia, Mich., México. Tel/Fax: (443) 295-80-29. Correo E: baizabal@zeus.umich.mx.

conducen a su activación y algunos aspectos de su regulación citoplásmica y nuclear; la segunda parte está dedicada a analizar los mecanismos moleculares que emplean ciertas bacterias para inhibir y otras para activar a NF- κ B.

PROTEÍNAS PARTICIPANTES EN LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Se ha demostrado en mamíferos la presencia de cinco genes NF- κ B/Rel denominados *NF B1*, *NF B2*, *RelA*, *RelB* y *c-Rel*, los cuales dan lugar a siete proteínas diferentes, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105), NF- κ B2 (p52 y su precursor p100), RelA (p65), RelB y c-Rel. Estas proteínas contienen una secuencia de 300 aminoácidos en la región amino-terminal llamada dominio homólogo a Rel (RHD). Se ha identificado también una secuencia de localización nuclear (NLS) en el RHD que les permite a estas proteínas translocarse y permanecer en el núcleo. RHD, además, es responsable de la unión específica al DNA, de la formación de homo- κ o heterodímeros y de la interacción con las proteínas inhibidoras B (I κ B) de NF- κ B/Rel. A diferencia de NF- κ B1 y NF- κ B2, las proteínas RelA, RelB y c-Rel contienen un dominio de activación de la transcripción (TAD) localizado en la región carboxilo-terminal. Las proteínas p105 y p100 contienen repetidos de ankirina, así como también regiones ricas en glicina (GRR). Los repetidos de ankirina son secuencias de 33 aminoácidos que actúan como sitios de interacción proteína-proteína, mientras que las GRR son importantes para el procesamiento postranscripcional de p105 a p50 y postraduccion de p100 a p52 (1). El heterodímero que con mayor frecuencia se detecta en una amplia variedad de tipos celulares y el más estudiado hasta ahora es el formado por p50 y RelA o p65. La expresión de RelB está restringida a regiones específicas del timo, de los nódulos linfáticos y de las placas de Peyer, mientras que c-Rel

sólo se ha detectado en células hematopoyéticas y linfocitos. Por lo tanto, de aquí en adelante, cuando se mencione a NF- κ B nos estaremos refiriendo al heterodímero p50/p65.

En una célula no estimulada, la translocación al núcleo de NF- κ B se encuentra inhibida por proteínas de la familia I κ B. Las I κ B están estructural y funcionalmente relacionadas entre sí y hasta ahora se han identificado cinco: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B δ , y Bcl-3. Una característica muy importante de estas proteínas es que presentan de 6 a 7 repetidos de ankirina, que funcionan como regiones de interacción específica con los RHD de las proteínas Rel e interfieren con la función del NLS. Las proteínas p105 y p100, precursoras de p50 y p52, respectivamente, también contienen repetidos de ankirina, por lo que funcionan en ciertos casos como I κ Bs, reteniendo a las proteínas Rel en el citoplasma. Al contrario de la función

de las I κ Bs, la función de Bcl-3 es diferente porque su interacción con homodímeros de p50 o p52 induce la expresión de genes regulados por NF- κ B (2).

RUTAS DE TRANSDUCCIÓN QUE ACTIVAN A NF- κ B

Se han identificado principalmente tres rutas de transducción, dependientes de la activación de proteínas receptoras, que promueven la translocación de NF- κ B del citoplasma al núcleo.

ACTIVACIÓN DE NF- κ B DEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T

La primer ruta que activa a NF- κ B, por medio del complejo IKK, está localizada exclusivamente en los linfocitos T e involucra al receptor de células T (TCR), a la proteína cinasa C (PKC) y a otras proteínas todavía no bien definidas como la guanilato

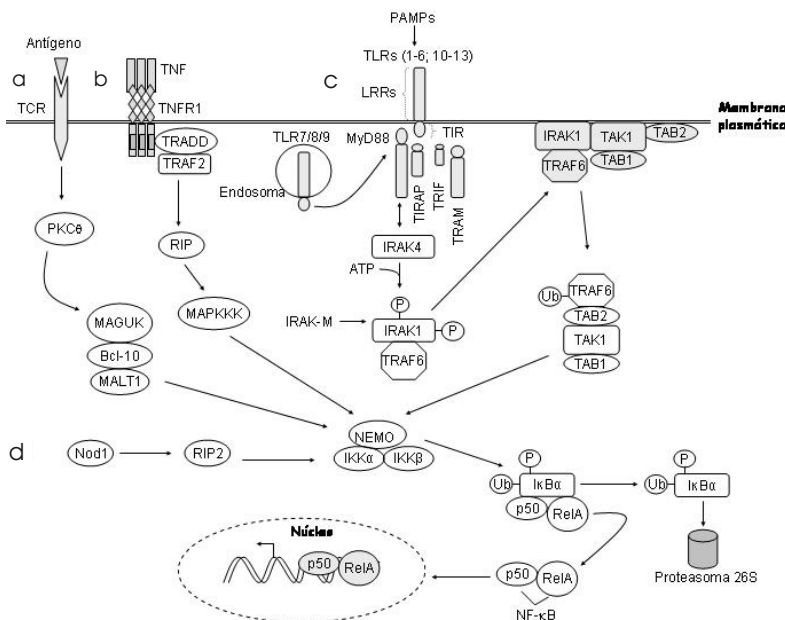


FIGURA 1. Rutas de transducción que activan a NF- κ B en mamíferos. a) En la activación de NF- κ B, que involucra a TCR, participan PKC y el complejo formado por MAGUK, Bcl-10 y MALT1. b) TNFR1 se trimeriza después de interactuar con TNF y recluta a TRADD y TRAF2. La proteína RIP y una MAPKKK tienen una función importante en la activación de NF- κ B por TNF. c) La activación de los TLRs por PAMPs causa el reclutamiento de MyD88 hacia el dominio TIR, promoviendo su interacción con IRAK4 que fosforila a IRAK1. IRAK1 entonces interactúa con TRAF6 y se forma un complejo con TAK1, TAB1 y TAB2 que se transloca a la membrana plasmática. En el citoplasma, TRAF6 se ubiquitina y se activa TAK1. d) Nod1 interactúa con RIP2, con lo que se forma el complejo RIP2-NEMO. Las tres rutas convergen en la fosforilación de I κ B, lo que favorece su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S. Este proceso deja libre a NF- κ B que se transloca al núcleo, donde activa la transcripción (Figura modificada de Ref. 5).

cinasa asociada a la membrana (MAGUK) y la proteína Bcl-10 asociada a la mucosa del tejido linfóide-1 (MALT-1) (Figura 1a).

ACTIVACIÓN DE NF- B DEPENDIENTE DEL RECEPTOR A TNF

En diversos tipos celulares, como los macrófagos, la segunda de estas rutas se activa por la interacción de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y la interleucina-1 (IL-1), con proteínas pertenecientes a la superfamilia de los receptores de TNF (TNFR) (Figura 1b). Cuando TNF se une a su receptor, causa su trimerización y el reclutamiento de la proteína asociada a TNFR vía el dominio de muerte (TRADD) que interactúa con la región citoplásmica de TNFR. Entonces TRADD interactúa con el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2). Las otras proteínas importantes en esta ruta, y que probablemente tienen un papel fundamental en la activación de NF- κ B, son la proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno 3 (MAPKKK3) y la proteína cinasa de serina/treonina asociada al receptor (RIP). Esto causa la activación de una cinasa específica de IB (IKK), la cual forma parte de un complejo formado por tres proteínas, IKK α , IKK β e IKK γ [también llamada modulador esencial de NF- κ B (NEMO)] con peso molecular de 700 a 900 kilodaltones. IKK α e IKK β catalizan la fosforilación de I κ B, mientras que NEMO sólo regula esta actividad y no tiene actividad intrínseca de cinasa (3).

ACTIVACIÓN DE NF- B DEPENDIENTE DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL

La tercera ruta de transducción se activa cuando las proteínas de las superfamilias de receptores tipo Toll (TLR)/IL-1R reconocen diferentes patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) (Figura 1c). Los receptores involucrados en la detec-

ción de estos PAMPs son los TLRs localizados tanto en la membrana celular como en la membrana endosomal y las proteínas citoplásmicas denominadas dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (Nod). Una amplia variedad de PAMPs son reconocidos por los TLRs; estas estructuras incluyen moléculas como flagelina, peptidoglucano, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, lipoarabinomano, lipopolisacárido (LPS), motivos no metilados CpG en el DNA bacteriano y RNA de cadena sencilla y doble. Los TLRs intracelulares y las proteínas Nod son capaces de interactuar principalmente con el peptidoglucano de microorganismos que han penetrado a la célula (4).

Los TLRs de mamíferos son proteínas homólogas al receptor Toll de *Drosophila melanogaster*, el cual participa en la diferenciación dorso-ventral y en la defensa contra infecciones por hongos en el insecto. Los TLRs forman una familia de trece miembros en mamíferos, aunque sólo del TLR1 al TLR10 se han identificado en los humanos (el TLR11 no está presente en humanos y el TLR10 no se encuentra en ratones). Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1, en cuyo dominio extracelular se localizan de 19 a 25 copias de motivos ricos en leucina (LRR) y una región citoplásmica que contiene el dominio conservado del gen *Toll/IL-1R* (TIR). Dentro del dominio TIR hay tres regiones conservadas con homología considerable entre los TLRs y cuya función es muy importante para la señalización. Los TLRs localizados en la superficie celular e involucrados en el reconocimiento de los productos microbianos son: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11. Los TLR7, TLR8 y TLR9 se han detectado en el interior de la célula (endosoma) y sus ligandos son el RNA de cadena sencilla rico en G+U (TLR7 y TLR8) y el DNA bacteriano (TLR9). Aunque la localización celular del TLR3 se desconoce, se ha confirmado que su ligando natural es el RNA de doble

cadena.

En la ruta de transducción iniciada por la interacción de TLRs con los PAMPs participan la proteína adaptadora de la respuesta de diferenciación primaria mieloide (MyD88), las cinasas asociadas a IL-1R (IRAKs), la cinasa activada 1 (TAK1) del factor de crecimiento transformante (TGF- β), las proteínas adaptadoras de unión 1 (TAB1) a TAK1, TAB2, TAB3 y el TRAF6 (Figura 1c). Cuando el receptor TLR/IL-1R ha sido estimulado, el primer paso en la ruta de transducción consiste en reclutar a MyD88 hacia el dominio TIR; esto promueve la interacción de IRAK4 con MyD88 y facilita la fosforilación de IRAK1, mediada por IRAK4, lo cual a su vez induce la actividad de cinasa de IRAK1. En esta etapa, IRAK1 se autofosforila, generando sitios de interacción para TRAF6. El dímero formado por IRAK1-TRAF6 (complejo I) se desliga del receptor y se desplaza a la membrana plasmática donde interactúa con el complejo II formado por TAK1-TAB1-TAB2 o TAB3. La interacción de los complejos I y II causa la fosforilación de TAB2/TAB3 y TAK1, que se translocan junto con TRAF6 y TAB1 al citoplasma. Este paso es importante porque da como resultado la activación de TAK1 (una MAPKKK) que ahora es capaz de fosforilar y activar a las IKKs. Se han identificado moléculas adicionales como la IRAK-M, que regula la actividad de IRAK cuando la ruta de NF- κ B es estimulada por la interacción de LPS con TLR4. Otra molécula que funciona en coordinación con MyD88 es la proteína adaptadora con dominio Toll/IL-1R (TIRAP) que es específica para mediar las respuestas iniciadas por la activación de TLR2 y TLR4. Además, existen rutas iniciadas por TLRs en las que MyD88 es reemplazada por proteínas como el factor Toll/IL-1R (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) que en conjunto actúan como co-adaptadores en la respuesta a TLR4 (5).

Los PAMPs también pueden ser

reconocidos en el citoplasma por Nod1 o Nod2; estas proteínas tienen una estructura que consta de un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y varios LRRs. Están muy relacionadas con los productos de genes R de plantas pertenecientes a la clase NBS-LRR. Cuando el péptidoglucano de bacterias es reconocido en el citoplasma por los LRRs de Nod1 o Nod2, estas moléculas interactúan con RIP2, mediante la región amino-terminal denominada dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), que entonces es capaz de interactuar con NEMO. La formación del complejo entre RIP2 y NEMO resulta en la activación de las cinasas IKKs y la fosforilación de I κ B, que es ubiquitinada y degradada en el proteasoma 26S. El resultado final es la liberación de NF- κ B y su translocación al núcleo (Figura 1d) (4, 6).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF- κ B EN EL CITOPLASMA

NF- κ B puede ser activado por diversos factores como citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, radiación ultravioleta (UV) y otros agentes que dañan al DNA, virus y bacterias. En la ruta clásica, la activación de NF- κ B involucra algún tipo de receptor (excepto por la radiación UV y el peróxido de hidrógeno) y puede ocurrir por fosforilación en sitios específicos de la región amino-terminal de I κ B por la IKK, previamente activada por IKK (Figura 2a). Una vez fosforilada, I κ B se ubiquitina para posteriormente ser degradada por el proteasoma 26S (Figura 1). Este proceso causa que NF- κ B se libere y pueda translocarse al núcleo, debido a que el motivo NLS de RelA queda expuesto. En la ruta considerada no-clásica, la activación se produce por la interacción de la linfotóxina beta (LT β), el factor activador de células B (BAFF) y CD40 con los receptores a TNF (Figura 2b). Estas moléculas activan selectivamente a la cinasa inductora

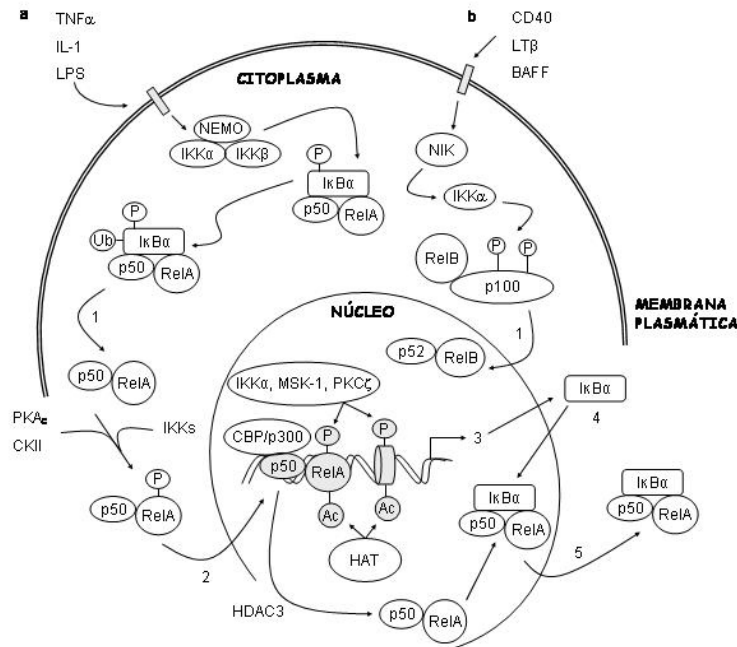


FIGURA 2. Regulación citoplásmica y nuclear de la actividad de NF- κ B. a) La activación de NF- κ B por TNF, IL-1 o LPS, activa a las cinasas de IB (IKK α , IKK β) que fosforilan a IB. IB se ubiquitina y es degradada por el proteasoma 26S (1). Después de que algunas cinasas fosforilan a RelA, NF- κ B se transloca al núcleo (2) para activar la expresión de genes. Uno de estos genes codifica a IB (3), la cual puede regresar al núcleo (4), asociarse con NF- κ B desacetilado por la HDAC3 y llevarlo de regreso al citoplasma (5), con lo que la transcripción termina. b) LT β , BAFF y CD40 interactúan con los receptores de TNF, activando a NIK e IKK, dando lugar a la fosforilación de p100, su ubiquitinación y degradación parcial por el proteasoma 26S para producir p52 (1). El heterodímero que se forma en esta vía y que se transloca al núcleo es p52/RelB. Dentro del núcleo, NF- κ B puede ser fosforilado por distintas cinasas como IKK, MSK-1 y PKC y acetilado por las HAT. La actividad transcripcional de NF- κ B puede incrementarse por la asociación con co-activadores (CBP/p300) y por cambios epigenéticos en la cromatina (Figura modificada de Ref. 7).

de NF- κ B (NIK) y al dímero IKK α /IKK β , lo cual resulta en la fosforilación de NF- κ B2 (p100); esto promueve la ubiquitinación y proteólisis parcial de p100 por el proteasoma 26S para producir p52. En esta ruta, el heterodímero formado que se transloca al núcleo es p52/RelB (2).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF- κ B EN EL NÚCLEO

La primera etapa en la activación de NF- κ B se desarrolla en el citoplasma y termina con su translocación al núcleo. Sin embargo, para adquirir su capacidad máxima como factor transcripcional, la subunidad RelA de NF- κ B debe ser fosforilada y acetilada (Figura 2). Tanto la región RHD como el TAD de RelA son sujetos de

fosforilación en el citoplasma por una amplia variedad de proteínas cinasas, como la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA $_c$), activada por LPS, que fosforila a la serina 276 (S276) de RHD. Cuando la célula es estimulada por IL-1 o TNF, se activan dos cinasas: la caseína cinasa II (CKII) y las IKKs que fosforilan las S529 y S536 de la región TAD. El RelA puede también ser fosforilado por la cinasa de la glucógeno sintasa-3 (gsk-3), la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI-3K), la cinasa Akt y la cinasa activadora de NF- κ B (NAK). Por otro lado, las cinasas activadas por mitógeno y estrés-1 (MSK-1) y la PKC ζ , las cuales son activadas por TNF, fosforilan en el núcleo a S276 y S311 de RHD, respectivamente. Se ha demostrado que la fosforilación de

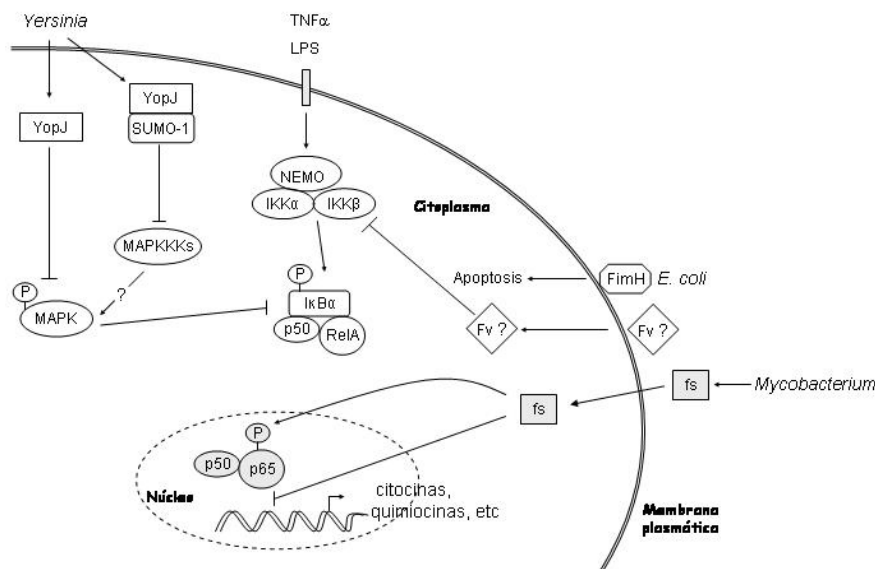


FIGURA 3. Factores bacterianos que inhiben a NF- κ B. *Yersinia pseudotuberculosis* (*Yersinia*) produce YopJ, la cual inactiva a una MAPK, bloqueando de esta manera la activación de IB. La interacción de YopJ de *Y. pestis* con SUMO-1 bloquea probablemente su conjugación con MAPKKKs. *Escherichia coli* (*E. coli*) produce la adhesina FimH que induce apoptosis y un factor de virulencia no identificado (Fv) que bloquea la translocación de NF- κ B al núcleo, inhibiendo la transcripción inducida por TNF o LPS. *Mycobacterium ulcerans* (*Mycobacterium*) produce un factor soluble (fs) que bloquea la unión de NF- κ B al DNA y altera su fosforilación.

RelA, catalizada por cualquiera de estas cinasas, aumenta la respuesta transcripcional. Por lo tanto, resulta evidente que la fosforilación de RelA debe estar estrictamente regulada, porque varios sitios localizados en estos dos dominios son blancos de cinasas distintas que pueden ser activadas por estímulos diferentes (7).

La acetilación de RelA en las lisinas 218, 221 y 310 (K218, K221 y K310) es catalizada por las histona acetiltransferasas (HAT). La acetilación de K221 incrementa la capacidad de RelA para unirse al DNA, mientras que la modificación de K310 se requiere para una máxima capacidad transcripcional. La interacción de RelA con I κ B es muy importante puesto que regula la duración de la respuesta transcripcional. Cuando RelA se encuentra acetilada en K218 y K221 su interacción con I κ B disminuye notablemente. Por consiguiente, RelA debe ser desacetilada por la histona desacetilasa 3

(HDAC3) para recuperar su afinidad por I κ B. Por otro lado, es importante mencionar que el I κ B recién sintetizado, por la acción transcripcional de NF- κ B, puede transitar del citoplasma al núcleo. En el núcleo, este I κ B puede ahora interactuar con NF- κ B desacetilado y restaurar sus niveles en el citoplasma, con lo que el sistema interrumpe la respuesta transcripcional y se prepara para un nuevo evento de estimulación. En resumen, la acetilación reversible de RelA es trascendental para modular la fuerza y duración de la respuesta mediada por NF- κ B. Algunos cambios epigenéticos en la cromatina también parecen modular la respuesta mediada por NF- κ B (Figura 2) (7).

A continuación se describen algunos de los mecanismos que emplean ciertas bacterias patógenas para modular la transcripción de genes regulados por NF- κ B. Las bacterias que activan a NF- κ B citadas

en esta revisión se seleccionaron porque su mecanismo se ha estudiado con más detalle, aunque se ha demostrado que las especies siguientes: *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bordetella pertussis*, *Bartonella henselae* y *Rickettsia rickettsii*, también causan activación de NF- κ B.

BACTERIAS QUE INHIBEN A NF- κ B

Yersinia. Este género incluye tres especies patógenas para roedores y humanos, *Y. pestis* que es el agente etiológico de la peste y *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* que causan síndromes gastrointestinales, linfadenitis y septicemia. Las tres especies contienen un plásmido de 70 kilobases (kb) con secuencias codificantes para un sistema de secreción tipo III y producen las proteínas Yop que penetran en la célula e interfieren con una variedad de rutas de transducción de señales. Por ejemplo, se ha demostrado que YopE destruye la estructura de los microfilamentos de actina y, junto con YopH (una proteína fosfatasa de tirosina) inhibe la fagocitosis y suprime el estrés oxidativo en macrófagos. YopJ de *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis* inhibe la activación por fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las cuales son clave para activar I κ B. Además, YopJ puede interactuar con la molécula pequeña modificadora tipo ubiquitina-1 (SUMO-1) y bloquear su conjugación con MAPKKKs. Aunque no se tiene evidencia de que SUMO-1 modifique a las MAPKKKs, la conjugación de SUMO-1 podría desempeñar alguna función en la ruta de señalización mediada por MAPKs (Figura 3, *Yersinia*) (8).

Escherichia coli. La mayoría de las infecciones del tracto urinario (ITU) se deben a infecciones ascendentes de la vejiga (cistitis) ocasionadas por cepas de *E. coli* uropatógena (ECUP) que expresan estructuras fibrosas (pili tipo 1) capaces de unirse

a proteínas manosiladas de la célula hospedera. En las ITUs se produce una excreción significativa de células uroteliales superficiales, dependiente de la expresión de pili 1 que contienen adhesina FimH intacta en la ECUP. Se ha reportado que algunas cepas de ECUP, carentes de pili 1 sobre la superficie, inhiben la respuesta inflamatoria urotelial al bloquear la translocación de NF- κ B al núcleo e inhibir la transcripción inducida por LPS o TNF. Por otro lado, se ha demostrado que la apoptosis de células uroteliales depende estrictamente de la interacción de pili 1 con la membrana de la célula hospedera y se propone que FimH es el mediador principal de esta respuesta. Con base en estas observaciones, el modelo actual para explicar la patogénesis de las ITUs es que la ECUP induce una respuesta apoptótica en las células uroteliales mediante el componente FimH de pili 1. Esta respuesta es más intensa debido a un factor de virulencia no identificado que inhibe la actividad de NF- κ B. El bloqueo de NF- κ B, ocasiona que la ECUP altere la expresión de citocinas pro-inflamatorias, lo que reduce la infiltración de neutrófilos y la fagocitosis del patógeno (Figura 3, *E. coli*) (10).

Mycobacterium ulcerans. Esta bacteria es el agente etiológico de la úlcera de Buruli, que representa la tercera infección micobacteriana más común, después de la tuberculosis y la lepra. A diferencia de otras micobacterias, *M. ulcerans* es una bacteria extracelular productora de un factor soluble (fs) que destruye los tejidos e induce supresión del sistema inmune al inhibir diversas actividades en monocitos y linfocitos T. Esta inmunosupresión aparentemente es la responsable de la persistencia de la bacteria en el sitio de la infección. Se ha demostrado que fs es un inhibidor potente de la producción de TNF e IL-10 en monocitos activados con LPS. Además, fs inhibe la activación de NF- κ B inducida por TNF, pero no tiene efecto sobre la degradación

de I κ B. Sin embargo, fs bloquea la unión de NF- κ B al DNA y posiblemente altera su fosforilación en el núcleo, lo cual sugiere la existencia de otras moléculas que controlan la función de este factor de transcripción (Figura 3, *Mycobacterium*) (9).

BACTERIAS QUE ACTIVAN A NF- κ B

Listeria monocytogenes. Es una bacteria intracelular responsable de causar abortos, así como de padecimientos severos en humanos como meningitis, septicemia y peritonitis. Es capaz de invadir y sobrevivir en la mayoría de las células del huésped, incluyendo células epiteliales, endoteliales, hepatocitos, fibroblastos y macrófagos. El primer paso para la internalización de *L. monocytogenes* es su adhesión a la membrana celular. Una vez que la bacteria se ha internalizado, libera sustancias capaces de romper la membrana del fagosoma y queda libre en el citoplasma. A partir de este momento, el daño que provoca la bacteria depende del tipo de factor de virulencia que produce. Se han identificado varios factores de virulencia de naturaleza proteica secretados por *L. monocytogenes*, denominados listeriolisina O (LLO), internalina A (InlA) e internalina B (InlB). La evidencia indica que LLO actúa como un potente estímulo inflamatorio en células endoteliales durante el proceso de infección. Además, LLO induce la expresión de adhesinas (i.e. ICAM-1, E-selectina), quimiocinas (IL-8) y la activación de NF- κ B dependiente de la presencia del receptor I a IL-1 (IL-1RI), pero no dependiente de la cisteinil-aspartil proteasa 1 (caspasa-1), ni de la participación directa de IL-1 o IL-1. Aunque se requiere un IL-1RI íntegro, la activación de NF- κ B por LLO no requiere de la intervención de MyD88 o IRAK. Estos datos indican que LLO no interfiere con la ruta de transducción clásica activada por IL-1; no obstante, la actividad de LLO necesita estrictamente la degradación

de I κ B (Figura 4, *Listeria*) (11).

InlB activa a NF- κ B mediante un mecanismo diferente a LLO. Se ha demostrado que InlB es importante en la interacción de *L. monocytogenes* con la membrana celular. Además, aparentemente utiliza la proteína G monomérica Ras para activar a PI-3K y ésta a su vez a la proteína cinasa Akt, las cuales inducen la activación de NF- κ B. PI-3K es importante en el proceso de internalización de la bacteria, el cual probablemente también depende de la intervención de Ras. La evidencia reciente indica que Akt fosforila y activa IKK, la cual a su vez fosforila I κ B, lo que resulta en la translocación de NF- κ B al núcleo. InlB promueve también una respuesta anti-apoptótica mediada por Akt que inactiva proteínas pro-apoptóticas del tipo Bad y procaspasas (Figura 4, *Listeria*). Al parecer esta acción de InlB es necesaria para la sobrevivencia intracelular de la bacteria (12).

Mycobacterium bovis. La ruta de transducción principal que da lugar a la activación de NF- κ B por micobacterias involucra la interacción de lipoproteínas, lipoarabinomano y peptidoglucano con TLR2 y la participación secuencial de MyD88, IRAK, TRAF6 y NIK. La activación de IKK e IKK por NIK resulta en la fosforilación de I κ Bs, su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S, lo que libera a NF- κ B para translocarse al núcleo e iniciar el proceso de transcripción. En particular, la activación de NF- κ B por *M. bovis* involucra la participación de PI-3K/Akt y las MAPKs JNK y p38. El efecto de estas cinasas aparentemente está mediado por el reclutamiento de CBP/p300, que funciona como co-activador esencial de NF- κ B (Figura 4, *M. bovis*) (13).

Neisseria gonorrhoeae. La gonorrea es una infección de transmisión sexual de importancia mundial que no suele causar síntomas; se localiza generalmente en el tracto genital inferior, donde en la mayoría

de los casos se manifiesta como uretritis en el hombre y cervicitis en la mujer. En las etapas iniciales, *N. gonorrhoeae* interactúa con células epiteliales de la mucosa e induce la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias como IL-6 e IL-8. Esto causa que las células fagocíticas, como los polimorfonucleares y los macrófagos, migren al sitio de la infección para eliminar al patógeno. En un reporte reciente se demostró que una lipoproteína de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*, denominada Lip, estimula la producción de IL-6 e IL-8, dependiente de la activación de NF- κ B en células epiteliales endocervicales de humano. Además, se tiene evidencia de que Lip triacilado en la región amino-terminal interactúa con TLR1 y TLR2 (Figura 4, *Neisseria*) (14).

Shigella flexneri. La mayoría de los individuos infectados con esta bacteria desarrollan una sintomatología que consiste en diarrea sanguinolenta, fiebre y problemas estomacales severos 1 ó 2 días después de su exposición al microorganismo. La shigelosis se puede tratar con antibióticos, por lo que el paciente se recupera en un lapso de 5 a 7 días. Un porcentaje muy bajo de individuos, genéticamente predispuestos (~3%) que han sufrido la infección con *S. flexneri* desarrollan el síndrome de Reiter que incluye artralgias, irritación ocular y dolor localizado al orinar. Es interesante señalar que las células epiteliales son refractarias a LPS, por lo que sólo las cepas de *S. flexneri*, capaces de penetrar al citoplasma de estas células inducen la activación de NF- κ B y un incremento en la actividad de JNK. Esto significa que el LPS de la cepa de *S. flexneri* invasiva debe ser reconocido por una molécula receptora intracelular independiente de TLR/IL-1. Este receptor intracelular es Nod1, el cual se oligomeriza al interactuar su dominio LRR con el LPS liberado por *S. flexneri* y activa, por medio de su dominio CARD, tanto a NF- κ B como a JNK. El Nod1 multimérico ahora es

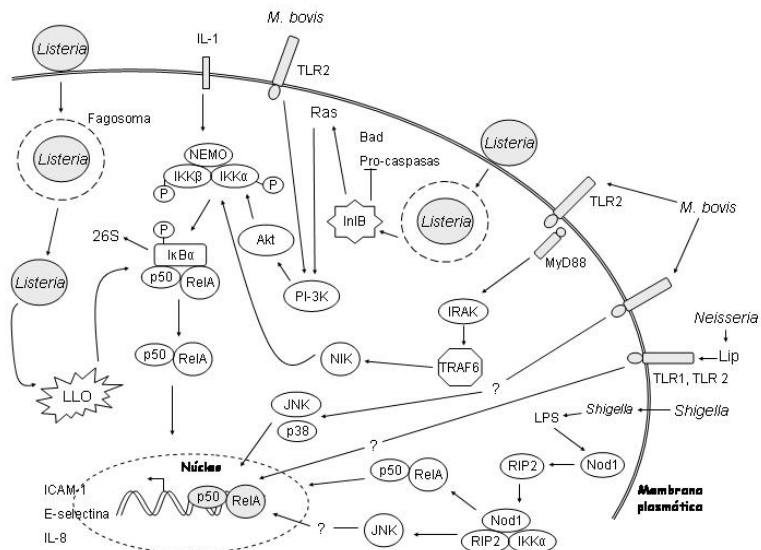


FIGURA 4. Factores bacterianos que activan a NF- κ B. *Listeria monocytogenes* (*Listeria*) libera listeriolisina O (LLO) la cual induce NF- κ B después de la degradación de IB, activando la expresión de adhesinas (ICAM-1, E-selectina) y quimiocinas (IL-8). *Listeria* produce también internalina B (InIB) que activa, mediante la proteína Ras, a PI-3K y a la proteína cinasa Akt. Ésta última fosforila y activa a IKK, la cual a su vez fosforila a IB, dando como resultado la translocación de NF- κ B al núcleo. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) interactúa con TLR2, lo que recluta a MyD88, IRAK y TRAF6. NIK activa a las IKKs, lo que resulta en la fosforilación de IB promoviendo su degradación por el proteasoma 26S. *M. bovis* también puede activar a PI-3K y a Akt que activa a JNK y p38. *Neisseria gonorrhoeae* (*Neisseria*) produce la lipoproteína Lip que interactúa con TLR1 y TLR2 para estimular la producción de IL-6 e IL-8, dependiente de NF- κ B. *Shigella flexneri* (*Shigella*) invasiva libera en el citoplasma LPS, el cual es reconocido por Nod1, con lo que se forma el complejo Nod1-RIP2-IKK, activándose la translocación de NF- κ B al núcleo y la ruta de transducción mediada por JNK.

capaz de interactuar con RIP2, que a su vez recluta a IKK, con lo que se forma el complejo Nod1-RIP2-IKK, activando la translocación de NF- κ B al núcleo y la ruta de transducción mediada por JNK (Figura 4, *Shigella*) (15).

CONSIDERACIONES FINALES

Las rutas de transducción de señales que convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B son importantes porque permiten a las células de los mamíferos desarrollar las respuestas inmunes innata y adquirida contra microorganismos patógenos. NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma asociado a I κ B; cuando algún estímulo induce la fosforilación de I κ B, esta proteína se ubiquitina y finalmente se procesa en el proteasoma 26S. Este mecanismo libera y expone los motivos NLS de

NF- κ B, el cual se transloca al núcleo para unirse a secuencias consenso B presentes en el DNA e iniciar la transcripción con la ayuda de co-activadores como CBP/p300. Algunas estructuras de la pared y/o ciertos factores de virulencia solubles de bacterias patógenas pueden activar o inhibir una reacción inflamatoria, debido a su potencialidad para activar o bloquear a NF- κ B, respectivamente. Es interesante que el número de bacterias que activan a NF- κ B y promueven una reacción inflamatoria sea mayor al de bacterias que lo inhiben. Es probable que las bacterias patógenas equipadas para sobrevivir dentro de los macrófagos u otro tipo de células como las epiteliales o endoteliales sean capaces de exacerbar la respuesta inflamatoria y reclutar más células hospedadoras potenciales al sitio de infección. La activación de NF- κ B por estas bacterias induce

también un mecanismo anti-apoptótico que prolonga la vida de la célula, representando esto una ventaja para su sobrevivencia intracelular y su posible diseminación, dentro de los macrófagos, a otros lugares del organismo. En contraste, la inhibición de NF- κ B da lugar a una liberación reducida de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF y, en algunos casos, a un aumento en la apoptosis de la célula huésped; ambos fenómenos podrían ser de utilidad a la bacteria para evitar la respuesta inmune, aunque la desventaja sería que este mecanismo no les permitiría

colonizar otros tejidos del organismo. La participación de los factores de transcripción NF- κ B/Rel en la inflamación y en enfermedades en el humano, los coloca como moléculas importantes para el diseño de fármacos que modifiquen su actividad transcripcional. El conocimiento de las bases moleculares de la respuesta al ataque de los microorganismos, de los procesos de inflamación y de la sepsis son los desafíos más trascendentes que probablemente serán resueltos con los avances en el estudio a nivel molecular de la inmunidad innata. Los resultados que se obten-

gan, seguramente tendrán como consecuencia una mejoría en el estado de salud del ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Carlos Cervantes Vega por sus comentarios. A la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH por el apoyo para realizar este trabajo mediante el proyecto 14.4-2004. JOB recibe beca para estudios de doctorado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

REFERENCIAS

1. Ghosh S, May M J y Kopp E B (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.
2. Karin M y Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-663.
3. Bonizzi G y Karin M (2004) The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25: 280-288.
4. Athman R y Philpott D (2004) Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 7: 25-32.
5. Akira S y Takeda K (2004) Toll-like receptor signaling. *Nature Rev Immunol* 4: 499-511.
6. Rosenberger C M y Finlay B B (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophages signalling by bacterial pathogens. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 385-396.
7. Chen L F y Greene W C (2004) Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 392-401.
8. Orth K, Palmer L E, Bao Z Q, Stewart S, Rudolph A E, Bliska J B y Dixon J E (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290: 1594-1597.
9. Pahlevan A A, Wright D J M, Andrews C, George K M, Small P L C y Foxwell B M (1999) The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF- κ B function. *J Immunol* 163: 3928-3935.
10. Klumpp D J, Weiser A C, Sengupta S, Forrestal S G, Batler R A, y Schaeffer A J (2001) Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF- κ B. *Infect Immun* 69: 6689-6695.
11. Kayal S, Lilienbaum A, Join-Lambert O, Li X, Israël A y Berche P (2002) Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF- κ B signalling by activating the IB kinase complex. *Mol Microbiol* 44: 1407-1419.
12. Mansell A, Khelef N, Cossart P, y O'Neill L A J (2001) Internalin B activates nuclear factor- κ B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol Chem* 276: 43597-43603.
13. Darieva Z, Lasunskaja E B, Campos M N N, Kipnis T L y da Silva W D (2004) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and c-Jun-N-terminal kinase cascades enhances NF- κ B-dependent gene transcription in BCG-stimulated macrophages through promotion of p65/p300 binding. *J Leukoc Biol* 75: 689-697.
14. Fiset P L, Ram S, Andersen J M, Guo W e

Ingalls R R (2003) The Lip lipoprotein from *Neisseria gonorrhoeae* stimulates cytokine release and NF- B activation in epithelial cells in a Toll-like receptor 2-dependent manner. *J Biol Chem* 278: 46252-46260.

15. Girardin S E, Tournebize R, Mavris M, Page A L, Li X, Stark G R, Bertin J, DiStefano P S, Yaniv M, Sansonetti P J y Philpott D J (2001) CARD4/Nod1 mediates NF- B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2: 736-742.

LAS LECTINAS VEGETALES COMO MODELO DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-CARBOHIDRATO*

PEDRO HERNÁNDEZ CRUZ¹, EDUARDO PÉREZ CAMPOS¹,
LUCIA MARTÍNEZ MARTÍNEZ¹, BLANCA ORTIZ² Y GISELA MARTÍNEZ³

RESUMEN

Las lectinas vegetales son un grupo variado de proteínas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en plantas, animales y organismos inferiores. Las lectinas, especialmente las vegetales, se han utilizado ampliamente en la purificación de receptores celulares glicosilados. Las lectinas son capaces de reconocer carbohidratos con una alta especificidad, lo que ha permitido su utilización como modelos para estudiar la interacción carbohidrato-proteína. En esta revisión se presenta una visión general sobre las características estructurales de las lectinas y la forma en la que interaccionan con los carbohidratos presentes en las células.

PALABRAS CLAVE: Carbohidrato, mecanismos moleculares, receptores de membrana, lectinas.

ABSTRACT

Plant lectins are a large group of carbohydrate binding proteins which are widely found in nature including plants, animals and lower organisms. Lectins, especially those from plants, have been widely used to isolate carbohydrate receptors from cells. Lectins are capable to recognize cell-surface carbohydrates with high specificity; it has allowed their use as models to study the interaction carbohydrate-protein. This review presents a general view on the structural characteristics of lectins and the form in which they interact with cell-surface carbohydrates

KEY WORDS: Carbohydrate, molecular mechanisms, receptors of membrane, lectins.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos, constituyen una de las familias de macromoléculas de origen biológico más diversas y abundantes. Están implicados en numerosos procesos bioquímicos como la adhesión celular, la transferencia de información y en la respuesta inmune, entre otras funciones. Los monosacáridos representan una fuente de energía, mientras que los polisacáridos se encuentran formando parte de la pared celular de plantas y bacterias. El estudio de los oligosacáridos, que son cadenas cortas de monosacáridos, unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos, se encuentran formando parte de glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares, donde juegan un papel importante en el funcionamiento celular, al participar en

procesos biológicos como: el tráfico de proteínas, interacciones ligando-receptor, el desarrollo de cáncer entre otros, en donde la interacción carbohidrato-proteína puede ser de vital importancia para el funcionamiento celular. El estudio de las interacciones carbohidrato-proteína, ha originado la creación de nuevas disciplinas como la glicobiología, ciencia que se encarga del estudio de la estructura y función de los carbohidratos (1). El desarrollo de técnicas encaminadas a la detección, liberación, separación y análisis de los oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos ha permitido el desarrollo de modelos para estudiar las bases moleculares de la interacción carbohidrato-proteína (2).

Estas porciones glicánicas pueden ser reconocidas específicamente por

lectinas (Tabla I) (3), que son empleadas en el estudio de la interacción carbohidrato-proteína, dada su gran disponibilidad.

LECTINAS

El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados; las lectinas poseen por lo menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células, aunque en la actualidad el término de lectina se ha aplicado a proteínas con un solo sitio de reconocimiento a carbohidrato como es el caso de las selectinas. Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune.

* Recibido: 20 enero 2005 Aceptado: 14 marzo 2005 (*Este número se ha impreso extemporáneamente*)

1 Laboratorio de Glicobiología Estructural y Funcional. Centro de Investigaciones en Ciencias Médicas y Biológicas. Facultad de Medicina. UABJO Oaxaca, Méx. C.P. 68020 Tel y Fax: 951 513 9784 correo pedro@bq.unam.mx

²Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Tlalpan, 14080 DF, México.

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. gisela@bq.unam.mx

Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como en vertebrados superiores. Aunque varias de estas proteínas poseen especificidad por estructuras sacarídicas semejantes, presentan actividades biológicas diversas, como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies, la estimulación mitogénica de linfocitos e inhibición de la fagocitosis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido (2, 3).

Las lectinas vegetales pueden tener diversas funciones: participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de plantas de leguminosas, poseen actividad mitogénica, pueden tener efectos protectores en contra de la acción patogénica de ciertos microorganismos como es el caso de los nemátodos herbívoros. En diversas especies animales se han reportado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, células tumorales y microorganismos, mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica. Las lectinas también participan en procesos de reconocimiento que permiten la diferenciación celular, la organogénesis, la migración de linfocitos y como factores determinantes en la metástasis (4, 5, 6, 7).

ESTRUCTURA MOLECULAR DE LECTINAS VEGETALES.

Las lectinas vegetales se caracterizan

por reconocer específicamente carbohidratos por enlaces tipo puente de hidrógeno, iones, interacciones hidrófobas entre otras. Las lectinas presentan una baja afinidad hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen, debido a esta característica se les utiliza en cromatografía de afinidad para purificar receptores celulares, donde un exceso de monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante, permite la liberación del receptor. Estructuralmente existen características comunes entre las lectinas de una familia determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina-carbohidrato. Las lectinas vegetales suelen clasificarse de varias maneras, por ejemplo: la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante (Tabla 1) y hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen, clasificándolas en lectinas que reconocen N-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetil-glucosamina y lectinas que reconocen a los O-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetil-galactosamina. Actualmente debido a la gran cantidad de datos cristalográficos de lectinas vegetales, se ha propuesto, una nueva clasificación de

lectinas vegetales con base en su estructura molecular (8), la cual tiende a reemplazar a la clasificación basada en la especificidad y en la cual podemos distinguir seis familias de lectinas (Fig.1):

1.- Lectinas aisladas de leguminosas. Es la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} .

Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo (Fig. 1-1), cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos (8).

2.-Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina. Los miembros de esta familia generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteínas contrariamente a las lectinas de leguminosas. Una subunidad esta constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuros, lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de

TABLA I

Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos		
MONOSACARIDO	LECTINA	ABREVIATURA
α -D-manosa, α -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i> .	ConA
	<i>Lens culinaris</i> .	LCA
β -galactosa,	.	.
N-acetil- α -D-galactosamina	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil- β -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i> .	WGA
α -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i> .	LTA
	<i>Ulex europeus</i> .	UEA
α -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i> .	LPA

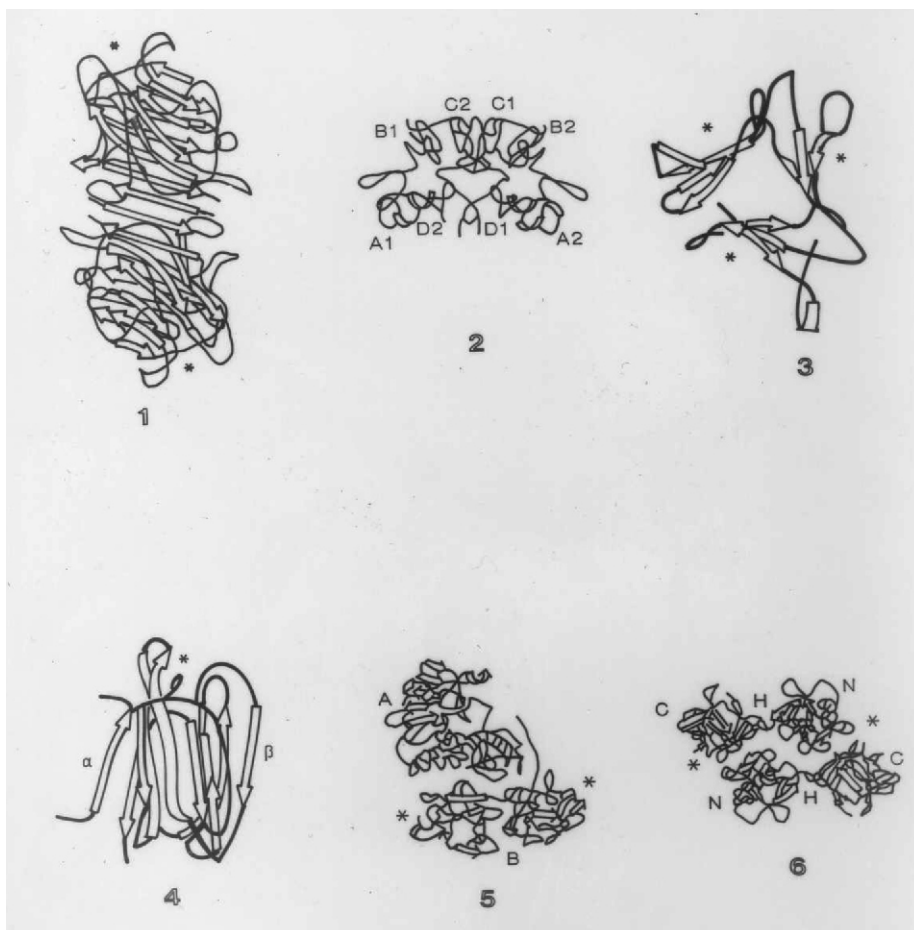


FIGURA 1. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales. Lectinas aisladas de leguminosas (1), lectinas con dominio tipo heveína, en donde cada uno de los dominios son representados con letras de la A-D, mismos que tienen un sitio de reconocimiento a carbohidrato (2), lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa (3), lectinas con estructura tipo prisma β (4), lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas (5), Lectinas tipo Amaranto (6). Sitio de unión al carbohidrato (*). Modificado de ref. 9.

una pequeña α hélice de cinco residuos, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, que no necesita la presencia de iones metálicos (Fig. 1-2) (8).

3.-Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa. A este grupo de lectinas pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas lectinas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparalelas unidas entre sí por giros (Fig. 1-3). El conjunto se asocia de

manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central (8).

4.-Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina. En este grupo, se encuentran lectinas vegetales, que presentan estructuras tridimensionales muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Fig. 1-4) (8).

5.-Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas. Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos. Su estructura molecular

es compleja. Están constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena B, posee la actividad de lectina. La cadena B está constituida por dos dominios que presentan cuatro sub-unidades, las cuales contienen α hélices y hojas β (Fig. 1-5) (8).

6.-Lectinas tipo amaranto. Dentro de este grupo encontramos lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus leucocarpus*. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, unidos por una pequeña hélice 3^{10} , cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena B de la lectina de *Ricinus communis*. (Fig. 1-6) (8).

ESPECIFICIDAD DE LECTINAS VEGETALES HACIA MONOSACÁRIDOS

Una gran diversidad de lectinas han sido aisladas y caracterizadas de diferentes especies vegetales y/o animales. Estos estudios han permitido identificar que existe una gran similitud estructural entre las lectinas de una misma familia. En algunos casos se ha demostrado que las lectinas son capaces de reconocer carbohidratos en una determinada configuración o secuencia de carbohidratos, es decir, que las características de especificidad por estructuras sacarídicas también es altamente conservada entre proteínas de una misma especie. Existen diversos ejemplos: Grupos de lectinas que reconocen una variación en la configuración del carbono 4 del monosacárido con el que interactúan. Estas lectinas tienen la capacidad para diferenciar epímeros, es decir que

algunas son capaces de diferenciar entre galactosa y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) o la glucosa y la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), ya que mientras el hidroxilo de la galactosa en el carbono 4 se encuentra en posición axial, el equivalente en la glucosa se encuentra en posición ecuatorial, pudiendo tolerar en ambos casos variaciones en el carbono 2 del monosacárido, como por ejemplo la lectina de *Canavalia ensiformis* que interactúa con el monosacárido glucosa y la lectina de *Amaranthus leucocarpus* que interactúa con el monosacárido N-Acetil-Galactosamina, esto generó una clasificación de lectinas basadas en su capacidad de reconocer las sustituciones de carbono 4 de los monosacáridos (Fig. 2 I-IV), propuesta por Makela (8). Existen lectinas cuya especificidad está dada por la conformación del carbono anomérico como la lectina de *C. ensiformis* (Con A) y la lectina de *Lens culinaris* (LCA), ambas reconocen preferentemente a los -

manósidos. Algunas lectinas como la de *Helix pomatia* tienen la capacidad de reconocer las formas anómericas o (9). Esto ha originado una clasificación de lectinas con base en los monosacáridos que son capaces de inhibir una reacción de hemaglutinación tomando en cuenta las variaciones en el carbono cuatro y en el carbono anomérico (Tabla I).

ESPECIFICIDAD DE LECTINAS VEGETALES HACIA OLIGOSACARIDOS

Las lectinas, además de presentar una afinidad conformacional por monosacáridos, presentan una afinidad por estructuras oligosacáridicas más complejas. Este reconocimiento puede ser en posición terminal o intermedia. Así por ejemplo, las lectinas de Con A y LCA que se les consideraba específicas para -manósidos, tienen afinidad por estructuras oligosacáridicas similares pero no idénticas. Ambas lectinas reconocen estructuras oligosacáridicas unidas por enlaces de tipo N-

glicosídico a una asparagina (Asn) en una cadena proteica, sin embargo, las substitución del anillo trimanosídico, típico en estas cadenas de oligosacáridos, por estructuras de tipo lactosamínico (Gal 1,4 GlcNAc), o por la adición de una fucosa (Fuc) en el inicio de la estructura no es tolerado por la Con A (Fig. 3 A). Sin embargo, la lectina LCA interactúa con estas estructuras con gran especificidad (Fig. 3 B). La conformación espacial de los oligosacáridos juega un papel importante en la interacción lectina-carbohidrato, algunas lectinas como la lectina de germen de trigo (WGA) o la lectina de LCA presentan más especificidad hacia oligosacáridos cuando se encuentran unidos a glicopéptidos, que a los oligosacáridos liberados de manera enzimática o química de los glicopéptidos. La unión del oligosacárido en el residuo de asparagina genera un núcleo trisacárido (Man β 1,4 GlcNAc β 1,4 GlcNAc β 1,N) Asn, lo que genera una estructura rígida que favorece el reconocimiento de una secuencia oligosacáridica por parte de estas lectinas. Otras lectinas como la lectina de *Ricinus communis*, presentan una afinidad por oligosacáridos en donde el ácido siálico se encuentra en posición α 2,6 que por aquellas en donde se encuentra en posición α 2,3. Esto se debe a que el ácido siálico en posición α 2,6 es más accesible al sitio de reconocimiento de la lectina que cuando se encuentra en posición α 2,3(9).

EL SITIO DE RECONOCIMIENTO EN LAS LECTINAS VEGETALES.

Se ha observado que las lectinas vegetales de una misma familia, poseen una alta homología en sus secuencias de aminoácidos, estructuras secundarias, así como en organización tridimensional, como en el caso de las lectinas de la familia de las leguminosas. Una de las características estructurales ampliamente estudiada es el dominio de reconocimiento a carbohidratos, el cual lo

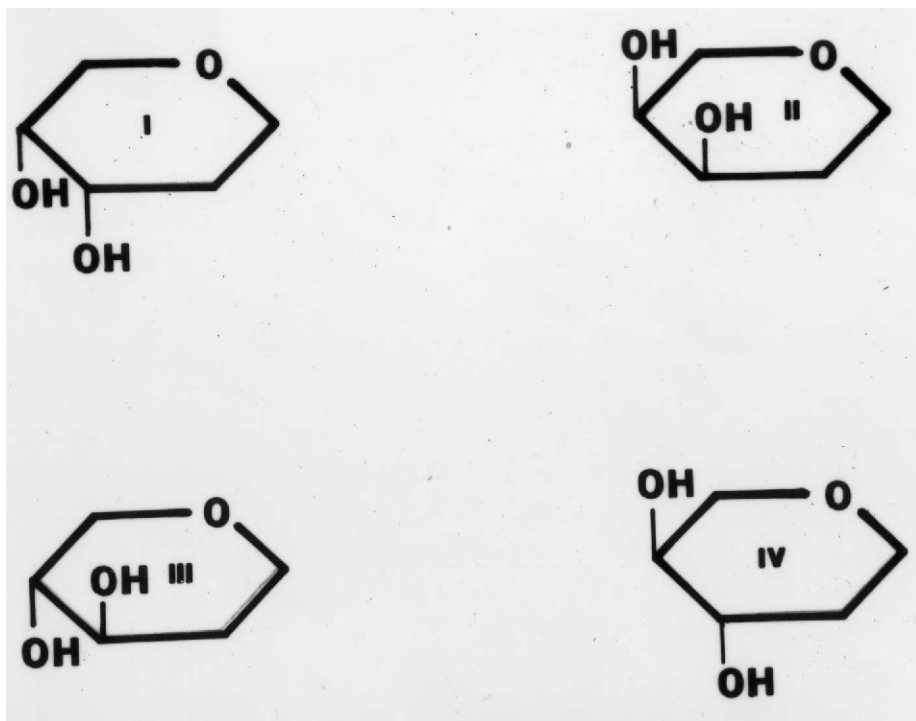


FIGURA 2. Monosacáridos reconocidos por lectinas vegetales mostrando las conformaciones en los carbonos tres y cuatro. Monosacáridos del grupo I, III y IV, corresponde a lectinas que interactúan con fucosa. Monosacáridos del grupo II, corresponde a lectinas que interactúan con galactosa. Modificado de ref. 8.

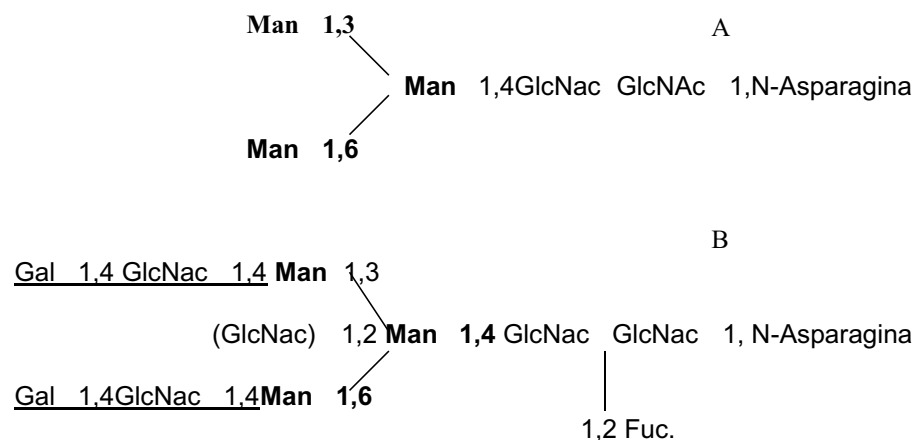


FIGURA 3. N-glicanos reconocidos por las lectinas de Con A y LCA.

A. En negrita se observa el núcleo trimanosídico reconocido por la lectina de Con A.

B. Subrayado se observan las sustituciones lactosamínicas en el núcleo trimanosídico que interfieren con el reconocimiento de la lectina de Con A, pero que no afecta la interacción de la lectina de LCA con estas estructuras. Modificado de ref. 16.

podemos dividir en dos subsitios, el primero de ellos corresponde al sitio en donde se da la interacción con el monosacárido, mientras el segundo, que se conoce como sitio extendido, permite una interacción con oligosacáridos más complejos. Esta característica permite explicar las diferencias en efectos biológicos que existen entre lectinas con la misma especificidad hacia un monosacárido. La caracterización del sitio de reconocimiento hacia monosacáridos ha permitido encontrar algunos residuos de aminoácidos importantes para la interacción lectina-carbohidrato. El estudio del sitio extendido es más complejo debido a la dificultad de cristalizar a las lectinas unidas a oligosacáridos.

Las lectinas de la familia de las leguminosas, independientemente de su especificidad reconocen a los carbohidratos gracias a la presencia de tres aminoácidos invariantes: ácido aspártico, asparagina y un residuo aromático o una leucina. El ácido aspártico y la asparagina participan en la coordinación del Ca^{2+} (Fig. 4-1) (11).

El hecho de que los aminoácidos del sitio de reconocimiento se encuentren altamente conservados en todos los miembros de una familia, sugiere que la especificidad está dada por la orientación de los monosacári-

dos en el sitio de reconocimiento. Las lectinas de leguminosas específicas para manosa o glucosa como ConA y LCA, el oxígeno $\delta 1$ de la asparagina en el sitio de reconocimiento establece puentes de hidrógeno con los hidroxilos en posiciones 4 y 6 del monosacárido, mientras que el nitrógeno $\delta 2$ forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo en posición 3 del monosacárido. La lectina de soya (SBA) y la lectina de frijol (PNA), el oxígeno $\delta 1$ de la asparagina forman puentes de hidrógeno con los hidroxilos en las posiciones 3 y 4 del monosacárido, mientras que el nitrógeno $\delta 2$ forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo en posición 3 de monosacárido (Fig. 4-2) (11).

En el caso de las lectinas específicas de quitina el sitio de reconocimiento resulta de la asociación de dos subunidades de los dímeros de la lectina. Los aminoácidos implicados en el reconocimiento son tres aminoácidos aromáticos y una serina proveniente de una subunidad, mientras que la otra subunidad aporta uno o dos residuos polares (Fig. 4-3) (11).

En el caso de las lectinas de monocotiledóneas, en el sitio de reconocimiento podemos encontrar un ácido glutámico, un ácido aspártico. En esta familia de lectinas el

hidroxilo del carbono 2 de la manosa se encuentra formando puentes de hidrógeno con el sitio de reconocimiento. Por lo tanto estas lectinas no reconocen glucosa ni epímeros de manosa (Fig. 4-4) (11).

En el caso de las lectinas de tipo jacalina, un nuevo sitio de reconocimiento fue descrito. Los aminoácidos implicados son tirosina, triptófano, ácido aspártico y una glicina que forma dos puentes de hidrógeno con el oligosacárido (Fig. 4-5) (11).

CONFORMACIÓN DE LOS OLIGOSACÁRIDOS EN EL SITIO DE RECONOCIMIENTO.

Los oligosacáridos son moléculas muy flexibles en solución y pueden adquirir numerosas conformaciones alrededor de la unión glicosídica, que está definida por los ángulos ϕ y ψ . Utilizando el modelado molecular, se pueden medir las variaciones en las conformaciones de los oligosacáridos cuando los ángulos de torsión varían no más de 20° y medir la energía potencial de la molécula después de cada cambio de conformación, así la energía potencial en función de los ángulos ϕ y ψ , permite evaluar la flexibilidad de los oligosacáridos. El espacio conformacional accesible a los oligosacáridos en los sitios de reconocimiento es restringido por los aminoácidos próximos a dicho sitio, esto ocurre principalmente en sitios profundos en forma de túnel. En el caso de los sitios situados en la superficie de las lectinas, la parte del oligosacárido que no está en contacto con el sitio de reconocimiento guarda cierta flexibilidad (10,11).

Para disacáridos la conformación adoptada, después de una interacción con una lectina es muy cercana a la mínima energía, aunque la orientación de los ángulos que definen la unión glicosídica pueden variar de $\pm 40^\circ$. Esto ha sido observado en la lactosa unida a lectina de *Erythrina corallodendron* y en la toxina de cólera (10,11).

Los oligosacáridos más grandes presentan comportamientos diferen-

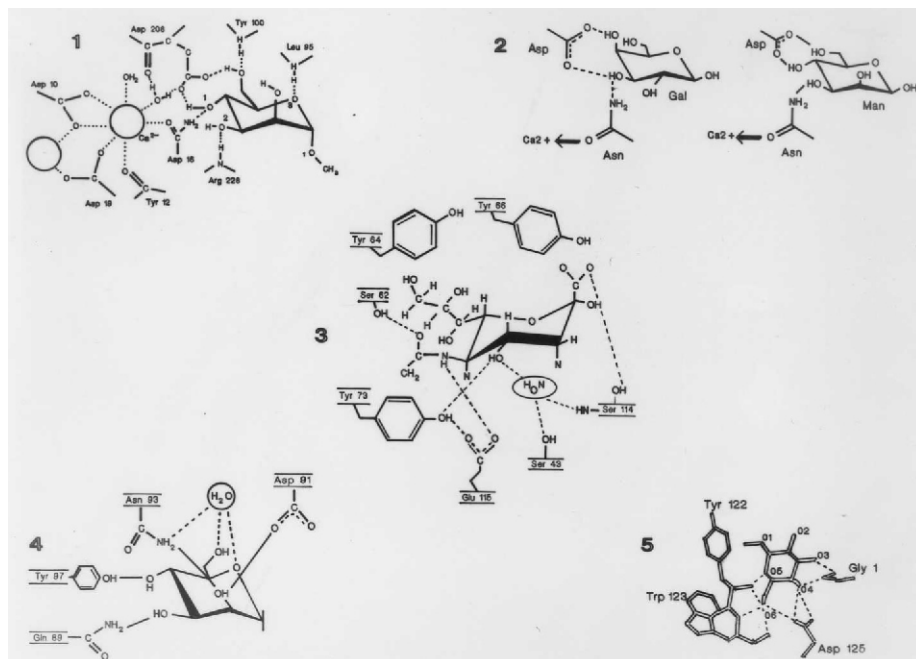


FIGURA 4. El sitio de reconocimiento a carbohidratos de algunas lectinas: -metil manósido en *Con A* (1), Galactosa unida a *EcorL* y *Con A* (2), ácido siálico en *WGA* (3), manosa en *Galanthus nivalis* (4), α -metil manósido en *Artocarpus integrifolia* (5). Modificado de ref. 9.

tes. En ciertos casos, los oligosacáridos en su conformación de baja energía, como en el caso del antígeno Lewis^x unido a la lectina de *Griffonia simplicifolia*, en otras ocasiones pueden adoptar conformaciones diferentes, pero siempre dentro de la región de mínima energía. Las estructuras cristalográficas de las isolectinas, (lectinas obtenidas de una misma especie, pero que pueden tener diferencias en el reconocimiento a carbohidratos), I y II de *Lathyrus ochrus*, unidas respectivamente a un octasacárido y a un glicopéptido, muestran diferencias conformacionales importantes. La unión Man α 1, 3 Man en éstas dos estructuras varía de 180° en ψ y se encuentra en el caso del octasacárido en una región secundaria de baja energía, esta variación es responsable de la diferencia de la orientación de estas dos estructuras en el sitio de reconocimiento de la lectina (figura 4).

La distribución de las estructuras oligosacáridicas es importante para la interacción lectina-carbohidrato, como en el caso de la lectina de *Arachis hypogaea*, donde la presencia de estructuras oligosacáridicas de

manera continua no afecta el reconocimiento, mientras que en el caso de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (12), el sitio de reconocimiento está diseñado para permitir la interacción de estructuras oligosacáridicas, donde los residuos de carbohidratos estén separados por cinco o seis aminoácidos.

UTILIZACIÓN DE LAS LECTINAS EN GLICOBIOLOGÍA.

Las lectinas aisladas de diversas fuentes vegetales han demostrado ser herramientas útiles en la investigación biomédica, en donde se les utiliza para la tipificación de grupos sanguíneos y bacterianos. Recientemente, se ha propuesto su utilización como auxiliares en el transplante de médula ósea de pacientes con inmunodeficiencias severas. La actividad mitogénica de algunas lectinas ha sido muy importante para el análisis de los eventos bioquímicos que se desarrollan durante la estimulación de los linfocitos *in vivo* y son aplicadas en la valoración de la actividad celular de diferentes enfermedades infecciosas. Las lectinas también han sido empleadas en la separación de poblaciones

celulares. De igual forma, estas proteínas inmovilizadas en un soporte inerte son utilizadas para purificar macromoléculas que contienen carbohidratos, por ejemplo glicoproteínas, enzimas, hormonas y diversos receptores de membrana, entre los que destacan el receptor para la insulina (13).

- 1.- La detección de glicoproteínas separadas por electroforesis.
- 2.- La purificación de proteínas solubles (13).
- 3.- El fraccionamiento de proteínas membranales (14).
- 4.- La caracterización y fraccionamiento de oligosacáridos o glicoproteínas utilizando lectinas secuencialmente inmovilizadas en agarosa, donde las especificidades estén bien definidas (14).

El empleo de nuevas lectinas en glicobiología requiere de una caracterización de sus especificidades para lo cual diversas técnicas se han desarrollado:

- 1.-Inhibición de la hemaglutinación mediante el empleo de estructuras glicánicas ya caracterizadas.
- 2.-La titulación microcalorimétrica isotérmica, para obtener las constantes de afinidad, que se basa en la variación de calor que existe en el reconocimiento lectina-carbohidrato (15).
- 3.-La resonancia plasmónica de superficie que se basa en el índice de refracción de un rayo láser en la superficie de los sitios donde las lectinas se unen con sus respectivos ligandos.
- 4.-El estudio del comportamiento de los glicanos, sobre lectinas inmovilizadas en agarosa.

CONCLUSIONES

El empleo de lectinas vegetales para el estudio de las interacciones proteína-carbohidratos, ha puesto en evidencia muchos mecanismos de interacción molecular como es el caso del reconocimiento de receptores glicosilados en la superficie celular. Un ejemplo de la participación de los oligosacáridos es la regulación que

ejercen sobre su crecimiento celular, donde, las modificaciones en las estructuras oligosacáridicas de proteínas de membrana se han asociado con la capacidad de las células para invadir y colonizar otros tejidos. El estudio de las bases moleculares que permiten la interac-

ción proteína-carbohidrato han sido abordados utilizando distintas técnicas. Sin embargo, el empleo de lectinas ha permitido no solamente profundizar en los cambios conformacionales que sufren los carbohidratos en el sitio de reconocimiento, sino que también ha permitido la caracteriza-

ción de nuevos receptores y el desarrollo de nuevas disciplinas como la Glicobiología, ciencia encargada de estudiar la estructura y función de los carbohidratos y los mecanismos que originan enfermedades por alteraciones en su expresión en proteínas, lo que ha abierto todo un nuevo campo en el ámbito científico.

REFERENCIAS

1. Goldstein I J, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T y Sharon N (1980) What should be called a lectin? *Nature* 66: 285-286.
2. Mikami B, Degano M, Hebre E J y Sacchettini J C (1994) A crystal structure of soybean β -amylase reacted with β -maltose and maltal: Active site components and their apparent roles in catalysis. *Biochemistry* 33: 7779-7787.
3. Cygler M, Rose D R y Bundle D R (1991) Recognition of a cell-surface oligosaccharide of pathogenic *Salmonella* by an antibody Fab Fragment. *Science* 253: 442-445.
4. Merrit E A, Sarfaty S, Vander Akker F, L'Hoir C, Martial J A y Hol W G J (1994) Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Science* 3: 166-175.
5. Sharon N (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol Today* 5: 1-5.
6. Barondes S H (1981) Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev Biochem* 50: 207-231.
7. Gallily R, Vray B, Stain Y y N Sharon. (1984). Wheat germ agglutinin potentiate uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. *Immunology* 52: 679-686.
8. Mákela O (1957) Studies on hemmagglutinins of leguminoseae seeds. *Ann. Med. Exp Fenn Supl* 11: 1-156.
9. Rudiger H y Rouge P (1998) Structure and Function of plant Lectin. *Carbohydr Eur* 23: 16-22.
10. Oldenburg K R, Loganathan D, Goldstein I J, Schultz P G y Gallop M A (1992) Peptides ligands for a sugar binding protein isolated from a random library. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5393-5397.
11. Lis H y Sharon N (1998) Lectins: Carbohydrates-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev* 98: 637-674.
12. Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jiménez M, Degand P, Álvarez G y Zenteno E (2004). Specificity of *Amaranthus leucocarpus syn hypocondriacus* lectin for O-Glycopeptides. *BBacta* 1674/3: 282-290.
13. Lis H y Sharon N (1986). Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* 55: 35-67.
14. Gorocica P, Lascrain R, Hernandez P, Porras F, Bouquelet S, Vazquez L Y Zenteno E (1998). Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj J* 15: 809-814.
15. Prigent M J, Bencomo V V, Sinay P Y Cartron P (1984). Interaction of Glycopeptides Carring cluster of O-glycosidic disaccharide chains (-D-Gal (1-3)- -D-GalNAc) with -D-Galactose binding lectins. *Glycoconj J* 1: 73-80
16. Montreil J, Bouquelet S, Cacan R, Debray H, Fournet B, Michalsky J, Spik G y Strecker G (1995) Methods on glycoconjugates, Harwood Academy Publisher, Suiza p103-133.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

David G. Mendoza Cózatl
Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
Email: dgmcozatl@yahoo.com.mx

Control metabólico. Estrategia para incrementar el flujo de una vía metabólica.

Una de las principales limitaciones en biotecnología para incrementar el flujo de una vía metabólica es el insistente uso y sobre-interpretación del concepto de *etapa limitante*. Además de no ser cuantitativo, este concepto no distingue entre el control que una enzima ejerce sobre el flujo o sobre la concentración de un intermediario de la vía. El Análisis de Control Metabólico (ACM; [1]) ha demostrado que el control del flujo y el control de la concentración de intermediarios son propiedades independientes una de la otra, y ha sustituido el término *etapa limitante* por el respectivo coeficiente de control de flujo (C_{Ei}^J ; cambio en el flujo J debido a una variación infinitesimal en la actividad de la enzima i) y coeficiente de control de concentración (C_{Ei}^M ; cambio en la concentración del metabolito M debido a una variación infinitesimal en la actividad de la enzima i), para cada una de las enzimas en una determinada vía.

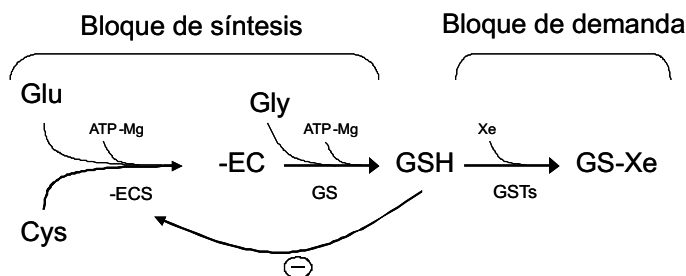


Figura 1 Metabolismo del GSH. Glu, glutámico; Cys, cisteína; -EC, -glutamilcisteína; Gly, glicina; GSH, glutatión; GS-Xe, complejo glutatión-xenobiótico; -ECS, -glutamilcisteína sintetasa; GS, glutatión sintetasa; GSTs, glutatión S-transferasas; Xe, xenobiótico. La -ECS es inhibida por GSH de manera competitiva respecto al glutámico (retroinhibición).

El ACM provee además el marco teórico para estimar con mayor certeza el efecto que tendrá el incrementar la actividad de una enzima sobre el flujo de la vía o sobre la concentración de un intermediario específico.

El glutatión (GSH; -Glu-Cys-Gly) es el tiol no proteico más abundante en la mayoría de los organismos, participa en la regulación del estado redox intracelular, procesamiento de especies reactivas de oxígeno, detoxificación de xenobióticos (productos de la lipoperoxidación como los 4-hidroxicualenales, además de algunas drogas y compuestos aromáticos) y, en plantas y algunas levaduras, esta relacionado con la resistencia a metales pesados [2]. La vía de síntesis del GSH a partir de sus aminoácidos se muestra en la **Figura 1**. El principal mecanismo de regulación enzimático de la vía es la retroinhibición de la -ECS por GSH, lo cual ha llevado a

proponer a esta enzima como la *etapa limitante* de la vía. Sin embargo, la estructura de control de la vía (Tabla 1) muestra que, durante un estatus celular de baja demanda de GSH, donde la retroinhibición es significativa, la mayor parte del control reside en la demanda de GSH (representado en este ejemplo por las GS-transferasas). Si hay un incremento en la demanda, la concentración de GSH va a disminuir de manera transitoria, induciendo un aumento en la actividad de la -ECS (des-inhibición) y en el flujo de la vía. Es importante mencionar que: (i) el incremento en el flujo se debió al incremento en la demanda, de ahí su alto grado de control, (ii) si el bloque de síntesis es capaz de restaurar los niveles originales de GSH, la mayor parte del control de la vía seguirá residiendo en la demanda y (iii) la retroinhibición de la -ECS por GSH tiene que ver mayormente con el control de la concentración de GSH, pero muy poco con el flujo. Por otro lado, durante un estatus de alta demanda de GSH (exposición a xenobióticos, metales pesados, estrés oxidativo), donde una vez incrementado el flujo el bloque de síntesis no pueda restaurar los niveles originales de GSH, el control se distribuirá entre el bloque de síntesis y el bloque de demanda (**Tabla 1**), dependiendo de la elasticidad de cada bloque hacia GSH (para un análisis de elasticidades, ver [1]).

Evidentemente, la estrategia para incrementar el flujo de la vía o la concentración de GSH en cada estado estacionario (baja y alta demanda) será diferente y estará limitado por los C_{Ei}^J :

Tabla 1.

Estructura de control de la síntesis de GSH en plantas.

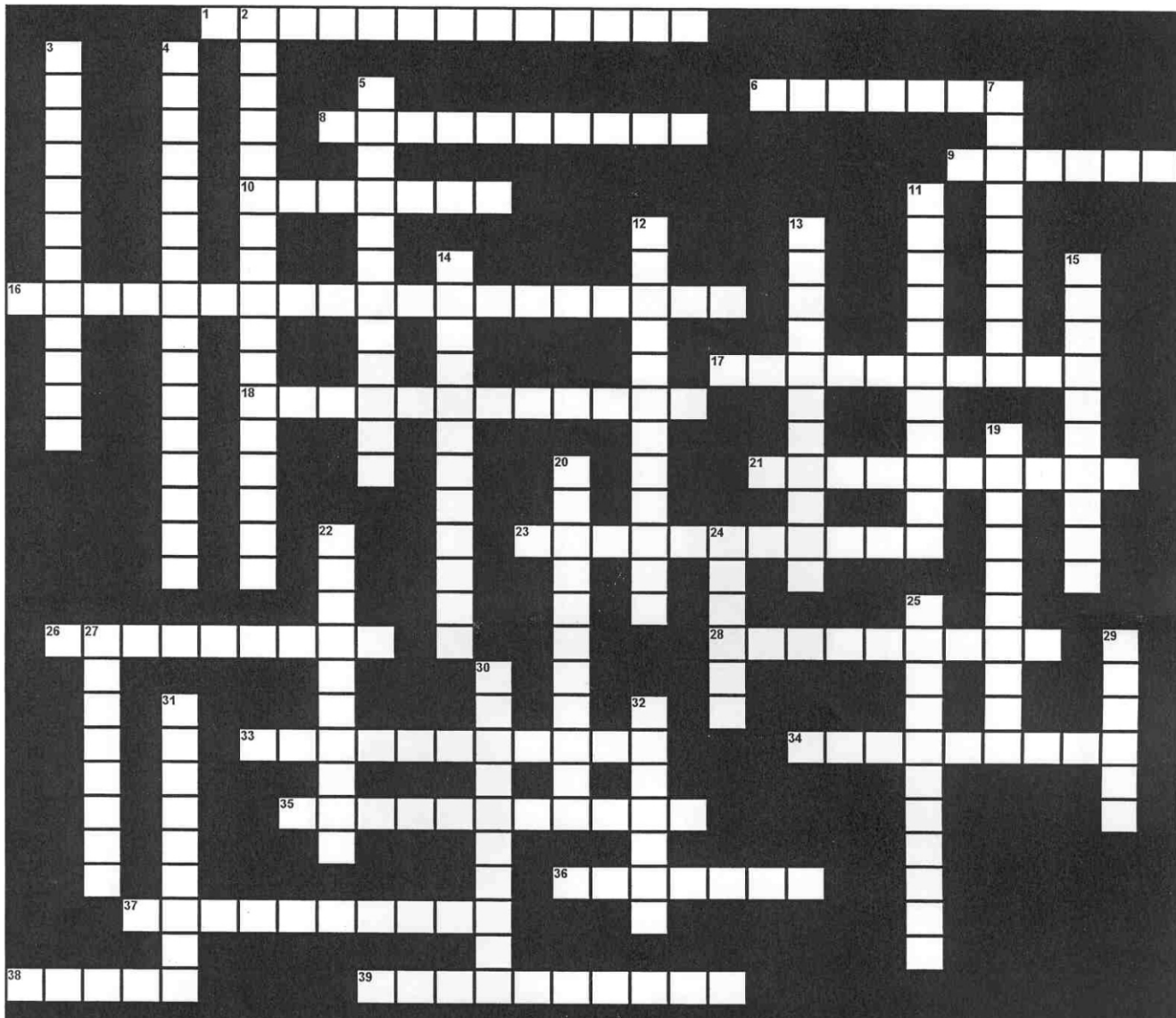
Enzima	Baja demanda ($C_{Ei}^{J_{GSH}}$)	Alta demanda ($C_{Ei}^{J_{GSH}}$)
-ECS	0.11	0.57
GS	< 0.01	< 0.01
GSTs	0.88	0.42

Usando los coeficientes de control de las enzimas del metabolismo de GSH:

- 1.- ¿Que efecto tendrá incrementar la actividad de la -ECS 5 veces sobre el flujo hacia GSH en el caso de alta y baja demanda, respectivamente?
- 2.- ¿Que efecto tendrá incrementar la actividad de la GSTs 5 veces sobre el flujo hacia GSH en el caso de alta y baja demanda, respectivamente?
- 3.- ¿En el caso de baja demanda, cuantas veces se debe incrementar la actividad de la GSTs para incrementar el flujo hacia GSH en 2.5 veces?

CRUCIBIOQ

MEMBRANAS



HORIZONTALES

- 1 Complejo característico de la membrana plasmática que contiene oligosacáridos que la protegen de enzimas proteolíticas.
- 6 Ácido que es componente de las glucoproteínas de la membrana del eritrocito, cuando se elimina experimentalmente, la vida media de esta célula disminuye a unas pocas horas.
- 8 Proteínas de la membrana mitocondrial con grupo hemo que son transportadores electrónicos en reacciones de oxido-reducción.
- 9 Tipo de difusión mediante la cual pasan las moléculas a una región de menor concentración.
- 10 Flujo de agua través de una membrana semipermeable.
- 16 Pertenecen a este grupo de moléculas los determinantes antígenicos sanguíneos A, B y O.
- 17 Tipo de difusión por la cual una sustancia polar atraviesa la membrana ayudada de una proteína.
- 18 El cotransporte de este tipo, permite el paso de dos sustancias en sentido contrario a través de la membranas.

- 21 Lípido presente en las membranas plasmáticas, participa en el control de su fluidez, el aumento de esta sustancia las torna rígidas.
- 23 Así se denominan a los lípidos de la membrana por tener regiones hidrofílicas e hidrofóbicas.
- 26 Presentes en las células animales, son vesículas esféricas rodeadas de membrana simple, poseen enzimas digestivas en el interior de la membrana mismas que digieren a los polisacáridos, proteínas y lípidos que penetran a la célula por endocitosis.
- 28 Moléculas lipofílicas que se asocian a cationes, facilitando su transporte, un ejemplo es la valinomicina que transporta K^+ .
- 33 Glucoproteína presente en la membrana plasmática de los eritrocitos, el 60% de su masa son polisacáridos unidos a residuos de 3 aminoácidos polares sin carga: serina, treonina y asparagina.
- 34 Pigmento visual que posee una proteína muy abundante en la membrana de los bastones de la retina, tiene la función de absorber luz.
- 35 Compartimentos celulares rodeados de membrana, tienen la función de degradar sustancias que pueden dañar a la célula por ejemplo el peróxido de hidrógeno por la acción de la catalasa lo transforman en agua y oxígeno.
- 36 Presentes en la membrana interna mitocondrial, permiten que haya mayor superficie; lugar donde se encuentran las enzimas necesarias para la fosforilación oxidativa.
- 37 Proteínas fuertemente unidas a las membranas mediante interacciones hidrofóbicas.
- 38 Mecanismo de ruptura de la membrana plasmática.
- 39 Así se llama a la membrana exterior de una célula.

VERTICALES

- 2 Complejos presentes en las membranas de las bacterias gram-negativas; en algunas infecciones la porción lipídica es responsable de la disminución en la presión sanguínea en humanos.
- 3 Característica de la membrana que le permite tener cambios de forma y en ocasiones desplazarse.
- 4 Proceso en el que los lípidos, especialmente los de la membrana, pierden sus características, estructura y funcionalidad debido al daño ocasionado por el oxígeno, esta reacción puede conducir a aterosclerosis, enfermedades inflamatorias, cáncer, etc.
- 5 Membrana en la que se encuentra la ATP sintasa, un complejo enzimático que sintetiza ATP.
- 7 Tipo de fosforilación en la membrana mitocondrial, donde un flujo de electrones asociado con otros

- procesos conduce a la formación de ATP.
- 11 Proceso mediante el cual por una invaginación de la membrana, ingresan a la célula polisacáridos, proteínas y polinucleótidos.
- 12 Sistema reticular de dobles membranas en la célula eucariótica, tiene canales secretores y en su borde se instalan los ribosomas.
- 13 Proceso mediante el cual algunas células como macrófagos y granulocitos ingieren bacterias o virus.
- 14 Es el paso simultáneo de dos sustancias a través de la membrana y puede ser en el mismo sentido o en sentido contrario.
- 15 Debido a ellas hay alteración en alguna proteína con función de receptor, transportador o estructural, situación que se expresa con la presencia de algunas enfermedades.
- 19 Son proteínas de superficie con sitios de unión para moléculas extracelulares (ligando), cuando esto ocurre, la proteína transduce una información en el interior de la célula.
- 20 La falta de hexosaminidasa A, propicia la acumulación de gangliosido GM2 en membranas de células de cerebro y bazo, ocasionando la enfermedad de Tay-Sachs.
- 22 Localizados en la membrana interna de los cloroplastos, poseen los pigmentos fotosintéticos y las enzimas necesarias para las reacciones luminosas.
- 24 Tipo de transporte a través de la membrana que requiere energía.
- 25 Principal componente lipídico que participa en la bicapa de la membrana, puede tener en su estructura serina, inositol, colina o etanolamina.
- 27 Un ejemplo de este tipo de proteína es la bacteriorrodopsina, tiene 7 secuencias muy hidrofóbicas que van de lado a lado de la membrana, es una bomba de protones que es accionada por la luz.
- 29 Estructura formada por dos hileras de moléculas de lípidos, en donde las colas hidrocarbonadas se atraen entre sí.
- 30 Proceso que consiste en la fusión de una vesícula intracelular con la membrana plasmática que permite expulsar parte del contenido de la vesícula al exterior de la célula.
- 31 Constituidas por una bicapa lipídica y proteínas globulares colocadas irregularmente, delimitan los espacios interno y externo de los compartimentos y regulan el tránsito de moléculas.
- 32 Proteínas transmembranales que son selectivas para el transporte de iones, los cuales pueden ser Na^+ , K^+ , Ca^{++} , o Cl^- .

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

El avance actual en técnicas de biología molecular nos permite incrementar la actividad de una o varias enzimas en un organismo por sobreexpresión, ya sea homóloga o heteróloga. A pesar del aparente impacto que esto podría tener en la biotecnología, la falta de un marco teórico adecuado para estimar el efecto que tendrá incrementar la actividad de una enzima sobre el flujo de una vía ha llevado a diseños experimentales erróneos y por lo tanto no exitosos. El ACM provee el marco teórico adecuado para tales estimaciones. Small y Kacser [3] desarrollaron una ecuación que permite estimar el efecto de variar la actividad de una enzima sobre el flujo de una vía utilizando el coeficiente de control de flujo de esa enzima (**Ecuación 1**),

$$f_{Ei}^J = \frac{1}{1 + C_{Ei}^J \frac{r}{1}}$$

(Ecuación 1)

Donde f_{Ei}^J es el incremento en flujo, C_{Ei}^J es el coeficiente de control de flujo de una determinada enzima y r es el factor por el cual se incrementa la actividad de la enzima. Es necesario enfatizar que la exactitud de esta estimación depende de que la estructura de control se mantenga después del incremento en la actividad enzimática o que los valores se mantengan cercanos a la estructura de control basal. Además, esta ecuación fue desarrollada para una vía lineal, por lo que su utilización para vías ramificadas debe tomarse con precaución.

Con la ecuación 1 podemos estimar cual será el efecto sobre el flujo hacia GSH al incrementar 5 veces la actividad de la -ECS: 1.09 y 1.83 veces respecto al flujo basal en condiciones de baja y alta demanda, respectivamente. Para el caso de las GSTs, el efecto sobre el flujo hacia GSH al incrementar 5 veces la actividad de las GSTs será de: 3.38 y 1.5 veces respecto al flujo basal en condiciones de baja y alta demanda, respectivamente.

La gráfica 1 muestra el efecto de variar de 1 a 10 veces la actividad de cada una de las enzimas de la síntesis de GSH en los dos estados estacionarios, de baja y alta demanda. Como es evidente, el impacto en el flujo de una vía por variar la actividad de una de sus enzimas dependerá del grado de control que esta enzima ejerza sobre el flujo. La ecuación 1 también puede utilizarse para estimar el cambio en el flujo por incrementar simultáneamente varias enzimas por el mismo factor, donde el C_E^J será ahora la suma de los coeficientes de las enzimas incrementadas. De la figura 1 se puede visualizar que para enzimas con C_E^J menores a la unidad (lo cual es cierto en la mayoría de los casos), el cambio en el flujo debido al incremento en la actividad tiene un límite fijado por:

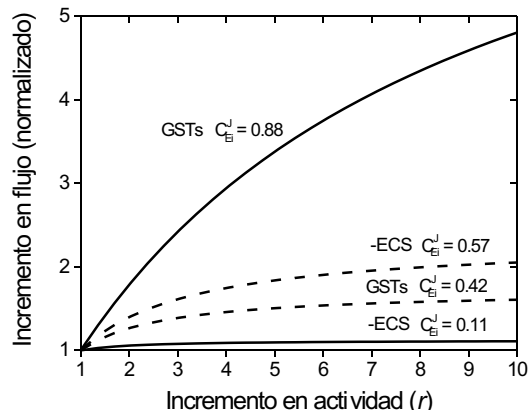


Figura 1 Variación en flujo debido a un cambio en la actividad de la -ECS ó GSTs en condiciones de baja (línea continua) o alta demanda (línea discontinua). La simulación fue hecha usando la ecuación 1 y el programa *Microcal Origin 5.0* (Microsoft).

$$f_{Ei}^J = \frac{1}{1 + C_{Ei}^J}$$

(Ecuación 2)

Que es el caso cuando $r \gg 1$ y por lo tanto puede eliminarse de la ecuación 1.

Por otro lado, para estimar cuanto debemos incrementar la actividad de una enzima, para obtener un X cambio en el flujo, podemos despejar a r de la ecuación 1 para obtener la ecuación 3, con el mismo significado de símbolos:

$$r = \frac{C_{Ei}^J}{C_{Ei}^J - 1} \frac{1}{f_{Ei}^J}$$

(Ecuación 3)

Con esta ecuación podemos contestar la pregunta 3. En el caso de baja demanda, para obtener un cambio de 2.5 veces en el flujo, hay que incrementar la actividad de las GSTs 3.13 veces. Por otro lado, y debido al límite impuesto por la ecuación 2 y el bajo C_{-ECS}^J (0.11), el máximo incremento en flujo por incrementar la actividad de la -ECS por un factor $n = 10$, en la condición de baja demanda es 1.12. Esta simple ecuación explica porque, si una enzima tiene un C_E^J bajo, al incrementar su actividad en decenas de veces, el flujo permanecerá prácticamente inalterado. Este tipo de ejemplos se encuentra abundantemente en la literatura.

David G. Mendoza Cózatl
Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
Email: dgmcozatl@yahoo.com.mx

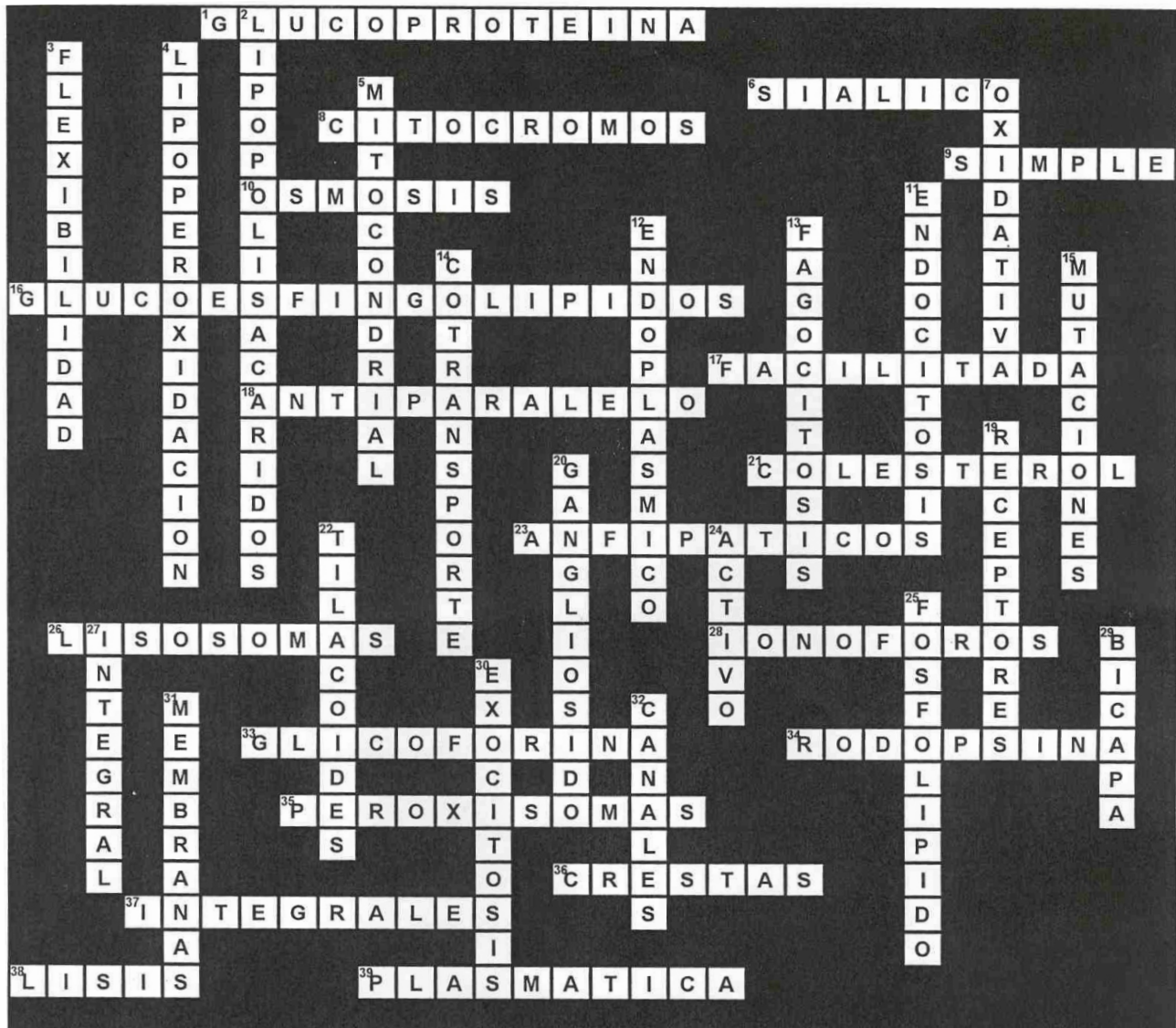
REFERENCIAS

- 1 Fell D. (1997) Understanding the control of metabolism. Portland Press. London. 287 pp. ISBN 85578 047 X ISSN 1353 6516.
- 2 Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, photosynthetic protists and plants. FEMS Microbiol. Rev. *en prensa*.
- 3 Small JR, Kacser H (1993) Responses of metabolic systems to large changes in enzyme activities and effectors. Eur. J. Biochem. 213:613-624

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

CRUCIBIOQ

MEMBRANAS



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 o bien al teléfono 5622-5669 y Fax: 5622-5607; correo E: rsalceda@ifc.unam.mx

Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Coordinadora de Corresponsales de la REB

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

La REB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores que revisen algunos de los últimos números de esta publicación para que vean estilo, tipos de abreviaturas, etc., así como que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

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

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

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

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Word K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: The molecular biology of immunosuppression. Editor: Thomson A W. John Wiley 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.