

# 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. 2

JUNIO 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”

**ALEJANDO ZENTELLA DEHESA**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e  
Instituto Nacional de Ciencias Biomédicas 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

### COMITE EDITORIAL

#### EDITORIAL

#### LAS ESTATINAS Y SU AMPLIO ESPECTRO DE EFECTOS BENÉFICOS

Marco Antonio Juárez-Oropeza  
Juan C. Díaz-Zagoya  
Patricia V. Torres-Durán.....37

#### ARTÍCULOS

#### LA FUNCIÓN Y TRANSPORTE DEL ÁCIDO L-MÁLICO EN PLANTAS: UN DICARBOXÍLICO ESTRELLA

José Luis Martínez Camacho y  
José Víctor Calderón Salinas.....39

#### LA SENESCENCIA REPLICATIVA COMO UNA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS

Norma Edith López-Díazguerrero,  
Cintia Mayel Martínez Garduño y  
Mina Konigsberg Fainstein.....47

#### DEFECTOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE PREDISPONEN A UNA ALTA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS

Adriana Garibay-Escobar.....54

#### OTRAS COMUNICACIONES

#### PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. EFECTO DEL pH.

Ricardo Jasso Chávez.....59

#### CRUCIBIOQ. BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS

Yolanda Saldaña Balmori.....60

#### RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ricardo Jasso Chávez.....62

#### SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori.....65

#### RECIBE PREMIO EN TAMAULIPAS YOLANDA SALDAÑA BALMORI.

José Víctor Calderón Salinas.....66

### CONVOCATORIAS

#### XIII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.....67

#### CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....70

#### INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....71

# EDITORIAL

## LAS ESTATINAS Y SU AMPLIO ESPECTRO DE EFECTOS BENÉFICOS

El colesterol es un lípido estructural de las biomembranas y el precursor inmediato de la síntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares. A pesar de encontrarse normalmente en nuestro organismo, las concentraciones elevadas de colesterol plasmático constituyen un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, como lo han demostrado numerosos estudios clínicos. Debido a que más del 60% del colesterol corporal total se sintetiza en el hígado, la inhibición de su síntesis es el procedimiento de elección para disminuir los niveles sanguíneos de colesterol.

La enzima limitante de la velocidad de síntesis del colesterol es la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, que sintetiza al mevalonato a partir de la reducción de la HMG-CoA. Entre los primeros inhibidores naturales de la HMG-CoA reductasa se encuentran la mevastatina y la mevinolina o lovastatina, siendo la más potente la lovastatina (K<sub>i</sub> 0.6 nM). Debido a que la lovastatina es de escasa hepatotoxicidad, se utilizó como tratamiento para la hipercolesterolemia en humanos. Desde entonces, nuevas estatinas, tanto naturales como químicamente modificadas o sintéticas, se han utilizado en la clínica, incluyendo a la pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina y rosuvastatina. Como resultado de los estudios clínicos, las estatinas han mostrado ser los pilares en el control de las dislipidemias para la prevención primaria o secundaria de las enfermedades cardiovasculares.

Las estatinas actúan formando complejos reversibles con la HMG-CoA reductasa, mediante una gran cantidad de interacciones de van der Waals. Las estatinas son inhibidores competitivos que desplazan efectivamente al sustrato natural de la HMG-CoA reductasa uniéndose a ésta en concentraciones  $\mu$ M. Las estatinas disminuyen el colesterol plasmático no solamente al inhibir su síntesis, sino que también aumentan su captación hepática por la vía del receptor de las LDL. Las estatinas más potentes para disminuir los valores de colesterol plasmático son, en orden decreciente: simvastatina, pravastatina y lovastatina, para las estatinas de la segunda generación. En contraste, las estatinas de tercera generación, las

sintéticas: fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, pitavastatina y rosuvastatina son más efectivas para disminuir el colesterol, principalmente las tres últimas, quizás en parte por su capacidad de unir con mayor afinidad a la HMG-CoA reductasa e inhibirla con mayor duración.

Al inhibir la síntesis de mevalonato, las estatinas también inhiben la producción de otras moléculas isoprenoides importantes, como el farnesilpirofosfato (FPP) y el geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Estas moléculas, derivadas del metabolismo del mevalonato, sirven como etiquetas lipídicas para la modificación postraduccional de una gran variedad de proteínas, incluyendo la subunidad gamma de las proteínas G y las proteínas pequeñas unidoras de GTP, como Ras, Rho, Rab, Rac, Ral o Rap. Las proteínas Ras y Rho son los principales sustratos de la modificación postraduccional por prenilación. La inhibición de la prenilación conduce a la acumulación, en el citoplasma, de sus formas inactivas.

En estudios clínicos con estatinas se observó que la recuperación de la función endotelial precedía a la reducción significativa del colesterol sérico, lo que sugirió que las estatinas pudieran tener efectos adicionales sobre el endotelio, además de la reducción del colesterol. Las estatinas incrementan la producción de óxido nítrico (NO) al estimular y sobre-expresar la enzima sintasa endotelial del NO (eNOS), en un proceso dependiente de la inhibición de la genilgeranyl transferasa, lo que prolonga la vida media del RNA mensajero de la eNOS, pero no la transcripción de su gen. Las estatinas también incrementan la actividad de eNOS al incrementar su fosforilación en un proceso dependiente del sistema fosfatidilinositol-3-cinasa/proteína cinasa Akt (Ptdins-3K/Akt). Además, inhiben la expresión de la endotelina-1, un potente vasoconstrictor.

Las estatinas también inducen la angiogénesis al incrementar el número de células progenitoras de células endoteliales, vía el sistema Ptdins-3K/Akt. Por el contrario, las estatinas inhiben la proliferación de células del músculo liso vascular al disminuir la activación de

RhoA.

Por otra parte, la producción de radicales de oxígeno a través de la proteína membranaral NADPH oxidasa tipo fagocito, que en el miocito requiere la participación de las proteínas Rac1 y Rap, es inhibida por la presencia de estatinas, lo que conduce a un menor estrés oxidativo.

Análisis retrospectivos de estudios clínicos, además de estudios en animales transgénicos, sugieren que las estatinas reducen la incidencia y morbilidad de insuficiencia cardíaca y de infartos fatales. Derivado de otros estudios retrospectivos, las estatinas han mostrado reducir los eventos de isquemia cerebrovascular.

También se ha demostrado en modelos animales que las estatinas tienen un efecto biológico de restauración de la masa ósea, lo cual constituye un tremendo potencial de estos fármacos en beneficio del gran segmento creciente de la población añosa.

Hasta hace poco se pensaba que los efectos independientes del colesterol o efectos pleiotrópicos de las estatinas, eran mediados solamente por la inhibición de la síntesis del mevalonato. Sin embargo, en el año 2001 se demostró que las estatinas se unen específicamente a un sitio alostérico del antígeno-1 asociado a la función de la integrina  $\beta 2$  (LAF-1). La proteína LAF-1 pertenece a la

familia de integrinas y juega un papel importante en la activación de las células T.

En conclusión, las estatinas han demostrado ser útiles en la prevención de la enfermedad isquémica coronaria. Sin embargo, los beneficios observados por su uso parecen ser mayores de los que podrían ser esperados solamente por los cambios en los lípidos plasmáticos. Los efectos de las estatinas, independientes de los que ejercen sobre el colesterol, o efectos pleiotrópicos, afectan no sólo a la enfermedad isquémica del miocardio, sino que también han mostrado efectos benéficos sobre el estrés oxidativo, sistema inmunológico, eventos cerebrovasculares, y en el menor desarrollo de algunas células tumorales. Es indudable que las investigaciones futuras nos mostrarán más de los efectos benéficos de las estatinas, pero no habrá que menospreciar los reportes de los efectos adversos de éstas.

Marco Antonio Juárez-Oropeza  
Juan C. Díaz-Zagoya  
Patricia V. Torres-Durán

Departamento de Bioquímica,  
Facultad de Medicina, UNAM.

# LA FUNCIÓN Y TRANSPORTE DEL ÁCIDO L-MÁLICO EN PLANTAS: UN DICARBOXÍLICO ESTRELLA\*

JOSÉ LUIS MARTÍNEZ CAMACHO Y JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS<sup>1</sup>

## RESUMEN

El ácido L-málico y su anión, el malato, juegan un papel muy importante en la bioquímica y fisiología de las plantas. Además de su participación en el ciclo de Krebs, puede convertirse en un almacén de CO<sub>2</sub> y de equivalentes reductores en algunas plantas. También, puede servir como un transportador indirecto de equivalentes reductores, amortiguador del pH y de la osmolaridad del citosol, quelante de cationes tóxicos y acidificante del suelo para solubilizar los fosfatos insolubles. Aunado a todas estas funciones, recientemente hemos propuesto que también participa en la modulación del pH extracelular por las células de aleurona de trigo. Para el transporte del malato existe un número considerable de transportadores y canales en las diversas membranas celulares, los cuales logran establecer una compartimentalización. Finalmente, es importante mencionar que en un número de compartimientos celulares existen diversas rutas bioquímicas, finamente reguladas, que permiten sintetizar y/o degradar el L-malato.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido L-málico, amortiguamiento pH, almacén de CO<sub>2</sub>, movilización de fosfatos, quelación de cationes tóxicos, transporte-malato

**ABREVIATURAS:** CAM, metabolismo ácido de las crasuláceas; NAD, nicotinamida dinucleótido; NADP, nicotinamida dinucleótido fosfato; OA, oxaloacetato; PEP, fosfoenol piruvato; PEPC, fosfoenol piruvato carboxilasa; TCA, ácido tricarbóxico.

## ABSTRACT

L-malic acid has a critical role in the biochemistry and physiology of plants. In addition to its partaking in the Krebs and glyoxilate cycles, it stores CO<sub>2</sub> and reducing equivalents in CAM and C<sub>4</sub> plants. Additionally, it is a chemical carrier of reducing equivalents through biological membranes, it is involved in both the pH-stat and osmoregulation mechanisms in the cytosol, in the chelation of toxic cations (like Al<sup>3+</sup>) in soils and in the acidification of rhizosphere for phosphate mobilization. Furthermore, we have recently proposed a novel function, the modulation of extracellular pH by the aleurone cells of wheat seeds. For malate transport there are several transporters and channels embedded in distinct biomembranes and which can establish compartmentation. Finally, it is important to mention that in a number of cell compartments, several of finely regulated biochemical pathways are involved in the synthesis of L-malate and/or its degradation.

**KEY WORDS:** L-malic acid, pH-stat, CO<sub>2</sub> storage, phosphate mobilization, toxic-cation chelation, malate transport

## INTRODUCCIÓN

En los vegetales existen muy pocos espacios celulares exentos de la presencia y/o la participación metabólica del ácido L-málico o de su anión, el malato. Dentro de la célula se encuentra en el citosol y en la mayoría de los organelos (mitocondria, cloroplasto, vacuola, peroxisoma y glioxisoma). A nivel de tejido y órgano lo hallamos en hojas, tallos, raíces, conductos del xilema y floema, apoplasto, semillas, frutos y hasta en

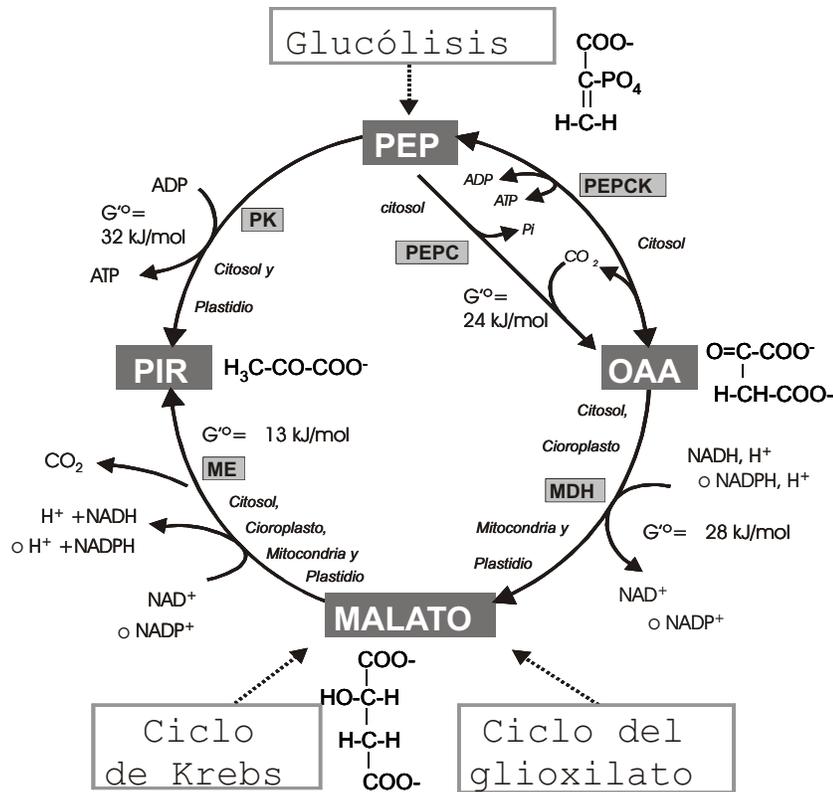
los exudados. Es uno de los aniones orgánicos más abundantes (en promedio), junto con el citrato y el glutamato; según los valores obtenidos en distintos tejidos de maíz, zanahoria, betabel y *Bryophyllum calycinum* (planta CAM). Dicho sea de paso, que su importancia se extiende aún más, al emplearlo como ingrediente en alimentos preparados, por su preciado sabor acidulante y aromatizante (como en las manzanas).

Por tratarse de un ácido dicarboxí-

lico cuyos pK<sub>a</sub>'s son 3.3 y 5.1 aproximadamente, se halla casi totalmente disociado en el citosol y otros organelos con pH neutro, mientras que en vacuolas ácidas puede encontrarse semi o completamente protonado. El malato posee un valor intermedio de energía libre de Gibbs de formación estándar transformada (es decir, a pH 7) de 683 kJ/mol, si se le compara con compuestos de valores más negativos (como el ATP con 2098 kJ/mol) y de valores menos negativos (como el

\* Recibido: 11 enero 2005 Aceptado: 12 marzo 2005 Este artículo se publicó extemporaneamente.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Ave. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, CP 07340, México D. F. Tel. (0155) 5061-3800 ext. 5265. Fax: 5747-7083. Correos E: [jluismc@mail.cinvestav.mx](mailto:jluismc@mail.cinvestav.mx); [jcalder@cinvestav.mx](mailto:jcalder@cinvestav.mx)



**FIGURA 1. Rutas metabólicas de mayor importancia que involucran al malato.**

Todas ellas aparecen conectadas; sin embargo, ellas se hallan compartimentalizadas en diferentes organelos y espacios subcelulares, según se describen con detalle en el texto. Abreviaturas: PEP=fosfoenolpiruvato, PIR=piruvato, OAA=oxaloacetato, ME=enzima málica, MDH=malato deshidrogenasa, PK=piruvato cinasa, PEPC=fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPCK=fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Modificada y actualizada de (2).

$\text{CO}_2$  con 394 kJ/mol), según lo reportado por Alberty (1). Esta condición, aunada a la de poseer un estado de oxidación intermedio, un anión hidroxil-dicarboxilato, lo hace un metabolito versátil para cumplir varias funciones: como una base química para la formación de compuestos más grandes y más reducidos químicamente (como los ácidos grasos), como proveedor simultáneo de equivalentes reductores ( $\text{NADH}$  o  $\text{NADPH}$ ) y carbono (en forma de  $\text{CO}_2$ ) para la fotosíntesis y también como fuente de energía (ATP), mediante su degradación por la vía del piruvato. Como referencia de la espontaneidad de algunas reacciones en el metabolismo del malato, en la figura 1 aparecen los cambios de la energía libre de Gibbs estándar transformada ( $G^\circ$ ).

El ácido málico y su anión, malato, cumplen con tal variedad de funciones

metabólicas y fisiológicas que resultan de vital importancia para la planta. Las más conocidas a la fecha son las siguientes:

1. Intermediario en los ciclos de Krebs y del glioxilato
2. Almacén de  $\text{CO}_2$  y de equivalentes reductores en plantas CAM y  $\text{C}_4$
3. Transportador de equivalentes reductores hacia el citosol o peroxisoma, a través de la lanzadera oxaloacetato/malato
4. Regulador de la osmolaridad intracelular
5. Compensador de las cargas eléctricas de iones absorbidos por la raíz
6. Acidificante del suelo para disolver los fosfatos
7. Amortiguador del pH citosólico
8. Quelante de cationes tóxicos, como el  $\text{Al}^{3+}$ , presentes en el suelo

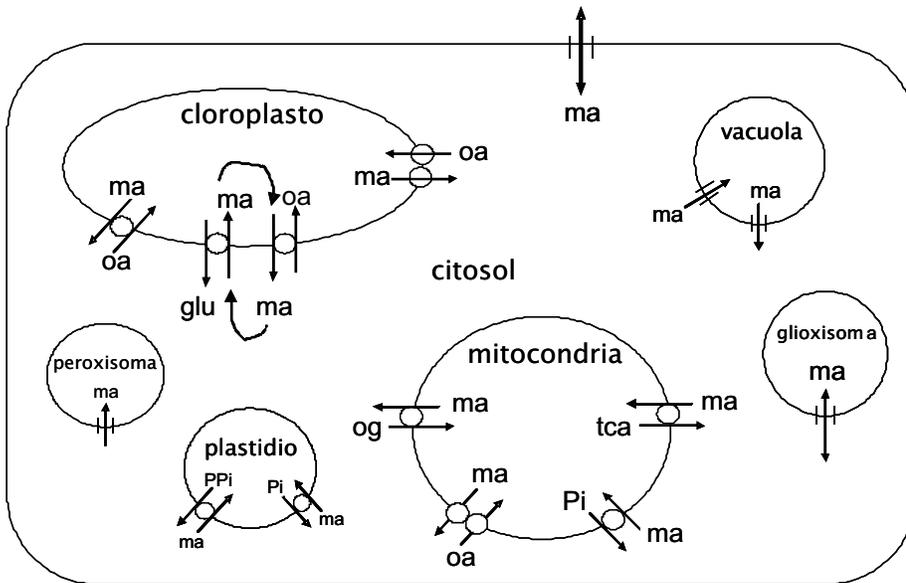
9. Posible sensor del  $\text{CO}_2$  para el canal de aniones en células guarda

10. Regulador del pH extracelular en células de capa aleurona de trigo

La mayor parte de las funciones arriba citadas se conocieron antes de la década de los 80 y sólo, a partir de los 90, se identificaron las últimas tres. En términos generales, para cumplir con estas funciones, el malato o ácido málico necesitan contar, por lo menos, con dos condiciones primordiales: 1. Controlar eficientemente los procesos metabólicos de biosíntesis y degradación, y 2. Tener mecanismos particulares de transporte a través de las distintas membranas. Como consecuencia del fino control en su transporte, estos metabolitos pueden ser compartimentalizados a nivel subcelular; el ejemplo más conocido es el almacenamiento del ácido málico en la vacuola ácida de las plantas CAM.

Con respecto a las vías metabólicas de biosíntesis y degradación, en la figura 1 se esquematizan las rutas más importantes y estudiadas (2, 3). Aún cuando todas las reacciones aparecen entrelazadas entre sí, dentro de la célula existen compartimentos propios para algunas de ellas.

En las últimas dos décadas, se ha llevado a cabo un rápido avance en el esclarecimiento del transporte, gracias al desarrollo de las técnicas de "patch clamp" y de la Biología Molecular. En virtud de que varias de las funciones dependen exclusivamente del sistema de transporte y otras, lo son de alguna manera, fue necesario incluir este aspecto para brindar un contexto más completo y actualizado. Actualmente se sabe que puede llevarse a cabo, por lo menos, a través de dos mecanismos distintos: por difusión pasiva y facilitada (mediada por acarreadores y por canales), según se muestran en la figura 2 (3, 4, 5). En esta misma figura, se observa que los acarreadores pueden ser de dos tipos: el uniporte y el antiporte. Involucradas con el



**FIGURA 2. Acarreadores y canales involucrados en el transporte de malato.** Las flechas señalan las direcciones más factibles de acuerdo a la función fisiológica que desempeña. En el caso de la mitocondria, las direcciones pueden cambiar dependiendo del estado metabólico en que se encuentre. Las abreviaturas son: ma = malato, oa = oxaloacetato, og = 2-oxoglutarato, glu = glutamato, tca = tricarboxilato, Pi = fosfato inorgánico, PPi = pirofosfato. La simbología mostrada es:

⊕ acarreador antiporte, ⊖ acarreador simporte, ⊕ acarreador uniporte

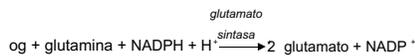
⊕ canales. Tomado de (3) y actualizado.

transporte de malato, se hallan las llamadas lanzaderas (en inglés: "shuttles") para el transporte indirecto (o intercambio) de algunas biomoléculas a través de las membranas, como la que se ilustra en la figura 3. En un futuro próximo, posiblemente se identificarán nuevas proteínas mediadoras únicas o formando parte de los sistemas de transporte de malato.

## EL MALATO COMO INTERMEDIARIO DE LOS CICLOS DE KREBS Y GLIOXILATO

La participación del malato en el ciclo de Krebs (o TCA) en la matriz mitocondrial de animales y plantas, es bien conocida. Sin embargo, algunas de las funciones que cumple la mitocondria en plantas son distintas a las de los animales, lo que puede explicar algunas de las diferencias en la especificidad de algunos transportadores ubicados en la membrana interna de la misma. Por ejemplo, se ha identificado en mitocondria de

chicharo un transportador que intercambia un malato externo por un tricarboxilato interno (ver Fig. 2), usualmente citrato. En el citosol, este citrato es entonces transformado a 2-oxoglutarato por la acción concertada de la aconitasa citosólica y la isocitrato deshidrogenasa citosólica dependiente de NADP<sup>+</sup>. El 2-oxoglutarato (og) es entonces aprovechado en la asimilación de NH<sub>3</sub> a través de la vía de la glutamina sintetasa / glutamato sintasa, de acuerdo a las siguientes reacciones.



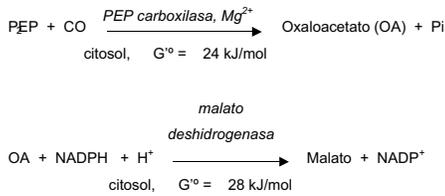
El malato externo también puede intercambiarse por fosfato inorgánico mitocondrial. A su vez, el malato interno puede intercambiarse por 2-oxoglutarato citosólico ver figura 2. Recientemente (4), se ha detectado en mitocondrias de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, la existencia de un acarreador adicional a los ya

descritos. En cuanto a la especificidad de los sustratos, es muy similar al de chicharo, excepto que éste transporta el 2-oxoglutarato y el de chicharo no. Tal acarreador podría jugar un papel importante en el flujo de ácidos orgánicos hacia el interior de la mitocondria o hacia fuera de la misma, como ocurriría en la asimilación de nitrógeno o en el alargamiento de ácidos grasos.

Por otra parte, en los glioxisomas, el malato participa dentro del conocido ciclo del glioxilato, ver figura 4. En estos organelos, también se lleva a cabo la degradación de los ácidos grasos para la producción de acetyl-CoA, la cual a su vez, es necesaria para alimentar el ciclo del glioxilato. El transporte del malato en los plastidios apenas empieza a descubrirse. Recientemente, se ha identificado en plastidios (leucoplastos) de endospermo de semilla de ricino, un acarreador que intercambia malato (citosólico) por fosfato, este malato está involucrado en la síntesis de ácidos grasos. Y otro acarreador, en embrión de maíz, que intercambia principalmente malato (citosólico) por pirofosfato relacionado con el transporte de carbono en este organelo (6), ver figura 2.

## EL MALATO COMO UN ALMACÉN DE CO<sub>2</sub> Y DE EQUIVALENTES REDUCTORES EN PLANTAS CAM Y C<sub>4</sub>

Las plantas CAM emplean el ácido málico como un almacén de CO<sub>2</sub> y de equivalentes reductores durante la noche, periodo en que permanecen abiertos los estomas. Como ejemplos de plantas CAM están las cactáceas, muy conocidas en México por nombres vulgares como órganos, nopales, pitayos, garambullos, biznagas, peyotes, viejitos, etc. La fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico en el citosol de la célula CAM, se lleva a cabo mediante las siguientes reacciones bioquímicas.



El malato, recién sintetizado en el citosol, es rápidamente guardado como ácido málico dentro de las vacuolas ácidas, alcanzando allí altas concentraciones. El transporte de este ácido orgánico, a través del tonoplasto (vacuolas), se lleva a cabo mediante la acción concomitante de un canal específico para malato, dependiente de voltaje (7), y de una  $\text{H}^+$ -ATPasa.

Durante el día, mientras los estomas se encuentran cerrados para evitar la evaporación del agua intracelular, el  $\text{CO}_2$  es recuperado a partir de la descarboxilación del ácido málico que es secretado por la vacuola al citosol, mediante la acción de la enzima málica dependiente de  $\text{NADP}^+$ , presente en el citosol y en el cloroplasto. Con este mecanismo, mediante la separación temporal de las reacciones de fijación del  $\text{CO}_2$  atmosférico de aquellas del ciclo de Calvin, las plantas CAM disminuyen considerablemente la pérdida de agua durante el día.

La reacción de la enzima málica ocurre con un  $G^{\circ} = 13 \text{ kJ/mol}$ , ver figura 1. Fácilmente puede observarse que durante la evolución en estas plantas sacrificó la formación de un ATP en la ruta directa de PEP a piruvato, con tal de lograr almacenar el  $\text{CO}_2$  y los equivalentes reductores en la molécula de malato, para después recuperarlos con facilidad. Todas las reacciones de esta ruta están favorecidas termodinámicamente en dirección del piruvato, ver figura 1.

Adicionalmente a las plantas CAM, algunas plantas tropicales como la caña de azúcar, el maíz, el sorgo y varias hierbas, poseen dos tipos de células fotosintéticas interconectadas: las del mesófilo (externas) y las de la vaina vascular (internas). Los compuestos mayoritarios que se forman en el mesófilo después de períodos muy cortos de fotosíntesis

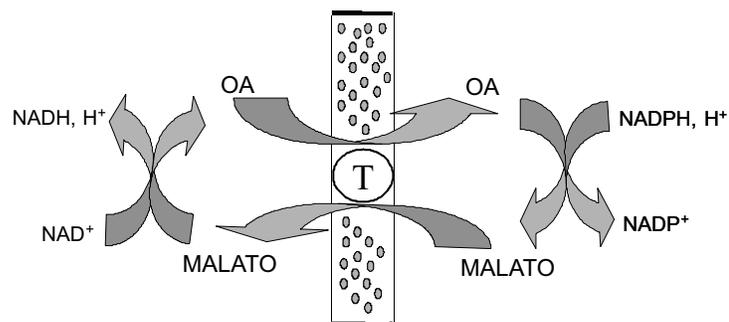
son el ácido málico y el aspártico. En virtud de que ambos son compuestos de 4 carbonos, a estas plantas se les conoce como  $\text{C}_4$ . Este mecanismo para capturar el  $\text{CO}_2$  atmosférico es altamente eficiente; de tal manera que cuando estas plantas son sometidas a sequía pueden cerrar parcialmente sus estomas sin que disminuya considerablemente su eficiencia fotosintética. Adicionalmente, las plantas con este metabolismo y el CAM pueden eliminar la fotorrespiración; un problema ocasionado por bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el interior de la célula. Los ácidos  $\text{C}_4$ , posteriormente son transportados hacia las células de la vaina vascular, en cuyas mitocondrias son descarboxilados. El  $\text{CO}_2$  liberado de esta descarboxilación, difunde al cloroplasto para entrar al ciclo de Calvin (8), ver figura 5. Con este mecanismo las plantas  $\text{C}_4$  pueden separar espacialmente (en distintas células) las reacciones de la fijación del  $\text{CO}_2$  de aquellas del ciclo de Calvin y hacer más eficiente el uso del agua. Sin embargo, recientemente se han descubierto plantas (*Bienertia cycloptera* y *Borszczowia aralocaspica*) que pueden presentar fotosíntesis  $\text{C}_4$  con la participación de una sola célula (9).

### EL ÁCIDO MÁLICO COMO TRANSPORTADOR DE EQUIVALENTES REDUCTORES MEDIANTE LA LANZADERA OXALOACETATO/ MALATO

En la membrana interna del cloroplasto-

to de maíz y espinaca, existe una proteína que importa específicamente oxaloacetato (OA), ver figura 2, la cual participa en el sistema de transporte tipo lanzadera malato/OA, cuyo funcionamiento detallado se muestra en la figura 3. Actualmente se sugiere que se trata de un antiporte (5). Por otro lado, en un estudio hecho en mitocondrias obtenidas de hojas y talluelos etiolados de chícharo, reporta la existencia de un transportador uniporte que exporta malato hacia el citosol y de un transportador, también uniporte, que importa oxaloacetato. Ambas moléculas constituyen un sistema tipo lanzadera mitocondrial malato/OA para la exportación de equivalentes reductores ( $\text{NADH}$ ) producidos en la matriz mitocondrial. La existencia de dos transportadores uniportes en plantas hace una diferencia con el transporte en mitocondria de animales, en los cuales el transportador es un antiporte. También, se ha sugerido que el transporte de equivalentes reductores ( $\text{NADH}$ ) del citosol hacia el peroxisoma se lleva a cabo a través del mismo tipo de lanzadera malato/OA.

La facilidad de transportación del malato, en comparación con la impermeabilidad de muchas membranas a  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ , permite llevar a cabo esta función intracelular. Se lleva a cabo un transporte indirecto e intercambio de equivalentes reductores del cloroplasto ( $\text{NADPH}$ ) hacia el citosol ( $\text{NADH}$ ) o hacia el peroxisoma.



**FIGURA 3. Lanzadera de poder reductor en el cloroplasto.** Intercambio indirecto y transporte de equivalentes reductores, entre el estroma ( $\text{NADPH}$ ) y el citoplasma ( $\text{NAD}$ ) a través de la membrana interna del cloroplasto. Esta lanzadera requiere de la actividad de un acarreador antiporte malato/oxaloacetato, el cual está indicado con una letra T. La lanzadera funciona gracias a la especificidad de las isoenzimas malato deshidrogenasas ( $\text{MDH}$ ) por sus coenzimas. Tomado de (2)

## EL MALATO COMO REGULADOR DE LA OSMOLARIDAD INTRACELULAR

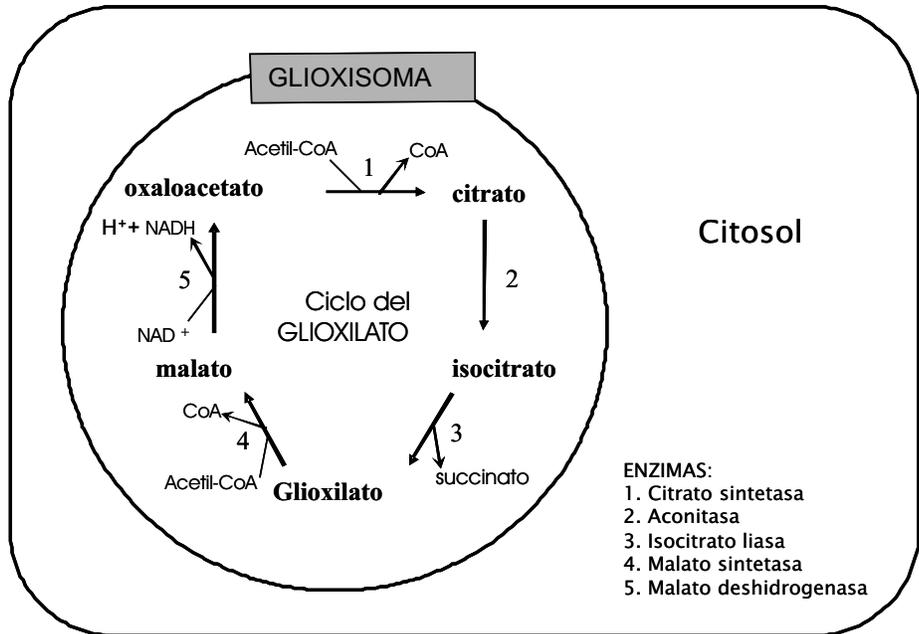
El ejemplo más conocido de esta función ocurre en el movimiento de las células guarda. Se ha publicado que el cierre de los estomas en estas células está acompañado por la salida de  $K^+$  y  $Cl^-$ , por la degradación de malato y por una salida inicial de malato. Durante la apertura (entrada de  $K^+$  y  $Cl^-$ ) se acumulan grandes cantidades de malato, de 38 mM (cerrado) a 75 mM (abierto) o hasta 145 mM si no hay suficiente  $Cl^-$  externo, según los estudios hechos en *Vicia faba*. Los iones cloruro y malato son los principales aniones en el balance de las cargas del ión  $K^+$ . Aparentemente la preferencia por alguno de los iones depende de las condiciones del ambiente en que se encuentre la planta y del tipo luz. La apertura estimulada por luz azul (pero no por la roja) incrementa la concentración intracelular de malato hasta un 173%.

## EL MALATO COMO COMPENSADOR DE CATIONES O ANIONES ABSORBIDOS EN EXCESO POR LAS CÉLULAS DE RAÍZ

Mientras que la absorción excesiva de cationes del suelo por las células de raíz es contrarrestada por una síntesis de malato; la absorción de aniones en exceso conduce a una degradación del mismo; según se ha detectado en plantas de jitomate y de maíz. Se ha postulado que cuando la absorción de nitrato ocurre en exceso y éste es transportado hacia el tallo, existe una cierta cantidad de malato en el tallo que es transportado, en sentido contrario, hacia la raíz. En las células de la raíz, el malato puede ser descarboxilado y, el  $HCO_3^-$  producido, excretado al medio externo.

## EL ÁCIDO MÁLICO COMO ACIDIFICANTE DEL SUELO PARA DISOLVER FOSFATOS

La baja disponibilidad del fósforo



**FIGURA 4. Ciclo del glioxilato.** El malato es un metabolito esencial de este ciclo. En las plantas se lleva a cabo en los glioxisomas; en los cuales también existen las enzimas necesarias para la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos; ambas rutas metabólicas juegan un papel fundamental en la conversión de los lípidos de reserva que se hallan en los cuerpos lipídicos de las semillas a sacarosa. A través de la  $\beta$ -oxidación se produce acetil-CoA, la cual alimenta del ciclo del glioxilato. A su vez, el succinato desprendido del ciclo se incorpora al ciclo de Krebs para producir el oxaloacetato necesario para la gluconeogénesis.

(mayoritariamente en forma de fosfato insoluble) es una de las mayores limitantes para el crecimiento de la planta. Generalmente, la concentración de fósforo soluble es muy baja, menor de 5  $\mu$ M, comparada con la cantidad total unida a minerales, a sitios cargados eléctricamente o en compuestos orgánicos, todas ellas inaccesibles a las plantas (10). Una deficiencia de fosfato estimula la excreción de ácido málico y cítrico en raíces de vid y garbanzo, activando su solubilización en el suelo. Se ha sugerido que el malato es sintetizado en el tallo para luego ser transportado hacia las raíces. El ácido málico es frecuentemente un importante componente del exudado celular (11). Las especies de la familia Proteaceae, capaces de crecer en suelos pobres, excretan las mayores cantidades de ácido málico (12). Aparentemente, un 60% de éstos proviene del carbono de azúcares que se exportan desde las hojas, a través del tallo, hacia la raíz (13).

## EL MALATO COMO AMORTIGUADOR DEL pH CITOSÓLICO

La biosíntesis y degradación de ácidos orgánicos, particularmente del ácido málico, juegan un papel importante en la regulación del pH citosólico. Cuando se aplican tratamientos que pueden alcalinizar el citosol, la biosíntesis de ácido málico es estimulada y su concentración intracelular total aumenta. Cuando el citosol de células de *Acer pseudoplatanus* se acidifica, la incorporación de  $CO_2$  en malato se ve muy disminuida y el consumo neto de malato puede explicar hasta un 55% del consumo de protones ( $H^+$ ), durante la recuperación de la homeostasis del pH citosólico. Tal mecanismo es considerado de rápida respuesta y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) es una de las enzimas críticas. Cuando se produce *in vitro* un incremento en el pH de 6 a 8, la PEPC se activa considerablemente. Sin embargo, también se ha encontrado que la PEPC es fuertemente regulada por la concentración del complejo PEP-Mg y por el malato

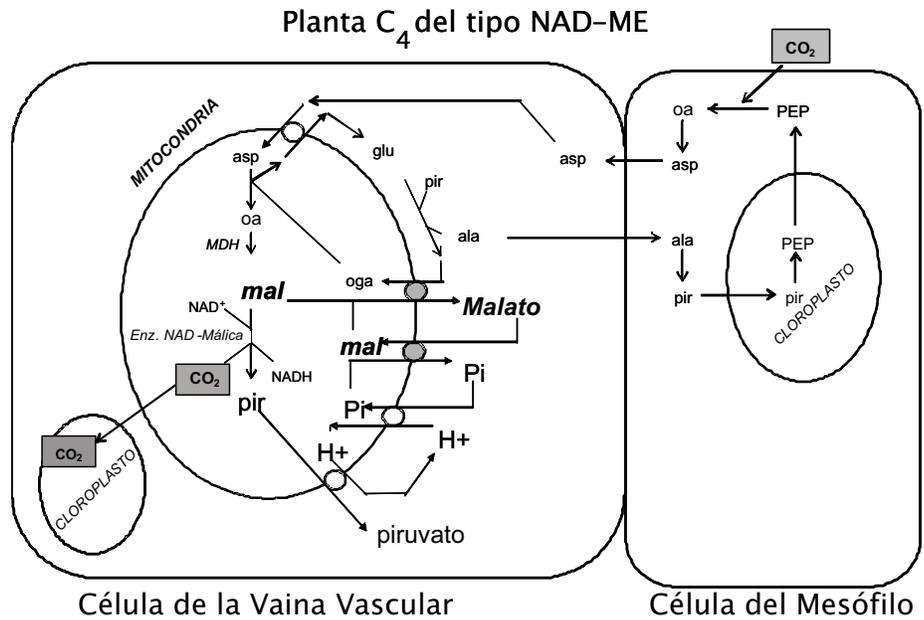
como inhibidor, además de otros metabolitos, tales como los aminoácidos alanina y glicina o la glucosa-6-fosfato (14). Aparentemente, la regulación de la PEPC es más compleja que la de un simple cambio en el pH citosólico; inclusive se presume de la existencia de isoenzimas con propiedades de regulación distintas entre ellas mismas. Tampoco puede asegurarse que la producción y almacenamiento de malato pueda ser exclusivamente dependiente de esta enzima.

### EL MALATO COMO QUELANTE DE CATIONES TÓXICOS ( $Al^{3+}$ ) EN EL SUELO

Cuando el catión  $Al^{3+}$  se encuentra en el suelo en concentraciones del orden micromolar puede inhibir rápidamente el crecimiento de la raíz de muchas especies vegetales. En plantas tolerantes al catión  $Al^{3+}$ , se ha encontrado que éstas exudan aniones orgánicos como el malato y el citrato para quelar (secuestrar) este catión tóxico (15) presente en la rizosfera. De manera particular se ha reportado que el  $Al^{3+}$  estimula la secreción de malato en células de raíz tolerantes a  $Al^{3+}$  en trigo y triticale (16), de nabo (17) y de eucalipto (18). Asimismo, se ha demostrado que tal secreción se lleva a cabo a través de un canal de aniones (19).

### EL MALATO COMO SENSOR DE $CO_2$ EN EL CANAL DE ANIONES DE LAS CÉLULAS GUARDA

El malato puede ser parte del mecanismo sensor de  $CO_2$  en la modulación de la actividad del canal de aniones (GCAC1) en las células guarda del estoma. Como ya se mencionó, durante la apertura de los estomas, el almidón desaparece de los cloroplastos al mismo tiempo que los iones  $K^+$  entran a las células guarda. El cierre de los estomas, por su parte, está acompañado por la salida de los iones  $K^+$  y  $Cl^-$ , pero también acompañado por la degradación de malato. Estudios con técnicas de "patch clamp" han demostrado que hay un canal de aniones, dependiente de voltaje, que



**FIGURA 5. Participación del malato en la fijación de  $CO_2$  en una planta  $C_4$  (*Panicum miliaceum*) del tipo  $NAD^+$ -ME.** Esta especie pertenece a uno de los tres tipos de plantas  $C_4$ ; los otros dos difieren en sus mecanismos de transporte y descarboxilación de los ácidos. La mayoría de las plantas  $C_4$  poseen dos tipos de células fotosintéticas, las de la vaina vascular y las del mesófilo. En esta planta, el aspartato es transportado hacia la célula de la vaina vascular, donde es convertido a oxaloacetato mediante la aspartato-aminotransferasa mitocondrial. El oxaloacetato es posteriormente transformado a malato por la malato-deshidrogenasa, el cual es descarboxilado por la enzima  $NAD^+$ -malica mitocondrial. El  $CO_2$  liberado es retomado por la ribulosa-bisfosfato carboxilasa. En la membrana interna de la mitocondria de las células de la vaina vascular existe la participación de dos acarreadores antiportes ( $\text{mal}^+$ ) de malato. Gracias a este diseño metabólico la planta puede aprovechar con mayor eficiencia el  $CO_2$  externo y mantener más tiempo cerrados los estomas, evitando así una pérdida innecesaria de agua. Tomado de (8).

es ligeramente permeable a malato y que se encuentra localizado en la membrana plasmática de las células guarda. Este canal es modulado por señales intra y extracelulares; por ejemplo, las auxinas y el malato pueden dirigir la compuerta de acción. Particularmente, una variación en la concentración externa de malato de tan solo 0.4 mM, puede originar un cambio de 38 mV en el potencial transmembranal. Como el sitio de unión responsable para el cambio en la compuerta se encuentra en la superficie de la cara extracelular del canal y como el malato se halla también en el apoplasto, se ha planteado la posibilidad de que el malato participe como una parte del sensor de  $CO_2$  de la planta (20). Adicionalmente, el malato puede influir sobre la alternancia entre las conductancias rápidas y lentas del canal de aniones de la membrana

plasmática (21).

### EL ÁCIDO MÁLICO COMO REGULADOR DEL pH EXTRACELULAR

La función del ácido málico como un acidificante importante del medio extracelular se ha establecido claramente en células de raíz y en las células de la capa de aleurona de cebada y trigo. Sin embargo, por los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental con capas de aleurona de trigo, hemos propuesto que el ácido málico puede amortiguar el pH extracelular, alrededor de 4, y no actuar solamente como un acidificante (22).

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Podemos concluir que las múltiples funciones que desempeña el ácido

málico derivan de sus propias características físicas y químicas que han encajado perfectamente en la bioquímica y fisiología de los vegetales. Tratándose de una molécula de bajo peso molecular que es transportada con mucha facilidad a través de la mayoría de las biomembranas, puede desempeñar con eficiencia el papel de osmorregulador. Por su  $pK_a$  más bajo (aprox. de 3.3) puede funcionar como un acidificante o regulador de pHs bajos y por su  $pK_a$  más alto (aprox. 5.1), como un amortiguador de pHs más altos (aprox. 6-7), como en el citosol por ejemplo. Por su facilidad

para incorporar y liberar  $CO_2$  ha resultado ser ideal para la fijación y almacenamiento de carbono en las plantas CAM y  $C_4$ . Por formar parte de un par redox estable, juega un papel determinante en el transporte indirecto de equivalentes reductores del tipo NADH y NADPH. La capacidad para formar quelatos estables con cationes tóxicos como el  $Al^{3+}$  es aprovechada por algunas plantas para crecer y prosperar en suelos contaminados por este tipo de iones.

El estudio de las funciones del ácido málico en plantas no puede considerarse terminado, ya que se

encuentra muy relacionado con los eventos bioquímicos y fisiológicos antes descritos, los que todavía no han sido esclarecidos a plenitud. Por ejemplo, podemos citar la participación del malato en el movimiento de las células guarda o el mecanismo de secreción/absorción de ácido málico por las células de aleurona a diferentes pHs externos. Por otro lado, hasta la fecha no conocemos ningún reporte de participación en los procesos nucleares, ¿acaso no cumple alguna función o es que no se ha detectado? Resultaría muy interesante descubrir un nuevo papel en este campo.

## REFERENCIAS

1. Alberty R A (1998) Calculation of standard transformed Gibbs energies and standard enthalpies of biochemical reactants. *Arch Biochem Biophys* 353: 116-130
2. Lance C y Rustin P (1984) The central role of malate in plant metabolism. *Physiol Vég* 22: 625-641
3. Martinoia E y Rentsch D (1994) Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 447-467
4. Picault N, Palmieri L, Pisano I, Hodges M y Palmieri F (2002) Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. *J Biol Chem* 277: 24204-24211
5. Taniguchi Y, Nagasaki J, Kawasaki M, Miyake H, Sugiyama T y Taniguchi M (2004) Differentiation of dicarboxylate transporters in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Cell Physiol* 45: 187-200
6. Lara-Núñez A y Rodríguez-Sotres R (2004) Characterization of a dicarboxylate exchange system able to exchange pyrophosphate for L-malate in non-photosynthetic plastids from developing maize embryos. *Plant Sci* 166: 1335-1343
7. Pantoja O y Smith JAC (2002) Sensitivity of the plant vacuolar malate channel to pH,  $Ca^{2+}$  and anion-channel blockers. *J Membrane Biol* 186: 31-42
8. Taniguchi M y Sugiyama T (1997) The expression of 2-oxoglutarate/malate translocator in the bundle-sheath mitochondria of *Panicum miliaceum*, a NAD-malic enzyme-type  $C_4$ , is regulated by light and development. *Plant Physiol* 114: 285-293
9. Edwards G E, Franceschi V R y Voznesenskaya E V (2004) Single-cell  $C_4$  photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annu Rev Plant Biol* 55: 173-196
10. Randall P J, Hayes J E, Hocking P J y Richardson A E (2001) Root exudates in phosphorus acquisition by plants. En: *Plant Nutrient Acquisition: New Perspectives*, ed. N Ae, J Arihara, K Okada, A Snirivasan. Springer-Verlag, Tokio
11. Ryan P R, Delhaize E y Jones D L (2001) Function and mechanism of organic anion from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 527-560
12. Sas L, Rengel Z y Tang C (2001) Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Sci* 160: 1191-1198
13. Massonneau A, Langlade N, Leon S, Smutny J, Vogt E, Neumann G y Martinoia E (2001) Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and

energy status. *Planta* 213: 534-542

14. Tovar-Méndez A, Rodríguez-Sotres R, López-Valentín D M y Muñoz-Clares R A (1998) Re-examination of the roles of PEP and Mg<sup>2+</sup> in the reaction catalyzed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*. Effects of the activators glucosa-6-phosphate and glycine. *Biochem J* 332: 633-642
15. Ma J F, Takeda S y Yang Z M (2000) Al tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked with organic acid release in Triticale. *Plant Physiol* 122: 1-8
16. Hayes J E y Ma J F (2003) Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic metabolism in triticale roots. *J Exp Bot* 54: 1753-1759
17. Ligaba A, Shen H, Shibata K, Yamamoto Y, Tanakamaru S y Matsumoto H (2004) The role of phosphorus in aluminum-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiol Plant* 120: 575-584
18. Silva I R, Novais R F, Jham G N, Barros N F, Gebrin F O, Nunes F N, Neve J C y Leite F P (2004) Responses of eucalypt species to aluminum; the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. *Tree Physiol* 24: 1267-1277
19. Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn S J, Ryan P R, Delhaize E y Matsumoto H (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J* 37: 645-653
20. Hedrich R y Marten I (1993) Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO<sub>2</sub> sensor to guard cells. *EMBO J* 12: 897-901
21. Raschke K (2003) Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells affected by external malate. *Planta* 217: 651-657
22. Martínez-Camacho J L, González-de la Vara, Hamabata A, Mora-Escobedo R y Calderón-Salinas V (2004) A pH-stating mechanism in isolated wheat (*Triticum aestivum*) aleurone layers involves malic acid transport. *J Plant Physiol* 161: 1289-1298

# LA SENESCENCIA REPLICATIVA COMO UNA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS\*

NORMA EDITH LÓPEZ-DIAZGUERRERO, CINTIA MAYEL MARTÍNEZ GARDUÑO y MINA KONIGSBERG FAINSTEIN.<sup>1</sup>

## RESUMEN

La senescencia replicativa es un fenómeno que se observa tanto *in vivo* como *in vitro* y se inicia en el momento en el que las células alcanzan el límite de Hayflick y dejan de dividirse. El ciclo celular se suspende de manera permanente y las células quedan detenidas en la fase G0/G1 del mismo. Las células senescentes por lo tanto, no responden a mitógenos, sin embargo permanecen vivas, aunque metabólicamente alteradas. Una característica importante de este tipo de células es que no son susceptibles a estímulos apoptóticos.

Se ha sugerido que la senescencia replicativa pudiera ser un mecanismo celular de respuesta frente al estrés, y que esta respuesta se relaciona con la supresión de tumores, y al mismo tiempo con el deterioro fisiológico asociado al envejecimiento.

**PALABRAS CLAVE:** Senescencia, apoptosis, cáncer, envejecimiento, cultivos primarios.

## ABSTRACT

Replicative senescence has been observed *in vivo* and *in vitro*, and it starts at the moment when the cells reach Hayflick's limit and stop dividing. This arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle is permanent. Even though, senescent cells do not respond to mitogens, they remain alive, but they present metabolic alterations. An important feature of this kind of cells is that they are not susceptible to apoptotic stimulus. It has been proposed that replicative senescence is a tumor suppressor mechanism and at the same time it relates to the deterioration associated to aging.

**KEY WORDS:** Senescence, apoptosis, cancer, aging, primary cultures.

## ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Hasta la mitad del siglo pasado se pensaba que las células en cultivo se dividían indefinidamente si se les proporcionaba el medio adecuado. Lo cual implicaba que, en condiciones favorables, las células de un organismo podían vivir más que el organismo del que provienen. Lo anterior se basó en los experimentos realizados por A. Carrell (1912), en los cuales disoció células provenientes de corazón de pollo y las mantuvo en subcultivos seriados por más de 40 años. Esto lo llevó a concluir que las células eran capaces de proliferar indefinidamente (células inmortales) y que la mortalidad del organismo era una consecuencia de la multicelularidad (Fig. 1A).

Años después, se descubrió que el medio que utilizaba en sus cultivos

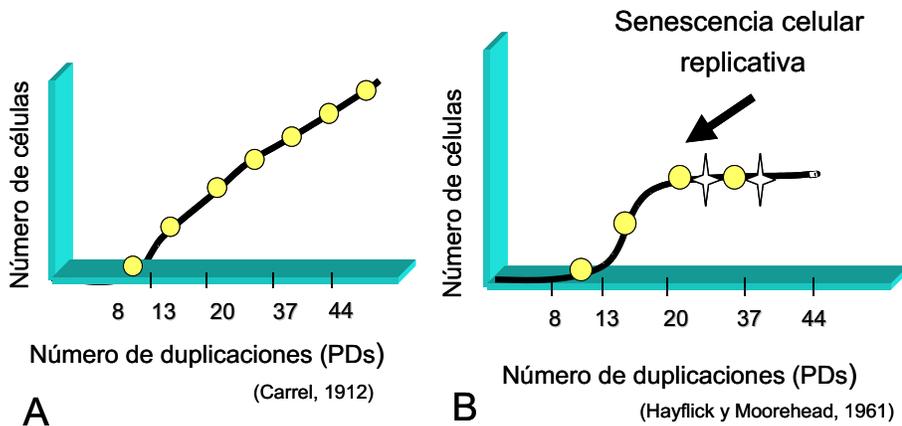
contenía células frescas y viables obtenidas de los corazones de pollo, y que esto era lo que mantenía al cultivo "inmortal". En 1961, L Hayflick y PS Moorehead (1) descubrieron que las células humanas en cultivo se dividían un número finito de veces. Ellos intentaron aislar virus causantes de cáncer por exposición de las células humanas normales a extractos de células con cáncer, pero nunca pudieron pasar del primer paso de sus experimentos, pues sus células dejaban de dividirse después de 50 o 60 duplicaciones poblacionales (PD), los cuales se calculan como el número de veces que la población celular duplica su número durante el curso del cultivo, y concluyeron que las células normales en cultivo se dividían en un número finito de veces. Actualmente

esto se conoce como límite de Hayflick (1) y al proceso que limita la división celular se le conoce como senescencia celular o senescencia replicativa, y en los cultivos viene acompañado con una progresiva acumulación de células senescentes (Fig. 1B).

En 1995 se tuvo la primera demostración de la existencia de células senescentes *in vivo* en dermis de humano utilizando un ensayo histoquímico para -galactosidasa (2). No obstante, por muchos años no fue posible volver a demostrar la presencia de células senescentes *in vivo*, y permanecía la duda de si los cambios morfológicos y funcionales asociados a este fenómeno eran únicamente cambios que ocurrían *in vitro* y solo en casos excepcionales *in vivo*. Afortu-

\* Recibido: 8 febrero 2005 Aceptado: 5 julio 2005 Este artículo se publicó extemporaneamente.

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. A.P. 55-535, 09340 México, D.F. Teléfono 5804-4732, Fax 5804-4727. Correo E: mkf@xanum.uam.mx



**FIGURA 1. Comportamiento de las células en los cultivos primarios**

A. Hasta 1961 se pensaba que los cultivos primarios podían ser inmortales si estaban suplementados con los medios adecuados.

B. A partir de 1961, con los experimentos de Hayflick y Moorehead, se demostró que los cultivos primarios tenían un número finito de duplicaciones celulares, después de las cuales entraban en una etapa a la que se llamó senescencia. El momento en el que las células llegan a este punto se conoce como límite de Hayflick.

nadamente, dos estudios recientes han aportado demostraciones convincentes de que el fenómeno de senescencia ocurre en las células *in vivo*. En uno de ellos, se usaron ratones con alteraciones en los telómeros, a los cuales se les practicó una hepatectomía parcial. En un organismo normal lo que se esperaría es que los hepatocitos se duplicaran para regenerar al hígado. En este experimento, los hepatocitos no sólo presentaron una limitada habilidad para proliferar y regenerar el hígado, sino que la mayoría de ellos suspendieron la progresión del ciclo celular convirtiéndose en células senescentes (3). En el segundo estudio, se emplearon ratones con linfoma que sobreexpresaban a la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Se trató a los ratones usando un agente quimioterapéutico para inducir apoptosis. Sin embargo, se observó que cuando la apoptosis estaba bloqueada por la sobreexpresión de *bcl-2*, las células de linfoma incapaces de iniciar un programa de muerte, detenían su proliferación y se transformaban en células senescentes (4). Estos estudios apoyan el hecho muchas veces postulado, de que es posible que en un tejido *in vivo* puedan convivir células senescentes y pre-senescentes al mismo tiempo.

### EL FENOTIPO SENESCENTE

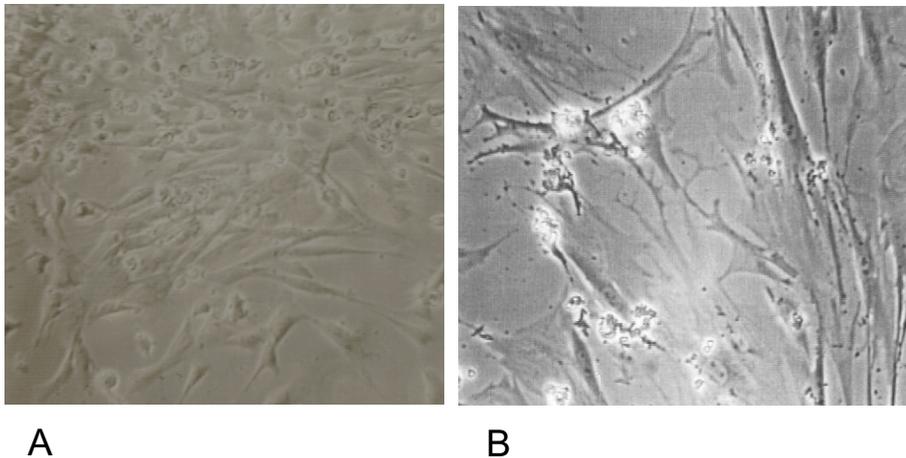
La senescencia replicativa se observa en las células que tienen potencial para el recambio y en los organismos pluricelulares y no en las células postmitóticas como las neuronas maduras o las células de músculo. Las células senescentes permanecen vivas por largos períodos de tiempo. Metabolizan ARN y proteínas, responden a señales del medio ambiente y retienen muchas características de las células pre-senescentes, ya que ambas expresan muchos genes en común, algunos de los cuales siguen siendo inducibles por estímulos externos a lo largo de todo su tiempo de vida. Hay tres características que diferencian a las células senescentes de las otras células: en primer lugar, son incapaces de proliferar en respuesta a estímulos mitogénicos, ya que se encuentran arrestadas en la fase G0/G1 de ciclo celular, y esta detención, a diferencia de la quiescencia, es irreversible. En segundo lugar, las células senescentes presentan cambios fenotípicos en su aspecto general y alteraciones específicas en sus funciones diferenciadas. Esto último es diferente en cada caso y depende del tipo celular del que se trate. Morfológicamente, las células senescentes se observan

como células grandes y aplanadas, con una gran cantidad de vacuolas (Fig. 2). Incrementan su biogénesis de lisosomas y reducen su velocidad de síntesis y degradación de proteínas. Además de que se presentan cambios en la regulación y expresión de genes específicos. Por ejemplo, en el endotelio senescente humano, hay un marcado incremento en la expresión de la interleucina 1 (IL-1) y la molécula de adhesión I-CAM. En las células adrenocorticales epiteliales, la senescencia causa una pérdida selectiva en la habilidad de inducir a la 17 hidroxilasa, una enzima clave en la biosíntesis del cortisol. Mientras que los fibroblastos humanos al senescer presentan un importante incremento en la expresión de colagenasa y estromielicina, y disminuyen la expresión de los inhibidores de metaloproteinasas de tejidos 1 y 3 (TIMP-1 y TIMP-3), por lo que en lugar de generar matriz extracelular, están produciendo proteínas que la degradan. Lo anterior sugiere que la acumulación de células senescentes puede alterar el entorno en el que se sitúan y estos cambios, a la larga, pueden ser más importantes que la suspensión de la proliferación celular en sí misma (5).

La tercera particularidad que caracteriza a las células senescentes, es que son resistentes a estímulos que inducen la muerte por apoptosis. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta resistencia o los factores que la promueven, aún se desconocen, pero este hecho podría explicar porqué las células senescentes, a pesar de estar metabólica y fisiológicamente alteradas se acumulan *in vivo* (6).

### LA SENESCENCIA REPLICATIVA Y EL ACORTAMIENTO DE LOS TELÓMEROS

No se sabe con certeza que es lo que induce a una célula a detener su proliferación y a convertirse en una célula senescente; sin embargo, una de las primeras propuestas sugirió que el acortamiento de los telómeros o el desarreglo de la estructura telomérica,



**FIGURA 2. Cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón**

A. Fotografía de fibroblastos durante la fase logarítmica de crecimiento. (Aumento de la fotografía 40X).

B. Fotografía de fibroblastos durante la fase de senescencia replicativa. (Aumento de la fotografía 100X). Las células senescentes aumentan su tamaño y presentan una morfología extendida y aplanada. Asimismo, la densidad celular en los cultivos senescentes es menor que en los cultivos jóvenes.

conllevar a la activación de múltiples y diversos mecanismos de señales que detienen la división celular. Los telómeros son la parte terminal de los cromosomas, de ahí su nombre, (del griego *telos-* final). Al parecer, su función es la de mantener la estabilidad estructural de los cromosomas y evitar las fusiones entre ellos. Estudios realizados con el protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* demostraron que los telómeros están formados por secuencias repetidas, altamente conservadas, ricas en guaninas que en vertebrados consisten de la secuencia TTAGGG. El número de copias de esta secuencia varía dependiendo de la especie. En humanos es alrededor de 3-15 kilopares de bases (kpb) mientras que en ratones es de 30 a 100 kpb (ver: Telómeros y telomerasa, ¿Llaves de la inmortalidad celular? en REB 2002, 21:50).

Aunque experimentalmente se ha logrado superar el límite de Hayflick y por lo tanto la senescencia replicativa, insertando el gene de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa hTERT (7), en los últimos años, el papel protagónico de los telómeros como motor de la senescencia celular ha decaído, puesto que se ha logrado

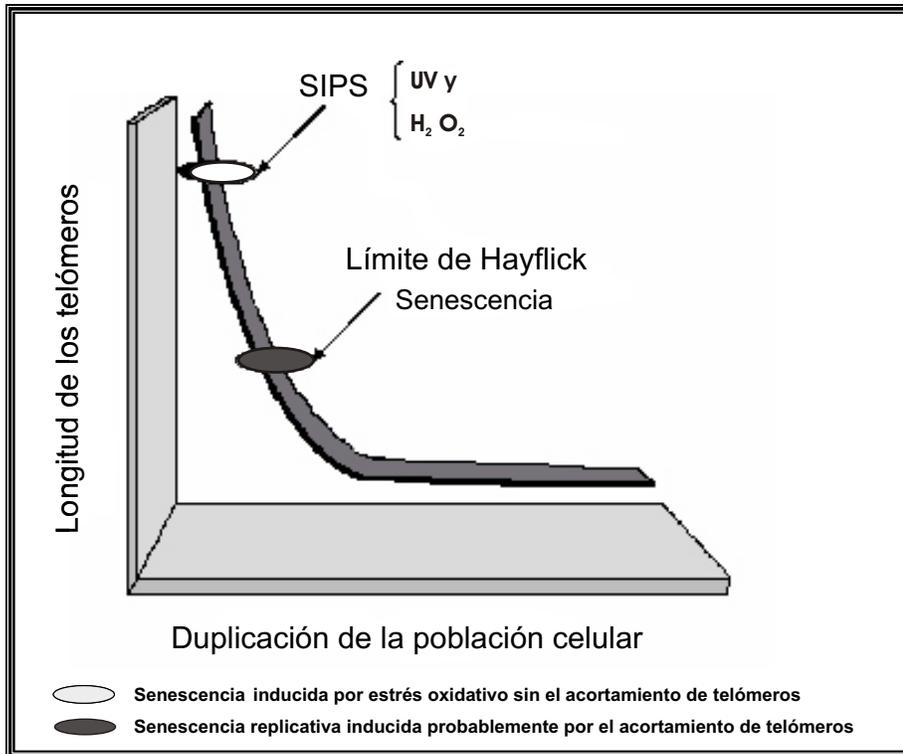
inducir la senescencia sin el acortamiento de los mismos. Se ha propuesto que existen otros mecanismos que inducen a las células a detener su proliferación celular y entrar en senescencia. Se ha sugerido que dentro de los factores que inducen la senescencia se encuentra el estrés oxidativo. Éste es capaz de ocasionar daños a nivel del ADN y ello promovería el arresto celular. Experimentalmente se ha logrado inducir senescencia sometiendo a las células a concentraciones subletales de agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (8). A este fenómeno se le ha denominado senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) y presenta un fenotipo similar al observado en la senescencia replicativa normal. Se ha reportado la inducción de SIPS por otros tratamientos como son las radiaciones UV y ; por hiperoxia oxidante (8,9), o bien mediante el uso de inhibidores de desacetilasas de histonas o la sobreexpresión de genes como *ras* y *raf*. Sin embargo, existe controversia con respecto al mecanismo por el cual estas células entran en senescencia ya que se ha encontrado que en algunas ocasiones se relaciona al acortamiento de los telómeros y en otras no. De

hecho, se ha logrado inducir SIPS en células inmortalizadas que sobreexpresaban hTERT, sugiriendo que en estos casos, la presencia de la telomerasa no protegió a las células de SIPS (Fig. 3). En esos experimentos se observó que dichas células fueron más resistentes a la apoptosis y la necrosis inducida por estrés, sugiriendo un mecanismo de reparación en el que se podría encontrar involucrada la enzima telomerasa (10).

Aún cuando se ha cuantificado la expresión génica de una gran cantidad de moléculas implicadas en la senescencia replicativa y la SIPS, para comprender los mecanismos involucrados aún quedan muchas dudas por resolver.

## GENÉTICA DE LA SENESCENCIA REPLICATIVA

Al parecer, el límite en la capacidad replicativa de las células es un fenotipo dominante. Esta aseveración se basa en estudios de fusión de células primarias somáticas normales (tanto de células humanas como de ratones) con células inmortales derivadas de tumores. En la mayoría de los casos las células híbridas proliferaron por un tiempo y eventualmente senescieron. Este experimento, entre otros, sugiere fuertemente que la senescencia es una característica genéticamente dominante, mientras que la inmortalidad replicativa es genéticamente recesiva. Por lo que se esperaría que la senescencia replicativa generara una regulación selectiva de ciertos genes, cuya participación fuera importante para la progresión de G1 y la síntesis de ADN. La información que existe hasta el momento es aún incompleta, pero se han obtenido algunos datos interesantes, principalmente en fibroblastos humanos. Se ha reportado que la respuesta temprana a la estimulación mitogénica se induce en las células senescentes aproximadamente en los niveles y con la cinética normales (5). Por lo que se cree que las células senescentes no tienen una falla generalizada en todos los mecanismos de transducción de



**FIGURA 3. Senescencia replicativa y longitud de los telómeros.**

La suspensión del ciclo celular y el cese de la proliferación, que conllevan al inicio de la senescencia, se han relacionado al acortamiento de los telómeros. Sin embargo, otro tipo de condiciones estresantes para la célula, como son el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la exposición a la radiación también pueden inducir la senescencia de manera prematura, ya sea con o sin el acortamiento de los telómeros.

señales de factores de crecimiento, pero sí en algunos genes cuya respuesta temprana es esencial para iniciar la progresión del ciclo celular. Se ha reportado que tres genes indispensables para comenzar la síntesis de ADN no responden en las células senescentes, ellos son el proto-oncogen *c-fos*, que codifica para un componente del factor de transcripción AP-1; y los genes *Id1* e *Id2* que codifican para reguladores negativos de factores de transcripción hélice-asa-hélice (helix-loop-helix, bHLH). Algo parecido ocurre con los genes que normalmente se inducen en la etapa tardía de G1 o en la interfase de G1/S, que no se expresan en las células senescentes. Esto sucede con los genes responsables de la replicación de histonas, los genes que codifican para las ciclinas A y B, la cinasa dependiente de ciclinas *cdc2*, así como los genes de algunas enzimas necesarias para el metabolismo del ADN como la timidincinasas

(TK), DNA polimerasa y la dihidrofolato reductasa (DHFR). Además, se presenta una actividad deficiente en los factores de transcripción E2F1, E5F5 (5).

Se ha reportado que la proteína del retinoblastoma (Rb) se encuentra hipofosforilada en las células senescentes, deteniendo la proliferación en la fase G1 del ciclo. La participación de la proteína supresora de tumores p53 también es crítica debido a que puede controlar la respuesta de senescencia por acortamiento de los telómeros, daño al ADN, señales mitogénicas suprafisiológicas o de oncogenes. Una de las vías más conocidas por la que p53 induce senescencia es por inducir la sobreexpresión de *p21*, que inhibe la transición G1/S. Se ha reportado que en fibroblastos humanos *p21* se encuentra transitoriamente elevada durante la senescencia replicativa y cuando ésta disminuye después de algunas

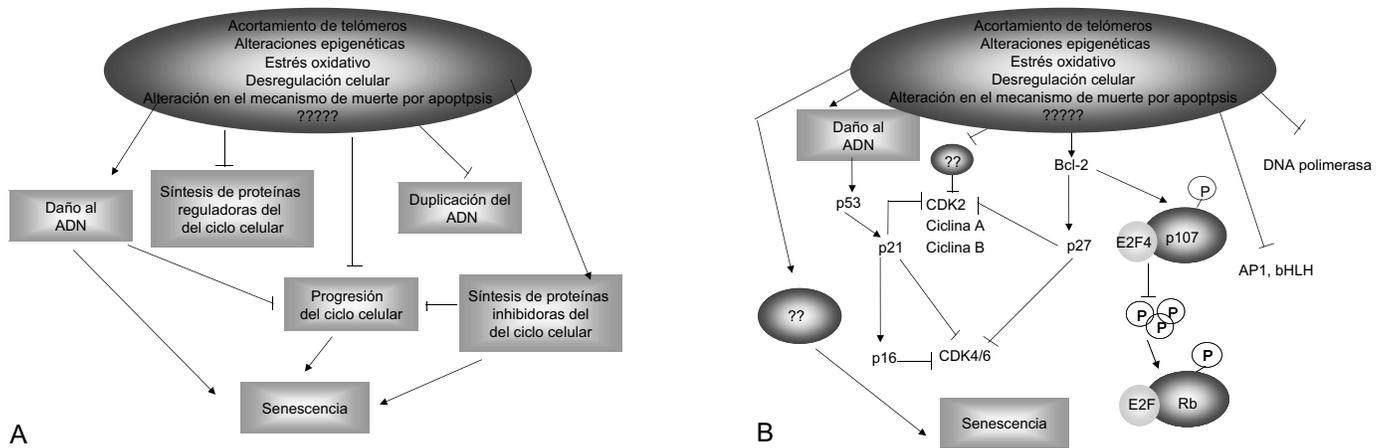
semanas, aumenta p16 que puede actuar manteniendo la detención del ciclo celular (11). Por otro lado, se ha visto que cuando se hiperfosforila la proteína Rb, o se inhibe a la proteína p53 (por ejemplo por el antígeno largo T del virus SV40), se bloquea la entrada a la senescencia replicativa y se dispara la proliferación celular indefinida (Fig. 4).

### SENESCENCIA CELULAR Y SUPRESIÓN DE TUMORES

Se ha sugerido que la senescencia replicativa sea al mismo tiempo un mecanismo de supresión de tumores y un factor contribuyente en el envejecimiento de los organismos. En una primera instancia, esto podría parecer contradictorio, sin embargo, algunas teorías evolucionistas del envejecimiento (12) proponen que existen diversos rasgos o características que se han seleccionado para optimizar la salud o la adaptación al medio durante la etapa reproductiva, pueden llegar a ser dañinos o deletéreos en otra etapa de la vida (antagonismo pleiotrópico). De modo que la senescencia replicativa pudo haberse seleccionado (al menos en mamíferos) para proteger al organismo contra neoplasias en etapas tempranas de la vida, antes y durante la reproducción. Empero, la acumulación de células senescentes, que tienen un fenotipo disfuncional y enrarecen el ambiente, no sólo hace que la función e integridad del tejido en el que se encuentran decaiga, sino que fomentan una disregulación metabólica en las células vecinas que las lleva a incrementar las posibilidades de iniciar un proceso de cáncer (13) (Fig. 5).

### LA SENESCENCIA REPLICATIVA Y EL ENVEJECIMIENTO

Lo anterior conlleva directamente a relacionar el deterioro producido por la acumulación de las células senescentes en un tejido con el fenómeno del envejecimiento de los organismos. La evidencia que se tiene para sustentar esta hipótesis está basada en una gran cantidad de correlaciones



**FIGURA 4. Vías de inducción de la senescencia**

No existe aún una vía de transducción específica descrita para la inducción de la senescencia replicativa. Se ha propuesto que varias proteínas relacionadas, tanto con el ciclo celular como con el programa de muerte por apoptosis, estén involucradas en este proceso.

A. Vista general de algunos de los procesos que se presentan para que una célula entre a la etapa de senescencia.

B. Moléculas que se han relacionado experimentalmente con el fenómeno de la senescencia.

experimentales. Una primera línea de evidencia se basa en que los cultivos primarios derivados de donadores de edad avanzada, tienden a senescer después de una cantidad menor de PD que los cultivos de donadores jóvenes (12). La siguiente línea de evidencia deriva de algunas comparaciones entre especies. En general, las células derivadas de especies de vida corta inician su etapa de senescencia después de menos PD que las especies más longevas. En tercer lugar, se encuentran los estudios realizados en tejidos humanos derivados de personas con síndromes de envejecimiento prematuro hereditario, en especial con donadores con síndrome de Werner. En estos casos, se observa que las células de los pacientes senescen de manera prematura con respecto a los controles (12).

A pesar de que las correlaciones anteriores son interesantes, la evidencia experimental directa es muy poca, y se apoya básicamente en los estudios antes mencionados de Dimri y colaboradores, donde se determinó la acumulación de células senescentes en tejido humano envejecido (2). Esto se hizo utilizando un marcador enzimático basado en la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa humana que aparentemente se acumula en varios tipos celulares que senescen en cultivo. La actividad de la enzima se

detecta en células individuales por tinción histoquímica a pH 6 usando el sustrato artificial X-gal. Esta técnica es conocida como  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- $\beta$ -gal) y difiere en su pH óptimo de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal (pH 4) y de la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana (pH 7.5) que se usa comúnmente como reportera. Se ha demostrado que la expresión de SA- $\beta$ -gal está ligada a la senescencia y no a la quiescencia o a la diferenciación terminal, sin embargo su origen y su función en estas células se desconoce (2). Aún así, a la fecha, este es el marcador preferente que se usa para evidenciar la presencia de células senescentes.

Se ha pensado que el cambio tan dramático que sufren las células senescentes en su fenotipo y su función pueden contribuir al deterioro asociado al envejecimiento. Por ejemplo, una de las características distintivas de la piel envejecida es la disminución y la desorganización de la colágena en la dermis. El cambio fenotípico de los fibroblastos senescentes, de productores a degradadores de matriz extracelular, así como la producción de citocinas pro-inflamatorias, apoya esta idea (5).

**APOPTOSIS, ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA.**

Desde el descubrimiento inicial de la

apoptosis por Kerr et al. en 1972 (13) como un mecanismo de muerte diferente de la necrosis, este proceso ha sido objeto de un sinnúmero de estudios. La desregulación de la apoptosis se ha visto implicada como parte del mecanismo fundamental de una gran cantidad de patologías relacionadas al envejecimiento humano. Por ejemplo, la eliminación ineficiente de células malignas o autorreactivas puede conllevar al desarrollo de un cáncer o una enfermedad autoinmune. Por el contrario, una muerte apoptótica excesiva puede resultar en una pérdida de células aberrante que culmina en eventos patológicos. Es evidente por tanto, que para que el organismo esté en homeostasis, debe haber una regulación muy fina y muy sutil en el proceso que induce a la muerte celular programada.

La apoptosis es necesaria durante el desarrollo, cuando el exceso de células debe ser removido, por ejemplo, durante la morfogénesis. Sin embargo, con la edad, se pierde el control de esta delicada regulación dando como resultado, ya sea el retener células que deberían haberse eliminado, o bien, el eliminar otras que deberían haberse conservado (6). Algunos de los padecimientos más estudiados en los cuales se ha asociado al proceso del envejecimiento con

una disminución innecesaria en el número de células por muerte apoptótica, son las enfermedades neurodegenerativas, la disfunción cardiovascular, la atrofia muscular, los desórdenes intestinales y las enfermedades renales. El estado anti-apoptótico que presentan las células senescentes, es diferentes de otros estados que resisten la apoptosis, ya que la mayoría de ellos escapan a la muerte celular de una manera que está relacionada a su rápida tasa de proliferación y culminan con su transformación en células cancerosas. No así las células senescentes que se encuentran detenidas en G0/G1.

La presencia de células senescentes, resistentes a la apoptosis, puede proveer a los tejidos de un número de células que resultan ser como bloques de construcción que los siguen manteniendo unidos, pero una cantidad grande de ellas puede ser perjudicial (como ya se discutió antes). La presencia de neuronas dañadas en el cerebro o de cardiomiocitos disfuncionales en el corazón, pueden comprometer la funcionalidad de todo el tejido o el órgano. Por lo que la acumulación de células senescentes puede contribuir al deterioro asociado al envejecimiento (8). Lo anterior es consistente con la idea de que la apoptosis pueda funcionar como un mecanismo de defensa importante para deshacerse de células genéticamente inestables, y que la gran longevidad que manifiestan algunas poblaciones de ancianos centenarios sea debida a que han llevado a cabo el proceso de apoptosis de una manera muy eficiente a lo largo de su vida (14).

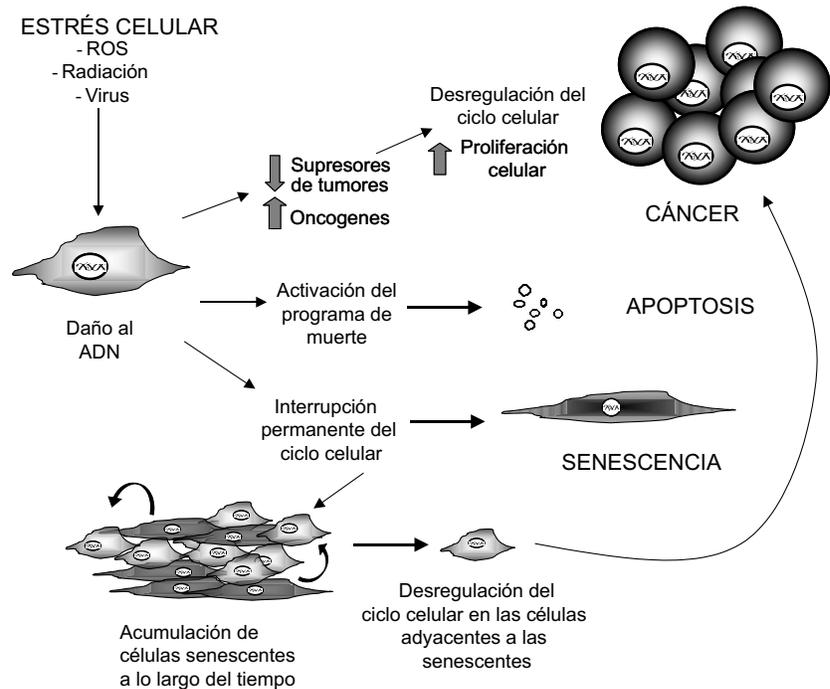
Por otro lado, una de las posibles aplicaciones de este conocimiento que ha tenido resultados interesantes *in vitro*, es el tratar de convertir a las células neoplásicas en células senescentes. Ya que muchas veces las células cancerosas no pueden iniciar un programa de muerte apoptótica por tener altos niveles de proteínas de pro-supervivencia, como por ejemplo Bcl-2. Actualmente ya se ha logrado

inducir la senescencia en algunos carcinomas y detener así la proliferación celular (15).

## CONCLUSIONES

Todo lo que se ha discutido parece indicar que la senescencia replicativa puede considerarse como uno de los aspectos fundamentales dentro del comportamiento celular, sin embargo, aunque este fenómeno fue descrito de una manera formal por Hayflick desde 1961, aún es poco lo que se conoce y lo que se ha incorporado de este conocimiento a los libros de texto o a los programas de estudio. Esto es más evidente si se compara con la cantidad de estudios y de conocimiento que se ha generado alrededor de la apoptosis (que se describió 10 años después, en 1972 por Kerr).

A nuestro modo de ver, existen dos razones fundamentales para ello. Una es que por muchos años el fenómeno de la senescencia replicativa sólo se había descrito en cultivos celulares y se dudaba que fuera una respuesta que las células pudieran tener *in vivo*, y por otro lado, la falta de marcadores moleculares para definirla y estudiarla. Sin embargo, con los datos aportados por los experimentos de senescencia inducida, que proponen que este fenómeno sea una respuesta celular al estrés, así como hallazgos cada vez más frecuentes de células senescentes *in vivo* en condiciones estresantes y avances en la tecnología como los microarreglos, es muy probable que se logre entender mejor este proceso.



**FIGURA 5. Respuestas celulares al estrés y antagonismo pleiotrópico.**

Los estímulos estresantes pueden alterar a las células de tal manera que inicien un proceso neoplásico dañino para el organismo. Una forma de evitarlo es la de favorecer la apoptosis, por medio de la cual se eliminarán dichas alteraciones. Un mecanismo alternativo a la muerte pudiera ser el detener la proliferación celular. De esta manera también se evitaría propagar el daño.

No obstante, a lo largo del tiempo, la acumulación de las células senescentes en un tejido disminuiría su funcionalidad, además de que enrarecería el microambiente celular fomentando la transformación de las células vecinas e induciendo un cáncer.

La senescencia celular presenta pues, un fenómeno de antagonismo pleiotrópico, ya que lo que es benéfico en una etapa de la vida puede llegar a ser perjudicial en otra.

## REFERENCIAS

1. Hayflick L y Moorhead P S (1961) The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
2. Dimri G P, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E E, Linskens M, Rubeli I, Pereira-Smith O, Peacocke M y Campisi J (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in ageing skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367
3. Satyanarayana A, Wiemann S U, Buer J, Lauber J, Dittmar K E, Wustefeld T, Blasco M A, Manns M P y Rudolph K L (2003) Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J* 22: 4003-4013
4. Schmitt C A, Fridman M Y, Lee S, Baranov E, Hoffman R M y Lowe S W (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109: 335-346
5. Campisi J (2000) Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo* 14: 183-188
6. Wang E (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress Bcl-2 is involved. *Cancer Res* 55: 2284-2292
7. Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, Holt S E, Chio C-P, Morin G B, Harley C B, Shay J W, Lichtsteiner S y Wrigth W E (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352
8. Toussaint O, Medrano E E y Von Zeglinicki T (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35: 927-945
9. Chen Q M, Prowse K R, Tu V C, Purdom S y Linskens M H K (2001) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265: 294-303
10. Gorbunova V, Seluanov A y Pereira-Smith O M (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 277: 38540-38549
11. Stein G H, Drullinger L F, Soulard A y Dulic V (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19: 2109-2117
12. Martin G M, Austad S N y Johnson T E (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature genetics* 113: 25-34
13. Kerr J F R, Wyllie A H y Currie A R (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
14. Bree R T, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman A M y Samali A (2002) Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology* 3: 195-206
15. Crescenzi E, Palumbo G y Brady H J (2003) Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J* 375: 263-274

# DEFECTOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE PREDISPONEN A UNA ALTA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS\*

ADRIANA GARIBAY-ESCOBAR<sup>1</sup>.

## RESUMEN

*Mycobacterium tuberculosis* es responsable de al menos 3 millones de muertes al año, lo que representa un grave problema de salud pública. Algunos individuos presentan una susceptibilidad selectiva a infecciones diseminadas por *M. Tuberculosis*, y/o por algunas micobacterias consideradas pobremente patógenas, tales como la del bacilo de Calmette-Guérin (vacuna BCG) o micobacterias ambientales. Dicha predisposición está clasificada como un desorden mendeliano y algunas de sus bases moleculares aún están siendo exploradas. En ciertos pacientes con infecciones diseminadas por micobacterias se han descrito defectos en la expresión de proteínas de membrana que predisponen a una alta susceptibilidad a tuberculosis. Específicamente, se han reportado mutaciones en los genes que codifican para los receptores de membrana para las citocinas IL-12 (IL-12R) e IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) que son moléculas con una importante participación en la inducción de la respuesta inmune contra la micobacteria.

**PALABRAS CLAVE:** tuberculosis, respuesta inmune, inmunodeficiencia.

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* is responsible for at least 3 million deaths per year, which represents a serious health worldwide problem. Selective susceptibility to *M. tuberculosis* and/or poorly pathogenic mycobacteria, such as bacille Calmette-Guérin BCG vaccine and environmental non-tuberculous mycobacteria, has been described in some people. Such predisposition is classified as a mendelian disorder and some of its molecular basis remain elusive. It has been described in some patients with disseminated mycobacterial infections defects in the membrane protein expression, these defects predispose to a high susceptibility to tuberculosis. There are reports for mutation on cytokine receptors for IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) and IL-12 (IL-12R) in a number of patients with disseminated mycobacterial infection. These molecules are important in the immune response to mycobacteria, consequently in the mycobacterial elimination.

**KEY WORDS:** tuberculosis, immune response, immunodeficiency.

## INTRODUCCIÓN

La OMS señala a la tuberculosis como la principal causa de muerte debida a un agente infeccioso, dado que causa tres millones de muertes al año (<http://www.Who.int/gtb/publications/factsheet/index.htm>). Asimismo, la Secretaría de Salud de nuestro país incluye a esta enfermedad como una de las causas de muerte más importantes en la población económicamente activa (<http://www.salud.gob.mx>). Dentro de los pacientes con tuberculosis existen algunos que, a pesar de la agresividad de las terapias antifímicas, nunca logran resolver la infección. Esto muestra la gran importancia

que la respuesta inmune tiene en la eliminación de *Mycobacterium tuberculosis* (1), el agente causal de dicha enfermedad. La activación y proliferación de células inmunocompetentes es consecuencia de una respuesta inmune contra un antígeno. Los eventos celulares que caracterizan a la respuesta inmune celular hacia un mitógeno o estímulo antigénico específico incluyen la expresión de proteínas de membrana (antígenos de superficie celular), producción y secreción de citocinas, la proliferación celular y la apoptosis. Las citocinas, entre ellas las interleucinas, son proteínas solubles que pueden

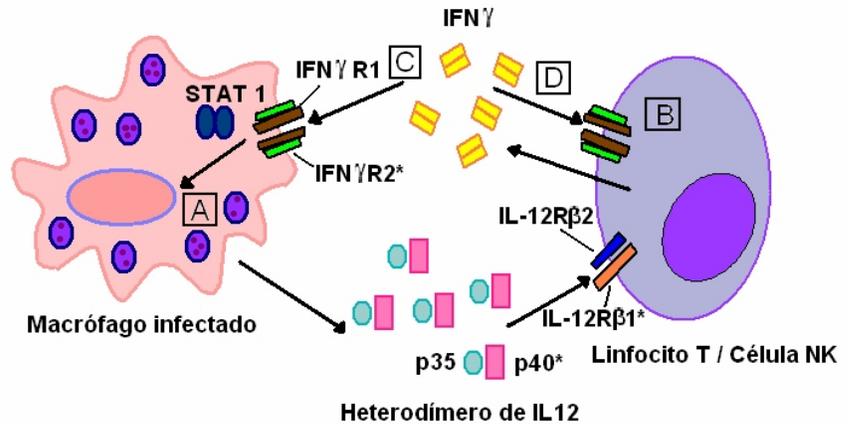
tener actividades tanto efectoras como reguladoras y juegan un papel relevante en la inmunorregulación de los linfocitos y monocitos. Estos efectos funcionales dependen de eventos de señalización activados por la unión de las citocinas con sus receptores específicos. La respuesta inmune a todos los patógenos es, al menos en parte, dependiente de citocinas que regulan todas las células del sistema inmune (2). *M. tuberculosis* no es la excepción y, en efecto, induce una fuerte respuesta en la inducción de citocinas durante la infección. La respuesta inmune a este patógeno es crucial en el control de la

\* Recibido: 11 noviembre 2004 Aceptado: 05 julio 2005 Este artículo se publicó extemporaneamente.

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Químico Biológicas. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora. Rosales y Luis Encinas. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México. Tel/Fax: 2 59 21 63 y 64. Correo E: [agaribay@guayacan.uson.mx](mailto:agaribay@guayacan.uson.mx)

infección, pero puede también contribuir a la infección crónica y patologías asociadas. Se conoce que la patogénesis de esta enfermedad involucra una importante respuesta inmune celular, en la que el macrófago y el linfocito T juegan un papel central, así como las citocinas que estas células producen. Asimismo, está bien definido que la producción de la interleucina-12 (IL-12) por el macrófago es fundamental en la inducción de la respuesta de tipo celular. Esta respuesta celular implica la producción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), citocina que promueve una potente activación de los macrófagos (Fig. 1). Los macrófagos así activados logran eliminar a la micobacteria, de tal manera que, cualquier defecto en el eje de activación IFN- $\gamma$ /IL-12 va a provocar un deterioro de la respuesta inmune contra dicha bacteria (3). Además del IFN- $\gamma$  y la IL-12, otras citocinas tales como: las interleucinas IL-4, IL-10, IL-6, los factores de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) están siendo estudiadas intensamente en la tuberculosis. Todas estas citocinas para ejercer su acción, han de encontrar en la célula blanco su receptor específico expresado adecuadamente, para que el proceso de unión, señalización y activación celular, se lleve a cabo exitosamente (3).

Particularmente importante son los pacientes con defectos en la respuesta inmune crítica para el control de *M. tuberculosis*, dado que, al no eliminar el patógeno cursan con una tuberculosis crónica y una mala calidad de vida, además de ser una fuente continua de infección; un ejemplo es el hecho de que en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis es la enfermedad con mayor incidencia (<http://www.who.int/emc/diseases/hiv/>). En muchos casos de tuberculosis activa no se detecta una inmunodeficiencia generalizada. Se han descrito otros defectos inmunes, éstos involucran la expresión aberrante de proteínas de



**FIGURA 1.** Eje de activación celular IFN- $\gamma$ /IL-12. La cooperación entre las células secretoras de IL-12 (macrófagos) y las que secretan IFN- $\gamma$  (células NK y células T) está descrita. (A) La infección del macrófago por la micobacteria induce la transcripción de los genes para las subunidades p35 y p40 de IL-12. (B) El heterodímero de IL-12 secretado se une a su receptor dimérico (IL-12R $\beta$ 1/IL-12R $\beta$ 2) expresado en el linfocito T o en la célula NK. Esta unión inicia la transcripción del gen de los homodímeros de IFN- $\gamma$  que se secretan y se unen a su receptor dimérico IFN- $\gamma$ R1/IFN- $\gamma$ R2, unión que puede (C) activar los macrófagos, y (D) activar las células NK o T de una manera autocrina.

membrana, específicamente receptores de citocinas, que correlacionan con una eliminación ineficiente de la micobacteria, lo que finalmente induce a una tuberculosis diseminada, que en algunos casos resulta fatal (4).

### DEFECTOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE PREDISPONEN A UNA ALTA SUSCEPTIBILIDAD A TUBERCULOSIS

Existen reportes en los que se muestran que tanto *M. tuberculosis*, BCG (única vacuna contra la tuberculosis), así como micobacterias no tuberculosas (*M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*) pueden ser causa de tuberculosis en individuos con alguna inmunodeficiencia (5). Generalmente estos individuos no presentan infecciones asociadas. Debido a que estas infecciones por micobacterias se han observado frecuentemente en núcleos familiares, se les han señalado como un síndrome de susceptibilidad mendeliana (6). Tal síndrome es heterogéneo, a pesar de que su presentación clínica está restringida únicamente a una predisposición a infecciones por micobacterias. Además, las bases genéticas entre las familias afectadas no son las mismas. El síndrome no está confina-

do a un grupo étnico o a una región geográfica en particular (4). En la mayoría de los casos familiares, la herencia es autosómica y recesiva, en otros, se ha presentado un tipo de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Además, en algunos núcleos familiares se ha demostrado una herencia autosómica y dominante para el síndrome (4). El curso clínico difiere entre los pacientes y se ha encontrado que correlaciona con el tipo de lesión granulomatosa por BCG (7), de tal manera que los niños con granulomas de tipo lepromatoso generalmente mueren por infección "abrumadora", mientras que los pacientes con granulomas tuberculoides presentan un curso favorable. Esto confirma los reportes previos que muestran la gran importancia que el tipo de lesión granulomatosa tiene en el curso de las infecciones por micobacterias (8). Está descrito que los granulomas tuberculoides y lepromatosos difieren considerablemente en sus características histológicas. Sin embargo, la diferencia que parece ser determinante en el control de la micobacteria es que, en los granulomas tuberculoides predomina una población celular productora de altos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2, mientras que en los granulomas lepromatosos

esta población celular se encuentra en menor proporción (8).

La clonación posicional y el acceso al gen candidato han permitido la identificación de genes mutados que consecuentemente inducen una expresión defectuosa de proteínas de membrana, que finalmente conllevan a una alta susceptibilidad a infecciones por micobacterias. El tipo de mutación (recesivo/dominante, hipomórfico/pérdida de función) contribuye a la heterogeneidad clínica que los pacientes presentan, esto es, determina el grado de inmunodeficiencia. Dentro de las proteínas de membrana cuya expresión está alterada en los individuos mencionados, se encuentran el receptor de la citocina IFN- (IFN- R) (Fig. 2) y el receptor de la citocina IL-12 (IL-12R) (Fig. 3).

### Deficiencia completa de IFN- R1 e IFN- R2.

La primera alteración en la expresión de proteínas de membrana reportada como factor de susceptibilidad a infecciones por micobacterias fue la deficiencia completa de la cadena R1 (unión) del receptor de IFN- (IFN- R1) (9). Hay también reportes de individuos que presentan una deficiencia completa de la cadena R2 (señalización) del receptor para IFN- (IFN- R2) (10). Estos defectos son debidos a mutaciones recesivas y nulas en los genes que codifican para IFN- R1 e IFN- R2 e impiden la expresión del receptor en la superficie. De tal manera que las células de los pacientes con tales deficiencias carecen de una respuesta a IFN-. Los niveles de IFN- circulante en sangre

de los pacientes son normales. En estos pacientes se han identificado como agentes patógenos ya sea BCG y/o micobacterias del medio ambiente, principalmente *M. avium*. Este defecto causa una mortalidad del 50% y los sobrevivientes requieren un tratamiento integral continuo con antifímicos e inmunomoduladores (10).

### Deficiencia parcial recesiva de IFN- R1 e IFN- R2.

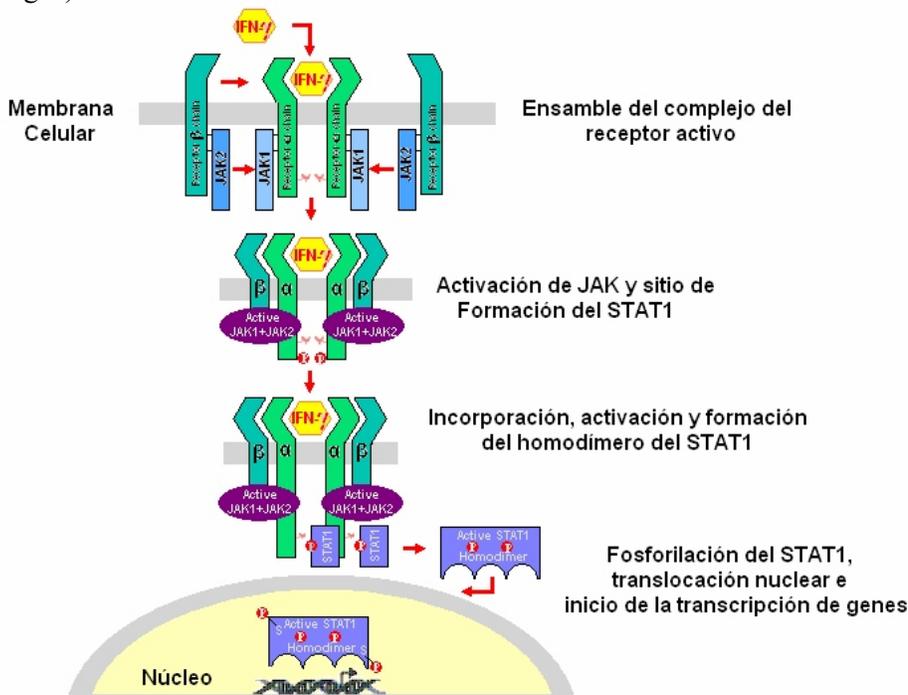
Esta deficiencia predispone también a una alta susceptibilidad a tuberculosis. Se ha identificado que una mutación homocigota, recesiva sin sentido, causa la sustitución de un aminoácido en el dominio extracelular del receptor de IFN-, requiriéndose de muy altas concentraciones de la citocina para la señalización. Los pacientes con esta deficiencia forman granulomas tuberculoides por BCG bien definidos y presentan un cuadro clínico menos severo que los descritos anteriormente (11).

### Deficiencia parcial dominante de IFN- R1.

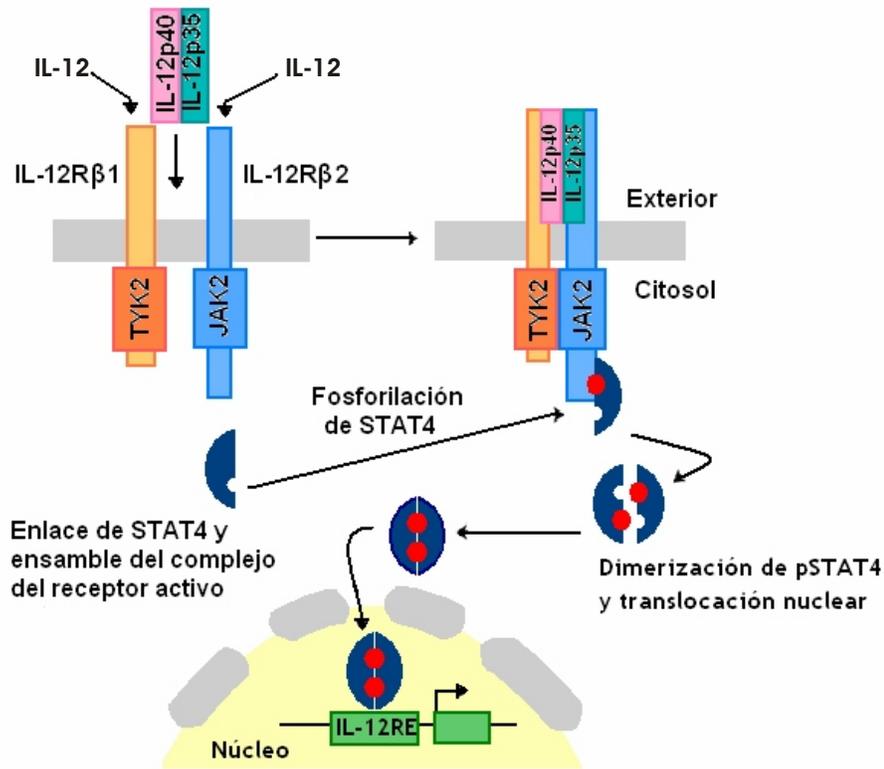
Ésta se debe a una mutación puntual en el gen que codifica para el IFN- R1 (12), de tal manera que provoca que el receptor se exprese truncadamente, uniendo al IFN- con afinidad normal pero sin llevar a cabo la transducción de la señal. Estos pacientes generalmente son vulnerables a infecciones por BCG, y presentan infecciones por *M. avium*, principalmente. Los pacientes muestran granulomas tuberculoides por BCG y su pronóstico es menos severo que el de aquellos con deficiencia completa, sólo se han reportado tres defunciones. Los sobrevivientes no requieren tratamiento especial (13).

### Deficiencia completa del IL-12R 1.

La deficiencia de la subunidad 1 del receptor de la citocina IL-12 (IL-12R 1) se debe a mutaciones en el gen que codifica para dicha subunidad (14) y predispone también a tubercu-



**FIGURA 2. Representación esquemática del receptor de interferón- (IFN R) y su vía de señalización.** El receptor de IFN- tiene dos subunidades: IFN R1, la cadena que une al ligando (o cadena  $\alpha$ ) y el IFN R2, la cadena que transduce la señal (o cadena  $\beta$ ). Estas proteínas son codificadas por genes separados (IFNGR1 e IFNGR2, respectivamente), localizados en diferentes cromosomas. Al interactuar el IFN- con la cadena de unión, ésta se dimeriza y se asocia a dos cadenas de transducción de señales. El ensamble del receptor conduce a la activación de las cinasas de Janus 1 y 2 (JAK1 y JAK2), y a la fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio intracelular del IFN- R1. Esto a su vez permite el reclutamiento y la fosforilación del activador de la transcripción y transductor de señal 1 (STAT1), el cual forma homodímeros que se translocan al núcleo para activar una amplia variedad de genes de respuesta al IFN-. Después de la señalización, las cadenas de unión se internan y se disocian. Las cadenas de transducción se reciclan a la superficie celular.



**FIGURA 3. Representación esquemática del receptor de interleucina-12 (IL-12) y su vía de señalización**

El receptor de IL-12 tiene dos subunidades: IL-12R 1 e IL-12R 2, codificados por IL12RB1 e IL12RB2, respectivamente. La unión de IL-12 a estos receptores induce la fosforilación de la tirosina cinasa 2 (TYK2) y de las cinasas de Janus 2 (JAK2). Esto resulta en el enlace del activador de la transcripción y transductor de señal STAT4 a la cola citoplasmática del IL-12Rβ2. Las moléculas STAT4 fosforiladas se dimerizan y se translocan hacia el núcleo, donde son activados los genes inducibles por IL-12 (aquellos con un elemento de respuesta a IL-12, IL-12RE).

losis. Los pacientes son homocigotos para tal mutación (recesiva) e impide la expresión del IL-12Rβ1 en la superficie celular. El fenotipo clínico es semejante al de los individuos con deficiencias en IL-12p40. Los pacientes presentan infecciones por BCG curables. El fenotipo histológico que tales pacientes presentan es leve también, encontrándose granulomas por BCG bien delimitados y diferenciados (11).

#### Deficiencia parcial del IL-12Rβ1.

Muy recientemente se reportó la existencia de otra mutación en el gen que codifica para IL-12Rβ1. En esta inmunodeficiencia se presenta un

fenotipo inmunológico y celular intermedio en el que hay una respuesta baja a la IL-12, misma que es posible incrementar con IL-18. El fenotipo clínico es relativamente leve. En esta deficiencia sólo es posible detectar el receptor en el citoplasma de las células, pero no en su superficie (15). Las deficiencias genéticas anteriormente descritas, son las que se presentan con mayor frecuencia, sin embargo, existen otras que predisponen también a infecciones por micobacterias (16). Asimismo, están descritas deficiencias a nivel de proteínas intracelulares, un ejemplo es la mutación del activador de la transcripción y transductor de la señal

1 (STAT1). STAT1 está involucrado en la vía de señalización del IFN- (Fig. 2), y los individuos que cursan con esta alteración son igualmente susceptibles a tuberculosis (17).

La búsqueda de estas alteraciones fue iniciada recientemente, de ahí que todavía no existan los suficientes datos estadísticos que muestren su relevancia epidemiológica a nivel mundial. Existe el dato para Francia, donde se estima que, la prevalencia de infecciones diseminadas por BCG es de 0.59 casos por millón de nacimientos (6). Sin embargo, el hallazgo de tales defectos genéticos ha permitido confirmar la gran importancia que tiene el eje de señalización IFN- /IL-12 en el control de las infecciones por micobacterias.

#### CONCLUSIONES

La incidencia de individuos estrictamente asintomáticos con mutaciones genéticas que abaten la inmunidad mediada por IL-12 sugiere que es posible la existencia de vías alternativas que compensen la pérdida de señalización por esta citocina, tales como las mediadas por IL-18 y/o IL-23. Sin embargo, es claro que el IFN- es la única citocina efectora involucrada en la inmunidad contra la micobacteria y al parecer no existen vías inmunológicas alternativas que compensen la pérdida total de señalización por esta citocina en respuesta al reto micobacteriano. Esto muestra la gran importancia que tienen los elementos de la respuesta inmune en el control de la tuberculosis y la necesidad de establecer estrategias para su evaluación a fin de llevar a cabo un manejo integral de los pacientes.

#### AGRADECIMIENTOS:

La autora agradece al M. en C. Jesús Rubén Garcilaso Pérez por la revisión y corrección del presente manuscrito y a la p.Q.B. Paola del Carmen Gastélum Aviña.

## REFERENCIAS

1. Flynn J L y Ernst J D (2000) Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol* 12:432-436
2. Kroemer G, Moreno de Alborán I, Gonzalo J A y Martínez-A C (1993) Immunoregulation by cytokines. *Crit Rev Immuno* 13:163-191
3. Flynn J L y Chan J (2001) Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19:93-129
4. Casanova J L y Abel L (2004) The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immuno* 4:55-66
5. Frucht D M y Holland S M (1996) Defective monocyte costimulation for IFN-gamma production in familial disseminated *M. avium* complex infection: abnormal IL-12 regulation. *J Immunol* 157:411-416
6. Altare F, Jouanguy E, Lamhamedi S, Döffinger R, Fischer A y Casanova J L (1998) Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Curr Opin Immunol* 10:413-417
7. Emile J F, Patey N, Altare F, Lamhamedi S, Jouanguy E, Boman F, Quillard J, Lecomte-Houcke M, Verola O, Moustenier J F, Dijoud F, Blanche S, Fischer A, Brousse N y Casanova J L (1997) Correlation of granuloma structure with clinical outcome defines two types of idiopathic disseminated BCG infection. *J Pathol* 181:25-30
8. Volc-Platzer B, Kremsner P, Stemberger H y Wiedermann G (1990) Restoration of defective cytokine activity within lepromatous leprosy lesions. *Zentralbl Bakteriologie* 272:458-466
9. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile J F, Newport M, Levin M, Mlanche S, Seboun E, Fischer A y Casanova J L (1996) Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacilli Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 335:1956-1961
10. Dorman S E y Holland S M (1998) Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 101:2364-2369
11. Döffinger R, Jouanguy E, Dupuis S, Fondaneche M C, Stephan J L, Emile J F, Lamhamedi S, Altare F, Pallier A, Barcenas-Morales G, Krause C, Pestka S, Schreiber R D, Novelty F y Casanova J L (2000) Partial interferon gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with BCG and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis* 181:379-384
12. Jouanguy E, Lamhamedi-Dherradi S, Lammas D, Dorman S E, Fondaneche M C, Dupuis S, Döffinger R, Altare F, Emile J F, Girdelstone J, Ducoulombier H, Edgar D, Clarke J, Oxelius V A, Brai M, Novelli V, Heyne K, Fischer A, Holland S M, Kumararatne D S, Schreiber R D y Casanova J L (1999) A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 21:370-378
13. Dupuis S, Döffinger R, Picard C, Fieschi C, Altare F, Jouanguy E, Abel L y Casanova J L (2000) Human interferon-gamma-mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol Rev* 178:129-137
14. Sakai T, Matsuoka M, Aoki M, Nosaka K y Mitsuya H (2001) Missense mutation of the interleukin-12 receptor beta 1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium* complex infection. *Blood* 97:2688-2694
15. Lichtenauer-Kaligis G R, Boer T, Verreck F A W, Voorden S V, Hoeve M A, Vosse E V, Ersoy F, Tezcan I, Disserl J A T V, Sanal O y Ottenhoff T H M (2003) Severe *Mycobacterium bovis* BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *Eur J Immunol* 33:59-69
16. Fieschi C, Bosticardo M, de Beaucoudrey L, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, Santos O F, Bustamante J, Levy J, Candotti F y Casanova J L (2004) A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor beta 1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. *Blood* 104:2095-2101
17. Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland S M, Schreiber R D y Casanova J L (2001) Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293:300-303

# PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ricardo Jasso Chávez  
Departamento de Bioquímica, INC.  
Correo E: rjasso@aol.com

## Cinética enzimática. Efecto del pH.

La bacteria Gram negativa *Porphyromonas gingivalis* es un organismo presente en las placas sub-gingivales de pacientes con periodontitis progresiva. Entre los factores de virulencia producidos por esta bacteria se encuentran algunas enzimas proteolíticas como la proteasa específica para argininas, la cual está involucrada en la degradación de proteínas importantes para la defensa del hospedero y en la destrucción de los tejidos que soportan los dientes (1). Por otra parte, se han descrito cambios en el valor de pH entre 2-9 en las cavidades periodontales de pacientes enfermos (2), por lo que las proteasas de *P. gingivalis*

podrían mostrar cambios radicales en su actividad y parámetros cinéticos dependiendo del pH de su ambiente. Así, se purificó a la proteasa específica para argininas y se determinaron los cambios en sus parámetros cinéticos ( $V_m$ ,  $K_m$  y  $V_m/K_m$ ) con respecto a la variación del pH.

La actividad se determinó con 0.3-0.5 g proteína, a 30°C en 1 mL de 0.5 M de  $N^\alpha$ -benzoyl-D,L/L-Arg-p-nitroanilida, (D,L/L-BRpNA), un péptido sintético que al ser hidrolizado libera p-nitroanilina la cual absorbe a 405 nm ( $\epsilon = 8.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Los valores de velocidad inicial se muestran en la siguiente tabla:

TABLA I.

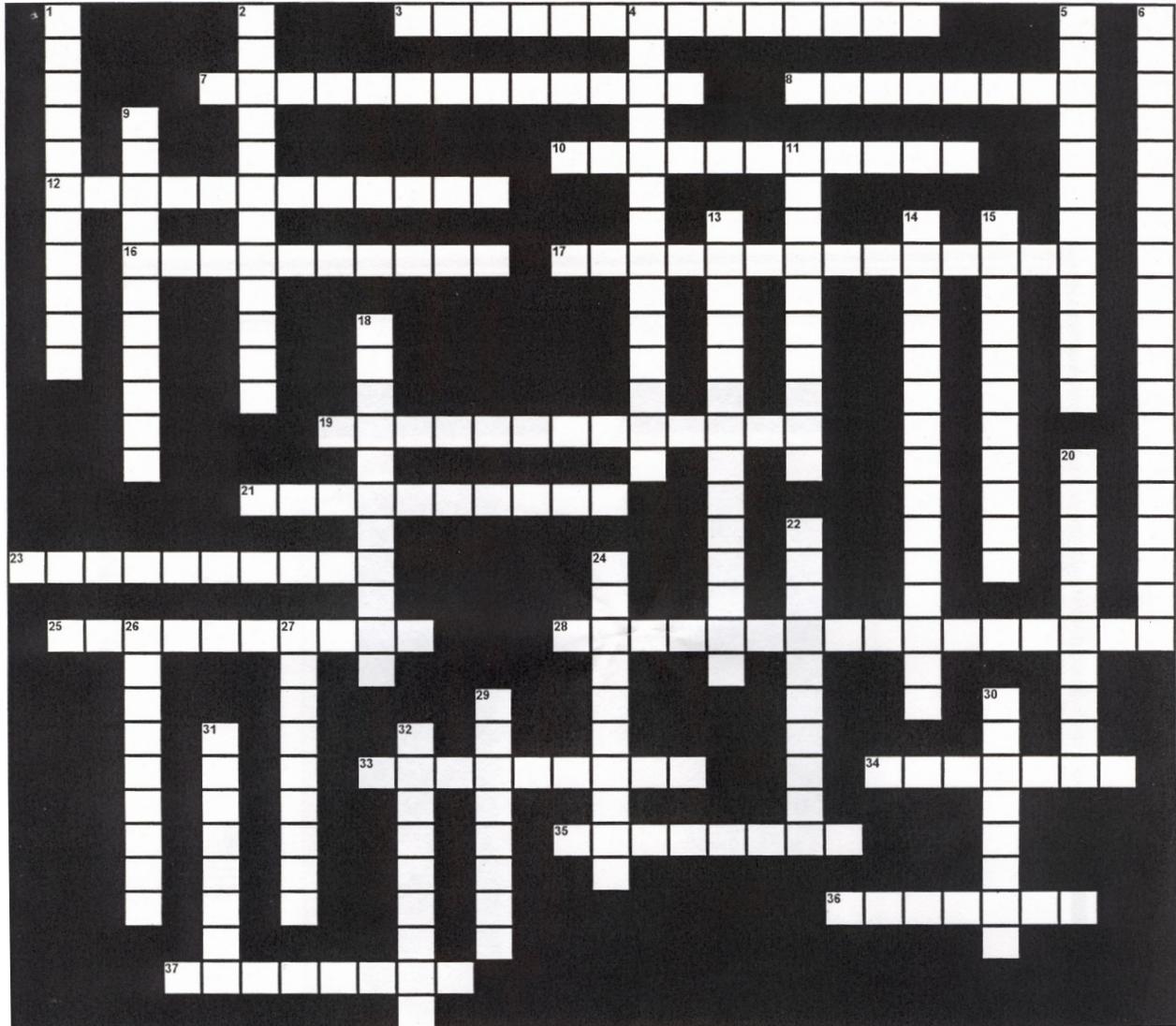
[D,L/L-BRpNA] M	Actividad de la Arg-X proteasa (U/mg)						
	pH 5.6	pH 6	pH 6.6	pH 7.9	pH 9.5	pH 10.2	pH 10.5
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.43	0.85	3.25	2.5	1.2	0.275	0.2
3	0.75	1.58	5.6	7	2.2	1	0.375
5	0.955	1.79	6.34	8.75	3.2	1.6	0.6
7.5	1	2.05	6.9	9.2	4.2	2.1	0.85
9	1.05	2.1	7.2	9.5	4.7	2.325	1
13	1.075	2.125	7.3	9.7	4.95	2.33	1.05

Ejercicios:

1. Determinar la  $V_m$ ,  $K_m$  y la eficiencia catalítica ( $V_m/K_m$ ) a cada valor de pH del ensayo.
2. Determinar los valores de  $pK_a$  y de acuerdo con éstos, identificar los aminoácidos involucrados en la unión y en la catálisis.

# CRUCIBIOQ

## BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS



### HORIZONTALES

3. Eicosanoide que desencadena la contracción del músculo liso y es responsable de la inflamación.
7. Hormona proteínica que es secretada por la hipófisis anterior, su producción en niños es alta y óptima en la adolescencia, en la edad adulta sus valores se encuentran muy disminuidos; esta hormona aumenta la síntesis de proteínas, favorece el transporte de glucosa hacia el músculo y aumenta la lipogénesis en tejido adiposo, es también conocida como hormona de crecimiento.
8. Disminuye la utilización de la glucosa por los tejidos para aumentar la concentración de ésta en la sangre.
10. Hormona que se secreta en la corteza adrenal, tiene como función regular la presión sanguínea y la retención de sodio.
12. Principal hormona androgénica, se secreta en los testículos y regula la actividad de los tejidos reproductores masculinos.
16. Es secretada por la médula de las glándulas adrenales, sus niveles normales en sangre son de  $1 \times 10^{-10}$  M pero ante estímulos que pongan al animal en una situación

de alarma, le hacen que eleve su concentración sanguínea a  $1 \times 10^{-7}$  M en unos cuantos segundos.

17. Secretada por la hipófisis anterior, estimula la síntesis de corticosteroides en la corteza adrenal.
19. Polipéptido de 14 residuos de aminoácidos, inhibe la liberación de la hormona de crecimiento y la de hormonas gastrointestinales y pancreáticas.
21. Grupo de hormonas con actividad anabólica ya que inducen un balance nitrogenado positivo, así como la retención de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y agua.
23. Hormonas que se producen en una célula y recorren una distancia relativamente corta para interactuar con los receptores específicos en una célula cercana.
25. Hormona que estimula el desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria.
28. El cortisol pertenece a este grupo de hormonas, afecta al metabolismo de los carbohidratos y proteínas además de suprimir las respuestas inmune y alérgica.
33. Función que se le asigna al AMP cíclico cuando la adrenalina desencadena el proceso de degradación de glucógeno.
34. Carbohidrato que el hígado vierte a la sangre, segundos después que se ha secretado la adrenalina.
35. Hormona que se produce al final de una cascada desencadenada por un estrés ambiental y en la que intervienen la hormona liberadora de corticotropina, la ACTH y la  $\beta$ -lipotropina.
36. Sustancia producida por un organismo, que porta una señal que es capaz de producir un cambio metabólico a nivel celular.
37. Incrementa la secreción de ácido clorhídrico y pepsina.

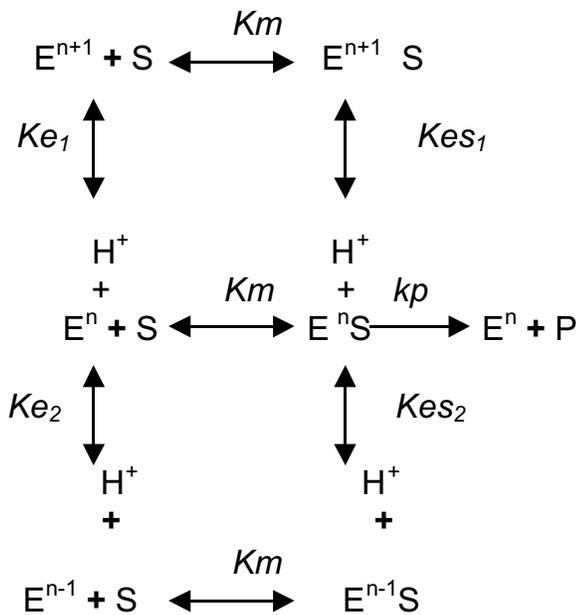
## VERTICALES

1. Hormona hipocalcémica, cuando el  $\text{Ca}^{++}$  plasmático es alto, aumenta su secreción y cuando el ión baja su nivel, se reduce la secreción de la hormona.
2. Se produce en el ovario y regula la actividad de los órganos reproductores femeninos en el período menstrual y durante el embarazo.
4. Nombre genérico que se le da a las hormonas hipofisarias: luteinizante, estimulante del folículo y a la coriogonadatropina.
5. Aminoácido esencial del que se derivan las catecolaminas, la dopamina, la melanina y las hormonas tiroideas.
6. Hormonas que se producen en la corteza adrenal y que regulan las concentraciones de electrolitos en la sangre.
9. Tipo de diabetes mellitus reversible, se caracteriza por la intolerancia a la glucosa que en ocasiones desarrolla la mujer durante el embarazo.
11. Clase de hormonas que se originan en un tejido y que a través de la circulación llegan a la célula diana que tiene receptores específicos.
13. Individuos que tienen un metabolismo basal elevado por producir una cantidad superior a lo normal de hormona tiroidea.
14. Incrementa la secreción de enzimas pancreáticas, estimula la contracción de la vesícula biliar y el flujo de la bilis.
15. Actúa sobre las células foliculares del tiroides para que se libere la tiroxina.
18. Llamada también hormona antidiurética, se secreta en la hipófisis posterior, estimula la reabsorción de agua en el riñón y aumenta la presión sanguínea.
20. Tipo de hormonas compuestas por residuos de aminoácidos, en las que quedan incluidas: las del hipotálamo, las pancreáticas como la insulina, el glucagón y la somatostatina.
22. Región del cerebro que al recibir mensajes del sistema nervioso central produce hormonas reguladoras que son enviadas a la hipófisis anterior.
24. Molécula precursora de hormonas como la testosterona, el cortisol, la corticosterona y la aldosterona, entre otras.
26. Es secretada por la hipófisis posterior, contribuye a la contracción uterina durante el parto y estimula la liberación de leche durante la lactancia.
27. Tipo de hormonas que se producen cuando el hipotálamo segrega la hormona liberadora de la tirotropina y tienen como función incrementar la tasa metabólica basal del animal.
29. Hormona proteínica, su secreción se desencadena cuando los niveles de glucosa en sangre están elevados con respecto a lo normal, esta hormona estimula el almacenamiento de grasa en los depósitos.
30. Se encuentra en la superficie o en el interior de la célula diana y reconoce características estructurales de la hormona, lo que genera un alto grado de especificidad y afinidad.
31. Su diseminación en la piel está mediada por la hormona estimuladora del melanocito.
32. Se origina en el duodeno a valores de pH inferiores a 4.5 y estimula a las células acinares pancreáticas para liberar bicarbonato, lo que conducirá a un aumento del pH duodenal.

# RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

## Respuesta

La actividad de muchas enzimas varía con el cambio de pH, ya que el sitio activo generalmente contiene importantes grupos ionizables. Es de esperarse entonces que la concentración de la enzima activa ( $[E^n]$ ) dependerá de que los aminoácidos que sean esenciales en la unión y en la catálisis se encuentren en su estado ionizable correcto (de forma protonada o desprotonada). Esto es, a bajos valores de pH la enzima estará ionizada ( $[E^{n+1}]$ ) y a altos valores estará desionizada ( $[E^{n-1}]$ ), lo cual puede generar especies de enzima que sí pueden unir al sustrato pero que no son capaces de catalizar la reacción (Esquema 1).



Entonces de acuerdo con el esquema 1, n es el número de grupos ionizables,  $E^n$  es la especie de enzima activa catalíticamente y  $E^{n+1}$  y  $E^{n-1}$  son especies no catalíticas.  $Ke_1$  y  $Ke_2$  son las constantes de disociación del protón de la enzima libre y  $Kes_1$  y  $Kes_2$  son las constantes de disociación del protón del complejo Enzima-sustrato ( $E^{n+1}S$  y  $E^{n-1}S$ ).  $\alpha$  y  $\beta$  son factores que modifican la afinidad de la enzima por el sustrato. La ecuación de velocidad que describe el efecto del pH sobre la actividad de la enzima es:

$$v = V_m \cdot S / K_m \cdot S \dots\dots\dots (1)$$

donde

$$V_m^* = \frac{V_m}{1 + (H/K_{es1}) + (K_{es2}/H)} \dots\dots\dots (2)$$

y

$$K_m^* = K_m \frac{(1 + (H/K_{e1}) + (K_{e2}/H))}{(1 + (H/K_{es1}) + (K_{es2}/H))} \dots\dots\dots (3)$$

Así, en un gráfico de dobles recíprocos los valores dados en la tabla de datos resultan en la figura 1.

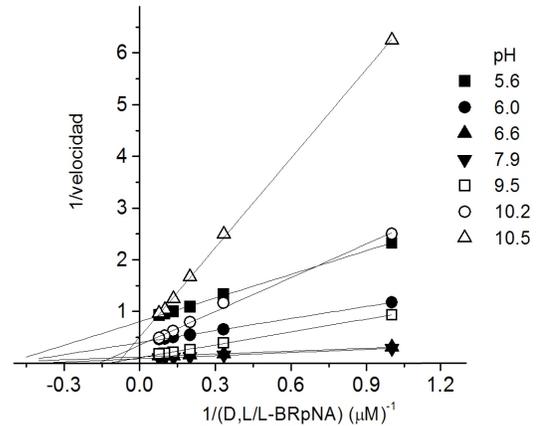


Figura 1

En la figura 1 se observa la dependencia de la  $K_m$  y la  $V_m$  con respecto al valor de pH del ensayo, donde a valores de pH extremos la  $V_m$  disminuye (el valor de la ordenada al origen  $b = 1/V_m$  aumenta), mientras que la afinidad ( $K_m$ ) es variable (el valor de la abscisa al origen  $a = -1/K_m$ ). A partir de los valores de la ordenada ( $1/V_m^*$ ) y de la pendiente  $(K_m/V_m)^*$  podemos obtener los valores de  $K_m$ ,  $V_m$  y  $V_m/K_m$ . De acuerdo con el doble recíproco de la ecuación 2, la ordenada al origen corresponde a:

$$\left(\frac{1}{V_m}\right)^* = \frac{1}{V_m} \frac{H}{V_m K_{es1}} \frac{K_{es2}}{V_m H} \dots\dots\dots (4),$$

a valores de pH ácidos la ec. (4) se reduce a:

$$\left(\frac{1}{V_m}\right)^* = \frac{1}{V_m} \frac{H}{V_m K_{es1}} \dots\dots\dots (5),$$

a valores de pH básico la ec. (4) se reduce a:

$$\left(\frac{1}{V_m}\right)^* = \frac{1}{V_m} \frac{K_{es2}}{V_m H} \dots\dots\dots (6)$$

De igual forma el doble recíproco de la pendiente de la ec. (3) corresponde a:

$$\left(\frac{K_m}{V_m}\right)^* = \frac{K_m}{V_m K_{e1}} H \frac{K_m K_{e2}}{V_m H} \frac{K_m}{V_m} \dots\dots\dots (7)$$

a valores de pH ácidos la ec. (7) se reduce a:

$$\left(\frac{K_m}{V_m}\right)^* = \frac{K_m}{V_m K_{e1}} H \frac{K_m}{V_m} \dots\dots\dots (8)$$

y a valores de pH básicos la ec. (7) queda:

$$\left(\frac{K_m}{V_m}\right)^* = \frac{K_m K_{e2}}{V_m H} \frac{K_m}{V_m} \dots\dots\dots (9)$$

De acuerdo con estas ecuaciones, si regraficamos los valores de las ordenadas al origen ( $1/Vm^*$ ) y las pendientes  $(Km/Vm)^*$  versus la concentración de  $H^+$  o el inverso de la concentración de  $H^+$  dependiendo el intervalo ácido o básico de pH, podemos obtener a partir del cruce con las abscisas el valor de las constantes de disociación  $Ke_1$ ,  $Ke_2$ ,  $Kes_1$  y  $Kes_2$  (Fig. 2):

Es importante notar que en los regráficos sólo los puntos que caen dentro de la recta son los que se toman en cuenta ya que los que no lo hacen son los puntos que se encuentran fuera del intervalo de pH en estudio. De esta forma los valores de  $pK$  (-log de las constantes) fueron  $pKe_1=6.65$  y  $pKe_2=9.52$ ; y  $pKes_1=6.6$  y  $pKes_2=9.57$ .

Otra forma de calcular los valores de  $pK$  y así identificar los aminoácidos involucrados en la unión y la catálisis enzimática, es mediante el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a las ecuaciones descritas arriba. La edición de las ecuaciones se realiza en un programa de cómputo adecuado (en este caso utilizamos el programa Origin 5.0).

Se editó la ec. (2) para obtener los valores de  $K_{es1}$  y  $K_{es2}$  y a partir de las ec. (2) y (3) se obtuvo la ecuación:

$$\frac{V_m}{K_m} = \frac{\left(\frac{V_m}{K_m}\right)^*}{(1 - K_{e1}/H)(H - K_{e2})} \dots\dots$$

(10) para obtener los valores de  $K_{e1}$  y  $K_{e2}$  (Fig. 3).

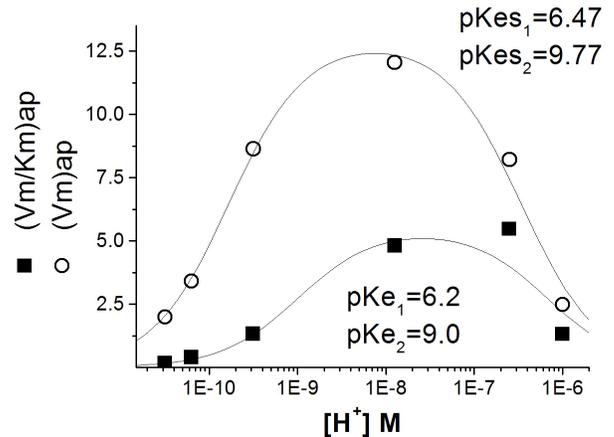


Figura 3

Una tercera opción para calcular los valores de  $pKa$  de los aminoácidos involucrados en la unión y la catálisis enzimática es por medio de gráficos de Dixon-Webb (3), los cuáles son de los más utilizados cuando se publican estudios de pH, aunque actualmente es más aceptado el ajuste no lineal. Estos gráficos se obtienen a partir de la forma logarítmica de las ecuaciones 2 y 10. Para la ecuación 2:

$$\log Vm^* = \log Vm + \log \left[ 1 + \left(\frac{H}{K_{es1}}\right) + \left(\frac{K_{es2}}{H}\right) \right] \dots\dots (11)$$

A valores de pH ácidos se desprecia el 1 de la ecuación y el término  $(Kes2/H)$  por ser infinitamente pequeños con respecto al segundo término. Entonces en su forma logarítmica la ec. 11 se simplifica:

$$\text{Log } Vm^* = pH - (pKes1 - \log Vm) \dots\dots\dots (12)$$

La ecuación 12 se encuentra expresada como una ecuación de la recta donde el pH es x, b es  $(pKes1 - \log Vm)$  y m es igual a 1.

De igual forma a valores de pH básicos, el primero y segundo términos de la ecuación 11 se eliminan debido a que son infinitamente pequeños con respecto al tercer

$$\log Vm^* = pH - (pK_{es2} - \log Vm) \dots\dots\dots (13)$$

De forma similar se obtiene la ecuación logarítmica de la ecuación 10 para intervalos de pH ácido:

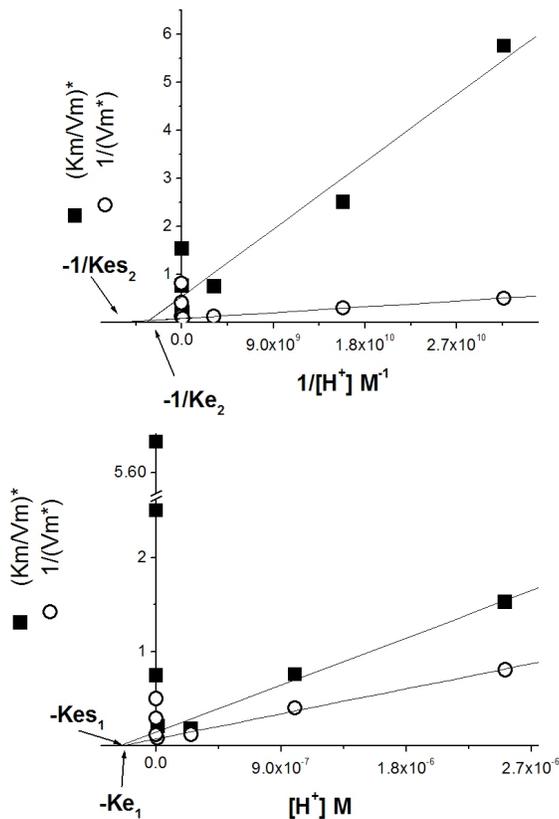


Figura 2

$$\log\left(\frac{V_m}{K_m}\right)^* = pH - [pK_{e1} - \log\left(\frac{V_m}{K_m}\right)] \dots\dots\dots(14)$$

y para intervalos de pH básico:

$$\log\left(\frac{V_m}{K_m}\right)^* = pH - (pK_{e2} - \log\left(\frac{V_m}{K_m}\right)) \dots\dots\dots(15)$$

Entonces si graficamos directamente el valor de pH contra el logaritmo de la  $V_m^*$  o contra el logaritmo de  $\frac{V_m}{K_m}$ , obtenemos un gráfico como el de la figura 4. De acuerdo con esta figura y con las ecuaciones 14 y 15 donde el valor de las pendientes es 1 y -1 respectivamente; si trazamos una línea recta de pendiente igual a 1 y otra de pendiente igual a -1 (Fig.4, líneas punteadas) hasta que intersecten con el valor de  $V_m$  y  $(V_m/K_m)$  reales, esto es:

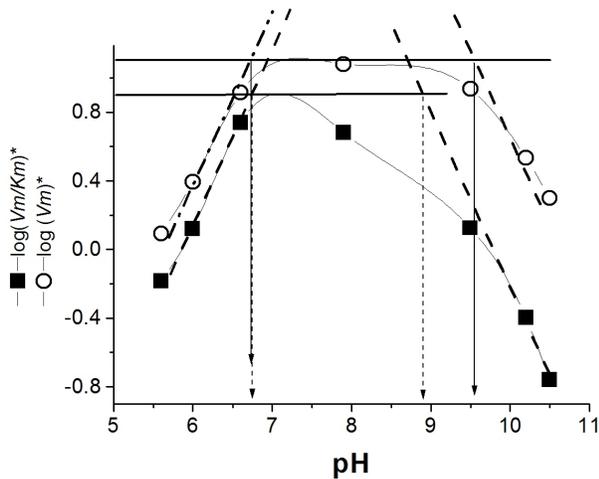


Figura 4

$$\frac{V_m^*}{V_m} = 1 \text{ y } \frac{(V_m / K_m)^*}{(V_m / K_m)} = 1, \text{ (Fig. 4, líneas}$$

horizontales) entonces los valores de  $pK_a$  serán iguales al valor de pH en el punto de cruce de estas dos líneas. Así sabremos directamente el valor de  $pK_{es1}$  y  $pK_{es2}$ ; así como el de  $pK_{e1}$  y  $pK_{e2}$  (Fig. 4, flechas continuas y flechas punteadas respectivamente). Es importante añadir que los resultados obtenidos de estos gráficos sólo son confiables cuando el valor de  $pK_a$  calculado de los aminoácidos involucrados es mayor de tres unidades de pH. De acuerdo con la figura 4 los valores de  $pK_{es1}$  y  $pK_{es2}$  fueron 6.7 y 9.5 respectivamente; mientras que para  $pK_{e1}$  y  $pK_{e2}$  fueron 6.7 y 8.9, respectivamente.

Los cuatro valores de  $pK_a$  obtenidos por los tres diferentes métodos fueron muy similares entre sí. De acuerdo con los autores, estos valores de  $pK_{es1}$  y  $pK_{e1}$  son similares a los de la histidina ( $pK_a$  5.5 a 7), y los de  $pK_{es2}$  y  $pK_{e2}$  sugieren la participación de una cisteína, ya que aunque su  $pK_a$  es muy bajo como aminoácido aislado ( $pK_a$  8 a 8.5), si se encuentra dentro de un ambiente hidrofóbico en la estructura tridimensional de la proteína su valor de  $pK_a$  puede subir hasta el valor reportado 9.5 (1). Sin embargo, de acuerdo con el  $pK_a$  de la lisina ( $pK_a$  9.5 a 10.6) éste podría ser el aminoácido ionizable que participe en la catálisis. Para poder corroborar la participación de la cisteína o de la lisina como el segundo grupo ionizable que participa en la catálisis enzimática es necesario hacer otro tipo de experimentos como la modificación química, en la cual se utilizan moléculas que reaccionen específicamente con cisteínas (p.ej. N-etil maleimida, ácido dinitrobenzónico) o lisinas (p.ej. Ortofenilaldehídos, peryodato) y determinar con cual se ve afectada la actividad enzimática al variar el pH del ensayo.

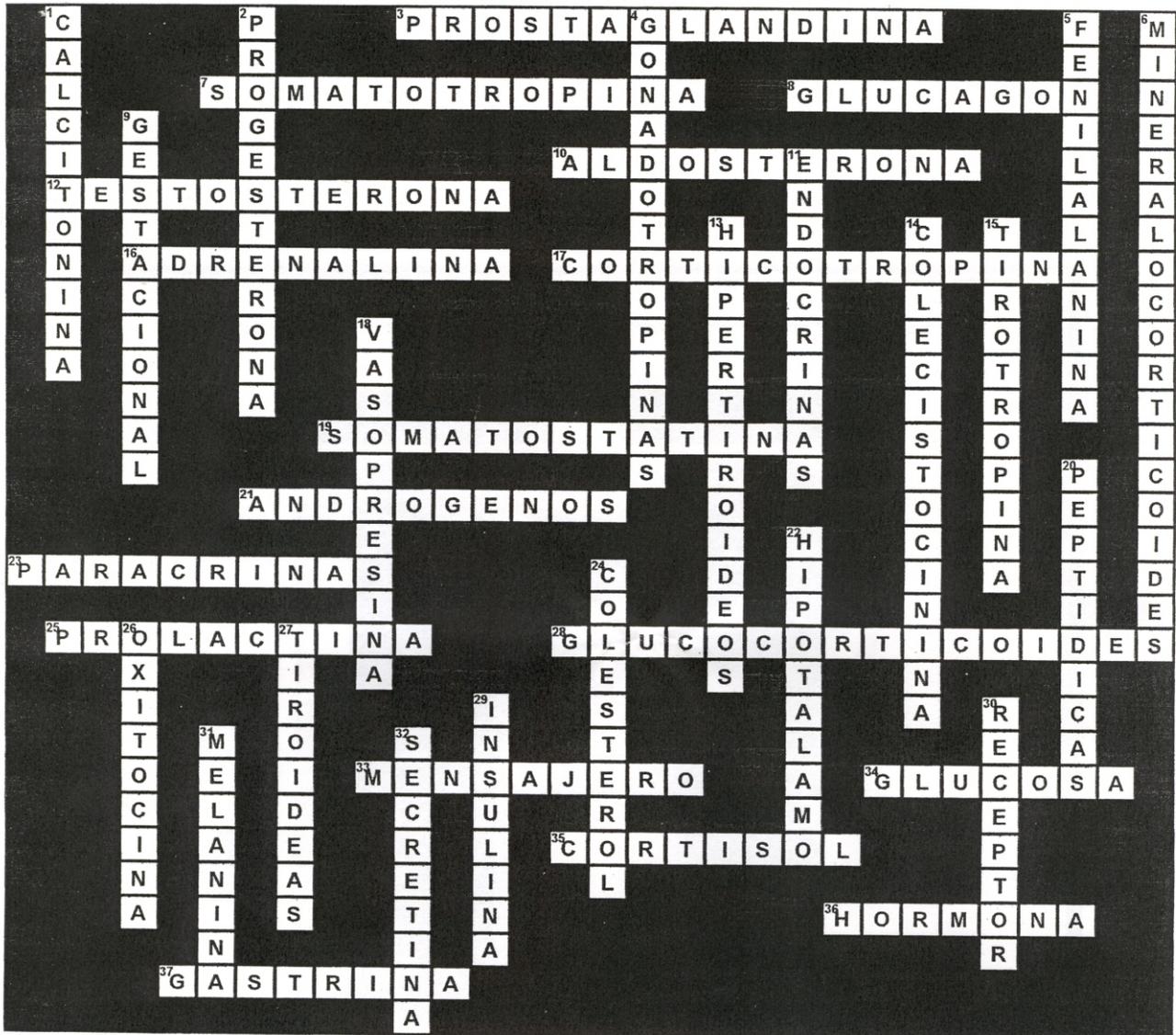
Como conclusión podemos decir que la ionización de los aminoácidos involucrados en la actividad de la proteasa específica para arginina de la *Porphyromonas gingivalis* se ven afectados fuertemente por los cambios en el pH, pero a pesar de esto, la enzima no se ve inhibida por completo por lo que seguirá actuando para provocar daño tisular en el hospedero.

REFERENCIAS

1. Rengarajan M, Smith J M, Rally U, y Curtis M A (1997) Biochem J 323, 701-709
2. Galgut P N (2001) J Int Acad Periodontol 3, 61-67
3. Segel Y H (1975) Enzyme kinetics. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

# SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

## BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS



## RECIBE PREMIO EN TAMAULIPAS LA DRA. YOLANDA SALDAÑA BALMORI.



El pasado 31 de marzo del año 2005, el Gobernador del Estado de Tamaulipas, Eugenio Hernandez Flores, tuvo a bien entregar un diploma y una medalla conmemorativa a la Dra. Yolanda Saldaña Balmori, editora fundadora de nuestra Revista de Educación Bioquímica. A partir de entonces su nombre está inscrito en el Muro de Honor “Luis García de Arellano” en el Congreso del Estado.



El reconocimiento al mérito “Luis García de Arellano” se concede a Tamaulipecos distinguidos por sus servicios eminentes prestados a la humanidad, en este caso, en el campo de la Medicina Fármaco-Biológica y en esta ocasión fue evaluado y otorgado por la LIX Legislatura Constitucional del Estado de Tamaulipas.



Dicho reconocimiento es entregado desde el 2003, siendo la Dra. Saldaña la acreedora al premio en su tercera edición, en el 2003 lo recibió el Dr. Ramiro Iglesias Leal, cardiólogo y médico espacial y en el 2004 lo obtuvo el ahora extinto Prof. Arquímedes Caballero Caballero.

El Comité Editorial de la Revista de Educación Bioquímica se complace en felicitar a nuestra entusiasta editora la Dra. Yolanda Saldaña Balmori y aprovecha la ocasión para agradecer todo su trabajo, su esfuerzo y su entrega para con la Revista.

José Víctor Calderón Salinas  
Editor en Jefe



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

La Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. convoca a todos los involucrados en el proceso de educación bioquímica, directivos, jefes de departamento, coordinadores de bioquímica o materias afines, organizadores de cursos y profesores, a que participen en el XIII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. presentando sus trabajos ya sea en forma oral o en cartel.

El XIII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. se llevará a cabo los días 11 y 12 de agosto del presente año en el Auditorio del Departamento de Psiquiatría de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del marco de la Semana de Educación Bioquímica 2005, a efectuarse del 8 al 12 de agosto.

El tema central del Congreso será: “**Diagnóstico de la Enseñanza de la Bioquímica en México**” lo que nos permitirá conocer la realidad al respecto en las carreras de Agronomía, Biología, Ciencias Químicas, Enfermería, Medicina, Nutrición Odontológica, Psicología Veterinaria u otra en donde se enseñe bioquímica.

Por tal razón los rubros a discutir en el Congreso serán:

- A) Los planes de estudio,
- B) Los diferentes programas,
- C) La duración de ellos,
- D) Los materiales de apoyo (libros, prácticas u otros),
- E) Los índices de inscripción,
- F) Los porcentajes de acreditación, de reprobación, de deserción, etc.

Adicionalmente en el Congreso se realizará el Panel-Foro “Fomento de la Enseñanza de la Bioquímica en México” dentro del Programa de Apoyo para el Mejoramiento de la Enseñanza, UNAM.

Para su participación en el Congreso es indispensable enviar un resumen que deberá estar escrito en letra Arial 10 a 11 puntos, con una extensión máxima de una cuartilla, a espacio sencillo y con un margen de 2.5 cm. por lado. El resumen del trabajo y la forma de registro se enviarán a más tardar el día **20 de junio del 2005**, por correo electrónico a reb@bq.unam.mx o se entregarán a la señora Marivel Rojas García en las oficinas de la Asociación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

## COSTOS

### Socios:

**Inscripción y pago de Membresía anual** **MN \$ 300.00**

### No socios:

**Inscripción** **MN \$ 350.00**

El pago de inscripción al Congreso deberá efectuarse por depósito a la cuenta No. 0133718123 en el banco BBVA Bancomer, Sucursal Perisur (3517) a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C y la fotocopia del mismo deberá enviarse por vía electrónica o por fax a la señora Marivel Rojas García al número 01 (55) 5616 2419.

La presentación del resumen debe apegarse al siguiente ejemplo:

### **LAS TÉCNICAS DIDÁCTICAS EMPLEADAS EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA DE CACTÁCEAS**

(renglón libre)

Carlos Treviño Carrillo, Mario Lozano Anaya y Luis Lira Grageda. Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad del Desierto. Av. Nubes No.22, Mezquite, Tamps.

(renglón libre)

TEXTO...

## COMITÉ ORGANIZADOR DEL CONGRESO

Dra. Yolanda Saldaña Balmori Dra. Virginia Sánchez Meza  
[balmori@laguna.fmedic.unam.mx](mailto:balmori@laguna.fmedic.unam.mx) [virginia@laguna.fmedic.unam.mx](mailto:virginia@laguna.fmedic.unam.mx)  
 Dra. Rocío Salceda Sacanelles  
[rsalceda@ifc.unam.mx](mailto:rsalceda@ifc.unam.mx)

## INFORMES:

Sra. Marivel Rojas García [reb@bq.unam.mx](mailto:reb@bq.unam.mx)

Teléfono: 01 (55) 5623-2170 Fax: 01(55) 5616-2419

**Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.**

**Apartado Postal 70-281, C. P. 04510, México, D. F.**

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

## FORMA DE REGISTRO

Nombre \_\_\_\_\_ Apellidos \_\_\_\_\_

Correo E: \_\_\_\_\_

Miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. Si  No

Jefe de departamento  Coordinador de la materia  Profesor

Nombre de la materia \_\_\_\_\_

Departamento \_\_\_\_\_

Escuela o Facultad \_\_\_\_\_

Universidad \_\_\_\_\_

Nombramiento: Tiempo completo  Medio tiempo  Por horas

### Domicilio Institucional

Calle y Número \_\_\_\_\_

Colonia \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_ C. P. \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_

### Domicilio Particular

Calle y Número \_\_\_\_\_

Colonia \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_ C. P. \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_

### Trabajos enviados al Congreso

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

Título de el o los trabajos: \_\_\_\_\_

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

(Programa Preliminar).

## JUEVES 11 DE AGOSTO DE 2005

- 7:30 - 9:00 h      **Registro e Inscripciones.**
- 9:00 9:20 h      **INAUGURACIÓN**
- 9:20 10:20 h      **Conferencia**  
**INMUNIDAD INNATA: ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES.**  
**Dr. Gerardo Vasta. Centro de Biotecnología Marina, Instituto de Biotecnología, Universidad de Maryland, Baltimore, MD.**
- 10:20 12:00 h      **Panel-Foro “FOMENTO DE LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA EN MÉXICO”**  
 (Programa de Apoyo para el Mejoramiento de la Enseñanza, UNAM).  
**Coordinación: Dra. Yolanda Saldaña Balmori. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM**
- 12:00 12:20 h      **RECESO**
- 12:20 14:00 h      **Presentaciones de trabajos en forma oral y en cartel.**
- 14:00 . 16:00 h      **RECESO**
- 16:00 19:00 h      **Taller “MÉTODO PARA DISEÑAR EXÁMENES DE OPCIÓN MÚLTIPLE”**  
**Dra. Rosa María Valle. Directora General de Evaluación Educativa, UNAM.**

## VIERNES 12 DE AGOSTO DE 2005

- 9:00 10:00 h      **Conferencia “FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN”**  
**Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas “Dr. Salvador Zubirán”**
- 10:00 11:20 h      **Presentaciones de trabajos en forma oral.**
- 11.20 1150 h      **RECESO**
- 11.50 13:30 h      **Presentaciones de trabajos en forma oral o en cartel.**
- 13:30 14:00      **Sesión de negocios**
- 14:00 - 16:00 h      **RECESO**
- 16:00 17:00 h      **Conferencia “ENIGMA DE LOS GENES SILENCIOSOS EN BACTERIAS”**  
**Dr. Edmundo Calva Mercado. Instituto de Biotecnología, UNAM Cuernavaca, Morelos.**
- 17:00 17:30 h      **RECESO**
- 17:30 18:30 h      **Presentaciones de trabajos en forma oral.**
- 18:30 h      **CLAUSURA**

# 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 Willey and Sons Ltd, pp81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 5) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta

china o bien impresiones láser o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 2002. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá obtenerse el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse así (Fig. X) numerándolas con arábigos. Las tablas siempre llevarán la inicial mayúscula y se numerarán con romanos.

- 6) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- 7) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

## II. OTRAS COMUNICACIONES

- 1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, comentarios o erratas de artículos publicados previamente, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica con el inciso I-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5

**Los manuscritos serán leídos por tres revisores en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.**

**El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal de la REB en su localidad.**