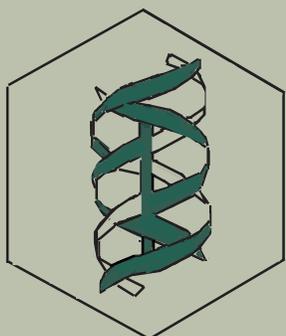


# REB 2008

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. 27

No. 1

MARZO 2008

# COMITÉ EDITORIAL

## EDITOR EN JEFE

### JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

## EDITORES

### MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México

### MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

### LEONOR FERNÁNDEZ RIVERA RÍO

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-Xochimilco

### 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

Departamento de Bioquímica  
Instituto Nacional de Cardiología  
"Dr. Ignacio Chávez"

### ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

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

## ASISTENTE EDITORIAL

### MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México

## 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

## CORRESPONSALES

### ROCÍO SALCEDA SACANELLES

**Coordinadora**  
Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México

### JORGE LUIS RICO PÉREZ

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Universidad Nacional Autónoma de México

### CARLOS CERVANTES VEGA

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

### JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

Facultad de Ciencias Básicas "Victoria de Girón"  
Instituto Superior de Ciencias Médicas. La Habana, Cuba

### ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas  
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

### MYRNA SABANERO LÓPEZ

Instituto de Investigación en Biología Experimental  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato

### SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

Departamento de Fisiología y Farmacología  
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

### MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

### MARÍA MALDONADO VEGA

Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en  
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., Mexico

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie, Redalyc y Latindex.

**REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)**, publicación trimestral. La presentación y disposición en conjunto y de cada página de la Revista de Educación Bioquímica son propiedad del editor. Derechos reservados © Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Queda estrictamente prohibida la reproducción parcial o total por cualquier sistema o método mecánico o electrónico sin autorización por escrito del editor. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de Contenido: 8397, expediente No. 1/432"2"/15792; Reserva al título en Derechos de Autor No. 04-2002-030616225500-102. (ISSN: 1665-1995); Reserva de título en Derechos de Autor para publicación electrónica No. 04-2005-092612014100-203 (ISSN: 187-3690). Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza; Tiraje 750 ejemplares. Impresión: Departamento de Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg. No. PP09-1001; UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina. Distribución electrónica: Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM (<http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica> o bien <http://www.puis.unam.mx>). Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F. Correo electrónico: [reb@bq.unam.mx](mailto:reb@bq.unam.mx).

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

# CONTENIDO

## COMITÉ EDITORIAL

## EDITORIAL

EL ORIGEN MULTIFACTORIAL DE LA OBESIDAD  
María Teresa Tusié Luna.....1

## ARTÍCULOS

LA AMPK Y LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA  
Selene Fragoso Iñiguez y Patricia Coello Coutiño.....3

BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES  
DE LA INSULINA  
Jesus Alberto Olivares Reyes y  
Araceli Arellano Plancarte.....9

MECANISMOS MOLECULARES DE  
DIVERSIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS  
Martha Rendón-Anaya y Alejandro Alagón .....19

## OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO  
REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE  
RIANODINA CARDIACOS POR MODULADORES  
ENDÓGENOS Y EXÓGENOS: EL CASO DEL  
Ca<sup>2+</sup> Y LA CAFEÍNA  
Angélica Rueda y Sánchez de la Vega.....30

CRUCIBIOQ  
OBESIDAD  
Yolanda Saldaña Balmori.....32

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO  
REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE  
RIANODINA CARDIACOS POR MODULADORES  
ENDÓGENOS Y EXÓGENOS: EL CASO DEL  
Ca<sup>2+</sup> Y LA CAFEÍNA  
Angélica Rueda y Sánchez de la Vega.....35

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ  
OBESIDAD  
Yolanda Saldaña Balmori.....37

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.  
XVI CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN  
MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA,  
A.C. Y XXXV TALLER DE ACTUALIZACIÓN  
BIOQUÍMICA.....38  
XXXV TALLER DE ACTUALIZACIÓN  
BIOQUÍMICA.....39

XXVII CONGRESO NACIONAL  
DE LA SOCIEDAD MEXICANA  
DE BIOQUÍMICA, A.C. ....40

INSTRUCCIONES PARA LOS  
COLABORADORES DE LA REVISTA DE  
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....41

# EDITORIAL

## EL ORIGEN MULTIFACTORIAL DE LA OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud considera la obesidad como una epidemia mundial ya que se estima existen más de 300 millones de obesos y alrededor de 700 millones de individuos con sobrepeso en el mundo. México muestra una de las prevalencias de obesidad y sobrepeso más altas presentándose en el 69.3% de la población adulta. Además la tendencia creciente de esta condición en nuestro país refleja cifras alarmantes con un incremento cercano al 30% en los últimos 13 años (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006). En estrecha relación con esta tendencia en adultos y a pesar de la poca información con respecto a la obesidad infantil, esta condición es frecuente ya durante la infancia y muestra un incremento similar en la prevalencia.

La obesidad tiene un origen multifactorial donde participan factores ambientales en estrecha relación con factores genéticos de riesgo subyacentes.

La obesidad es por si misma una entidad patológica ya que representa el principal factor de riesgo asociado a mortalidad cardiovascular en el mundo y el principal factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2. En nuestro país el aumento en la prevalencia de obesidad en los últimos años y la alta mortalidad por diabetes ha llevado por primera vez a reconocer este problema como de urgente atención dentro del Plan Nacional de Salud.

Para evaluar el grado de sobrepeso u obesidad se utiliza el índice de masa ( $IMC = \text{peso en kg} / \text{talla en m}^2$ ). Los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud, propusieron en 1997 puntos de corte para el IMC, donde un IMC mayor a 25  $\text{kg/m}^2$  se define como sobrepeso, y un IMC mayor a 30  $\text{kg/m}^2$  como obesidad. Datos epidemiológicos ha demostrado una correlación directa entre el IMC y el riesgo de complicaciones cardiovasculares y la tasa de mortalidad.

El rápido incremento en las tasas de obesidad ha sido atribuido a cambios recientes que han llevado por un lado a modificaciones en el estilo de vida con hábitos de alimentación distintos y un descenso progresivo de la actividad física y por otro al aumento en la disponibilidad de

alimentos particularmente de aquéllos con un alto contenido calórico como comida procesada, refrescos y otras bebidas azucaradas. Sin embargo, a pesar de que la población está expuesta a los distintos factores ambientales que promueven el desarrollo de obesidad se reconoce claramente una gran variabilidad interindividual en la susceptibilidad a la obesidad. Esto sugiere que la acumulación de grasa corporal tiene una base genética, no sólo en las formas monogénicas de obesidad, sino también en la obesidad común.

A este respecto, estudios en familias, gemelos, y estudios de adopción apoyan un componente genético sustancial para la obesidad común donde se estima que entre el 40% y el 75% de la variación en el índice de masa corporal puede atribuirse a factores genéticos. Sin embargo, la obesidad no se presenta como un rasgo mendeliano sino que presenta un patrón de herencia compleja donde participan un conjunto de genes de susceptibilidad modulados por la presencia de factores ambientales.

Distintas formas monogénicas de obesidad severa en modelos murinos han permitido identificar algunos genes y proteínas relevantes en su desarrollo lo que ha proporcionado información valiosa sobre la fisiología de la regulación del peso corporal en humanos. Un ejemplo de ello es la identificación del gen *Ob* en el ratón y su homólogo, la leptina en el humano, donde mutaciones en este gen provocan deficiencia de leptina o resistencia a la acción de la misma y los sujetos afectados (generalmente consanguíneos) presentan obesidad extrema, asociado en algunos casos a hipogonadismo hipogonadotrófico. Por su parte, las mutaciones en el gen del receptor de leptina en humanos resulta en hiperfagia, obesidad, hipogonadismo y disminución de las hormonas tirotrópica y somatotropa hipotalámicas (TRH y GHRH).

Otros genes asociados a formas monogénicas son el gen de la proopiomelanocortina (POMC), el gen del receptor número 4 de la  $\alpha$ -melanocortina (MC4R) y el gen de la prohormona convertasa 1. Variantes en estos genes

están presentes en aproximadamente 5% de los pacientes con obesidad mórbida (IMC > 40).

Dado que la mayoría de los genes causales de la obesidad monogénica en el humano no participan en la obesidad común de origen poligénico en la última década se han desarrollado distintas estrategias para la identificación de los genes de riesgo a la obesidad común de origen poligénico. Una de estas estrategias es el análisis de genes candidatos donde se evalúa la posible participación de variantes genéticas en distintos genes relacionados a vías metabólicas conocidas que pudieran participar en su patogénesis como los genes involucrados en la regulación del peso corporal específicamente en el control de la ingesta o en la regulación de la termogénesis (receptores  $\beta_2$  y  $\beta_3$  adrenérgicos o proteínas desacoplantes) y genes que influyen diferentes vías de señalización como la adipogénesis.

Una estrategia alterna para la identificación de genes relacionados a la obesidad es la estrategia de mapeo genético donde se analizan marcadores genéticos a lo largo del genoma y su relación con rasgos cuantitativos como el IMC o la circunferencia de cintura. Las regiones cromosómicas delimitadas por estudios de ligamiento son entonces analizadas por distintas estrategias de bioinformática con el fin de identificar genes candidatos circunscritos a estas regiones cromosómicas. Los genes candidatos posicionales son entonces analizados por medio de estudios de asociación intrafamiliar, en donde se comparan pacientes contra individuos normales (estudios caso-control).

Dos ejemplos recientes de la identificación de genes de riesgo a obesidad por estrategias de mapeo genómico son el gen INSIG2 (gen inducido por insulina) y el gen FTO (gen asociado a la masa grasa y la obesidad). El primero vinculado al metabolismo de esteroides en modelos animales, y el segundo vinculado a la regulación del apetito, sin que se entiendan a la fecha los mecanismos finos que los vincule al desarrollo de la obesidad.

Estas estrategias han resultado en la identificación de algunas variantes de secuencia génica comunes en la población asociadas al riesgo al desarrollo de obesidad. Sin embargo, la contribución de cada una de estas variantes es pequeña y por ello esta información no es útil para estimar un riesgo individual para el desarrollo de obesidad.

Sin embargo, la identificación de los distintos genes implicados en el riesgo a la obesidad a partir de la aplicación de distintas estrategias genómicas evidenciará la participación de distintos blancos proteicos y vías metabólicas, lo que proporciona a su vez información valiosa para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la prevención y el tratamiento de la obesidad y las complicaciones asociadas.

Ma. Teresa Tusié Luna  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México.

# LA AMPK Y LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA\*

Selene Fragoso Iñiguez<sup>1</sup> y Patricia Coello Coutiño<sup>2</sup>

## RESUMEN

Debido a la necesidad de mantener la homeostasis energética en los organismos, es una prioridad para los seres vivos el contar con una enzima capaz de evaluar el contenido energético celular. En células animales, la Cinasa Activada por AMP, AMPK (por sus siglas en inglés) es una enzima que regula algunos procesos metabólicos de acuerdo al estado energético; se activa durante el ejercicio, diabetes tipo II, obesidad y anoxia por lo que ha sido propuesta como un regulador metabólico durante condiciones energéticas anormales. Esta enzima es un complejo heterotrimérico que se activa alostéricamente por AMP, sin embargo para su completa activación necesita ser fosforilada por una cinasa río arriba conocida como LKB1. En todos los eucariontes analizados se encuentran complejos ortólogos a AMPK, lo que sugiere una alta conservación funcional en el control metabólico.

**PALABRAS CLAVE:** AMPK, SnRK1, ATP.

## ABSTRACT

Energetic homeostasis is a priority for all the organisms. Therefore, it is very important to have an enzyme capable of evaluating the changes in energetic status. In animal cells, the AMP Activated Kinase (AMPK) is an enzyme that regulates some metabolic pathways according to the energetic status. This enzyme is activated during exercise, type II diabetes, obesity and anoxia, and it has been postulated as a metabolic regulator during abnormal energetic conditions. This enzyme is a heterotrimeric complex that is activated allosterically by AMP; however, for a complete activation, it needs to be phosphorylated by an upstream kinase, LKB1. There have been found orthologs to AMPK in all the eukaryotes analyzed so far, suggesting a high functional conservation in the metabolic control.

**KEY WORDS:** AMPK, SnRK1, ATP.

## INTRODUCCIÓN

¡Vivir resulta a veces tan apremiante! Estamos siempre ocupados en miles de asuntos a la vez que terminamos haciendo las cosas de una manera autónoma, nos enfocamos sólo en lo que nos interesa y hemos perdido la capacidad de observar los detalles de la vida que la hacen tan compleja, pero estas sutilezas pueden resultar sumamente importantes, puesto que si nuestro organismo no funciona adecuadamente sería imposible realizar todo lo que necesitamos hacer día con día. Pero... ¿Quién y cómo se encarga del buen funcionamiento de nuestro organismo?

Para sobrevivir necesitamos energía y ésta se obtiene de nuestro medio am-

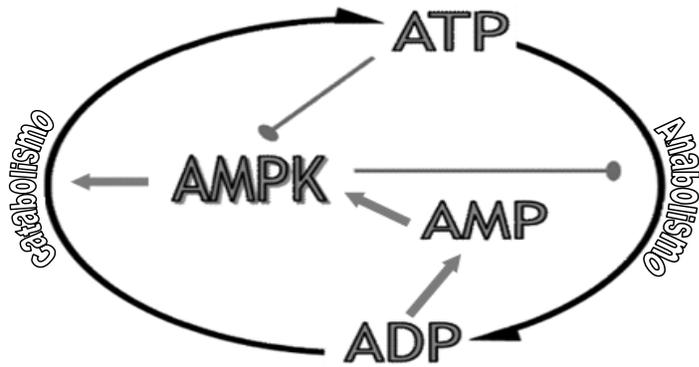
biente, sin embargo esto no es suficiente ya que para poder ser utilizada, la energía debe transformarse en el organismo. Los seres heterótrofos oxidan los alimentos a Acetil CoA obteniendo ATP a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, mientras que los autótrofos deben transformar la energía solar en ATP para poder utilizarla.

El ATP es una molécula clave en el metabolismo de los seres vivos, se considera universalmente como la "moneda energética de la célula" puesto que al hidrolizar los enlaces fosfato que contiene, se libera una gran cantidad de energía (7.3 Kcal/mol); en promedio un adulto necesita ingerir 2500 Kcal diarias, un mol de glucosa que se asimila en el cuerpo típicamen-

te produce 29 moles de ATP que equivalen a aproximadamente 212 Kcal. De manera que la energía celular puede medirse como el contenido de ATP. Sin embargo éste no es constante y varía de acuerdo a las condiciones fisiológicas, por lo que es necesario un mecanismo que indique cuando hay poco ATP y cuáles son los pasos que el organismo debe seguir para poder mantener su homeostasis energética. Existe una enzima denominada cinasa activada por AMP o AMPK (por sus siglas en inglés, AMP activated Kinase) que se activa cuando disminuye el contenido de ATP y aumenta el de AMP, esta enzima es capaz de apagar vías que consumen ATP y encender otras que ayuden a conservarlo (1).

\*Recibido: 13 de marzo de 2008 Aceptado: 10 junio de 2008 (artículo publicado extemporáneamente)

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Bioquímicas <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Delegación Coyoacán, CP 04510 Teléfono 56225280, Correo E: seleneffi@yahoo.com.mx



**Figura 1.** Activación de AMPK dependiendo de la carga energética de la célula. De manera general en las vías anabólicas el ATP, se convierte a ADP y finalmente a AMP lo que repercute en la activación de la AMPK, ésta enciende vías catabólicas e inhibe las anabólicas lo que permite optimizar el contenido de ATP.

¿Es posible que esta enzima resulte ser una especie de "detector" metabólico capaz de monitorear los niveles de ATP?, en esta revisión trataremos de proporcionar datos al respecto.

### AMPK

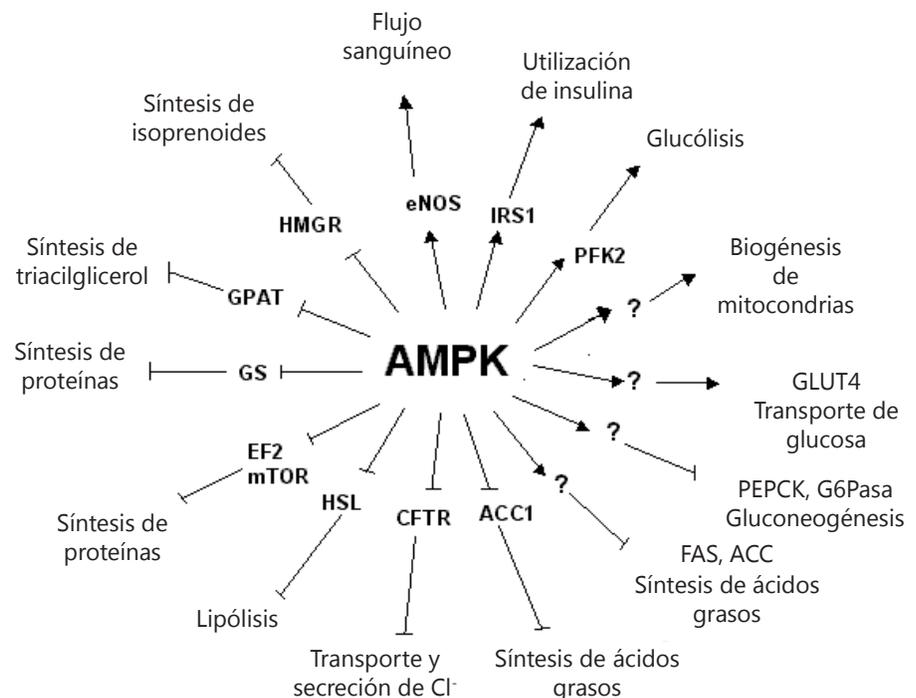
La mayoría de los procesos celulares que consumen energía lo hacen impulsados por el paso de ATP a ADP. Cuando algún estrés hace que esta relación disminuya, aumenta el contenido intracelular de AMP lo que activa a la AMPK (Fig. 1), por ejemplo durante el ejercicio, la isquemia y también en la diabetes, en donde, a pesar de haber glucosa en la sangre, ésta no puede entrar a la célula y por lo tanto la célula resiente la falta de energía.

Una vez activada, la AMPK fosforila un gran número de proteínas provocando el apagamiento de ciertas vías anabólicas que consumen energía, como la biosíntesis de macromoléculas, crecimiento y proliferación celular, mientras que enciende las vías que producen ATP como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos. Esto puede ser a través de la fosforilación de enzimas involucradas directamente en la regulación de las vías correspondientes, o a través de regular la expresión génica de la célula (Fig. 2).

Otros factores que activan a la AMPK son adipocinas (Cuadro 1) como la adiponectina y la leptina (2).

### Composición y Regulación de la AMPK

La AMPK es un complejo heterotrimérico formado por tres



**Figura 2.** Blancos de AMPK. Las proteínas y procesos activados por AMPK se indican con una flecha, mientras que los inhibidos con una flecha sin punta. Cuando el efecto es causado por un cambio en la expresión génica se colocó un signo de interrogación pues no se conoce el factor de transcripción sobre el que actúa la AMPK. Abreviaciones ACC, acetil-CoA carboxilasa, CFTR, regulador transmembranal de la fibrosis quística; EF2, factor de elongación 2, eNOS sintasa endotelial de óxido nítrico; FAS, sintasa de ácidos grasos; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxilasa; G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa; GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; GLUT4, transportador de glucosa; GS, glucógeno sintasa; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; HSL, hormona sensible a lipasa; IRS1 sustrato receptor de insulina; PFK2, fosfofructocinasa; mTOR, blanco de rapamicina en mamíferos. Adaptado de de la referencia 1.

*En años recientes se ha cambiado el concepto de que el tejido adiposo blanco sólo sirve como reservorio de energía en forma de grasa, ahora se sabe que este tejido es altamente dinámico y se encuentra involucrado en una gran variedad de procesos fisiológicos y metabólicos. Además de acumular/liberar ácidos grasos, los adipocitos secretan adipocinas, que son proteínas con propiedades de señalización que participan en una gran variedad de procesos como el balance energético, inmunidad, sensibilidad a insulina, formación de nuevos vasos sanguíneos, presión sanguínea, metabolismo de lípidos y hemostasis\*, de las cuales se han descrito cerca de 50 variedades (15).*

*Dos de estas adipocinas han sido ampliamente estudiadas, la Adiponectina y la leptina*

*Adiponectina. Suprime la producción hepática de glucosa, reduce la resistencia a la insulina través de disminuir el contenido de triglicéridos; incrementa la oxidación de ácidos grasos, favorece la toma de glucosa y la producción de lactato en miocitos, la fosforilación de acetil-CoA carboxilasa y la reducción de moléculas involucradas en la gluconeogénesis en el hígado y la reducción de los niveles de glucosa (2).*

*Leptina: su secreción puede reducir el apetito e incrementar el gasto energético (favorece la lipólisis). Ha sido asociada también con la angiogenesis, la hematopoyesis, la inmunidad y la formación de huesos y se piensa que juega un papel importante en el desarrollo sexual normal y en la reproducción (15).*

*\*Proceso mediante el cual se detiene el sangrado y cuyo mecanismo final para conseguirlo es la coagulación.*

---

**Cuadro 1.** *El tejido graso es dinámico.*

subunidades, una catalítica conocida como  $\alpha$  y dos reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$ . En humanos existen dos isoformas de la  $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), dos de la subunidad  $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y tres de la  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , y  $\gamma 3$ ). La expresión de la subunidad  $\alpha 1$  es citoplásmica y parece ser ubicua en el cuerpo, mientras que la subunidad  $\alpha 2$  se restringe al corazón, músculo e hígado pero puede estar localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo (3). Esta subunidad está constituida por dos dominios, uno con la actividad de cinasa (DK) y un dominio autorregulador (DR).

La subunidad  $\beta$  contiene tres dominios: hacia el N-terminal un dominio de unión a glucógeno (GBD, Glucogen Binding Domain), el dominio KIS (por sus siglas en inglés, Kinase Interacting Sequence) y el dominio ASC (Association with Snf1 Complex) en el extremo C-terminal. Mediante el dominio KIS se une a la subunidad  $\alpha$  mientras que la subunidad  $\gamma$  une al ASC, por lo que esta subunidad constituye la base del complejo, permitiendo la interacción

entre las tres subunidades.

Finalmente la subunidad  $\gamma$  está formada básicamente por dos motivos Bateman, constituidos a su vez por cuatro CBS (Cystathione  $\beta$  synthase), los cuales pueden unir ligandos que contengan adenosina, como AMP, ATP o S-Adenosilmetionina, lo que sugiere que es realmente la subunidad  $\gamma$  la que está monitoreando el contenido celular de ATP y AMP. De manera interesante, mutaciones en esta subunidad conducen a enfermedades cardíacas (4).

El modelo propuesto para la regulación de AMPK postula que en presencia de altos niveles de ATP, el DR de la subunidad  $\alpha$ , enmascara al DK; cuando estos niveles caen y aumenta el contenido de AMP, la subunidad  $\gamma$  une AMP lo que produce un cambio conformacional exponiendo el dominio catalítico para facilitar su acción (Fig. 3). Sin embargo, para la activación completa del complejo es necesaria la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  en un residuo de treonina; en humanos es la T172, fosforilación que es

llevada a cabo por la cinasa de proteínas LKB1 (Conocida también como STK11, Serine/Threonine Kinase, y que ha sido descrita como supresor tumoral), en algunas células de origen neuronal donde no existe expresión de la LKB1, la AMPK puede ser fosforilada por la cinasa CaMKK- $\beta$  (Calmodulin dependent protein Kinase Kinase) (5).

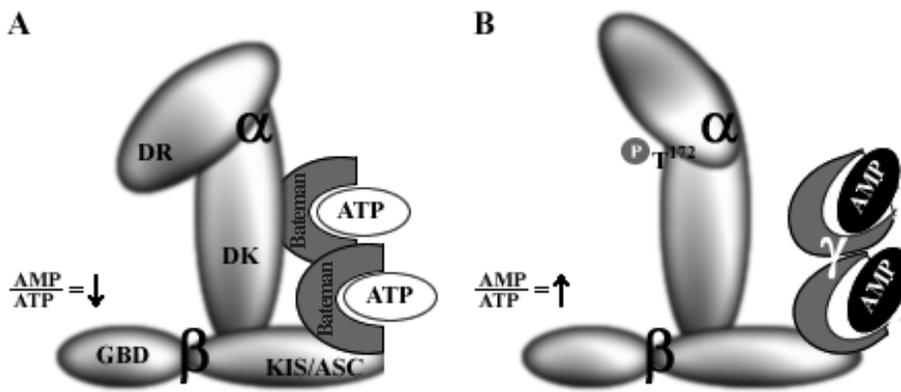
**Si no tienes energía, no piensas en reproducirte**

La LKB1, había sido ampliamente estudiada antes de que se conociera la función descrita, ya que el gen correspondiente está mutado en pacientes con el síndrome de Peutz-Jeghers, el cual se caracteriza por una predisposición a desarrollar tumores en el tracto digestivo (6).

De manera que la LKB1 está íntimamente ligada con el desarrollo de cáncer. Se propone que en el síndrome Peutz-Jeghers la propensión a la formación de tumores se debe a que no hay quien active a la AMPK y por tanto no existe quien detecte los niveles energéticos de la célula y regule el metabolismo, lo que deriva en que la célula no registre cambios en su contenido energético y siga reproduciéndose. Esta conexión entre cáncer y energía resume bastante bien la importancia que tiene la AMPK en el mantenimiento de la homeostasis energética.

**SNF1 y su papel dentro del metabolismo del carbono**

Snf1 (por sus siglas en inglés Sucrose Non Fermenting) es la proteína homóloga a la AMPK en la levadura (*Saccharomyces cereviceae*), este microorganismo utiliza como fuente de energía preferida la glucosa, a través de un proceso conocido como fermentación en donde la energía química contenida en la glucosa es liberada mediante su degradación a etanol a través de la glucólisis.



**Figura 3.** Activación de AMPK. El dominio catalítico (DK) de la subunidad  $\alpha$  permanece bloqueado mientras los niveles de ATP son normales (A), cuando éstos disminuyen la subunidad  $\alpha$  sufre una modificación conformacional debida a la unión con AMP, esto permite que el dominio catalítico se exponga y que se fosfore la T172 completando así el estado de activación del complejo (B).

Las levaduras pueden adaptar su metabolismo para utilizar otras fuentes de carbono como sacarosa e incluso etanol. Esto se logra a través de la combinación de dos mecanismos principalmente, la inducción y la represión por glucosa (7). En presencia de glucosa, varios genes que codifican para

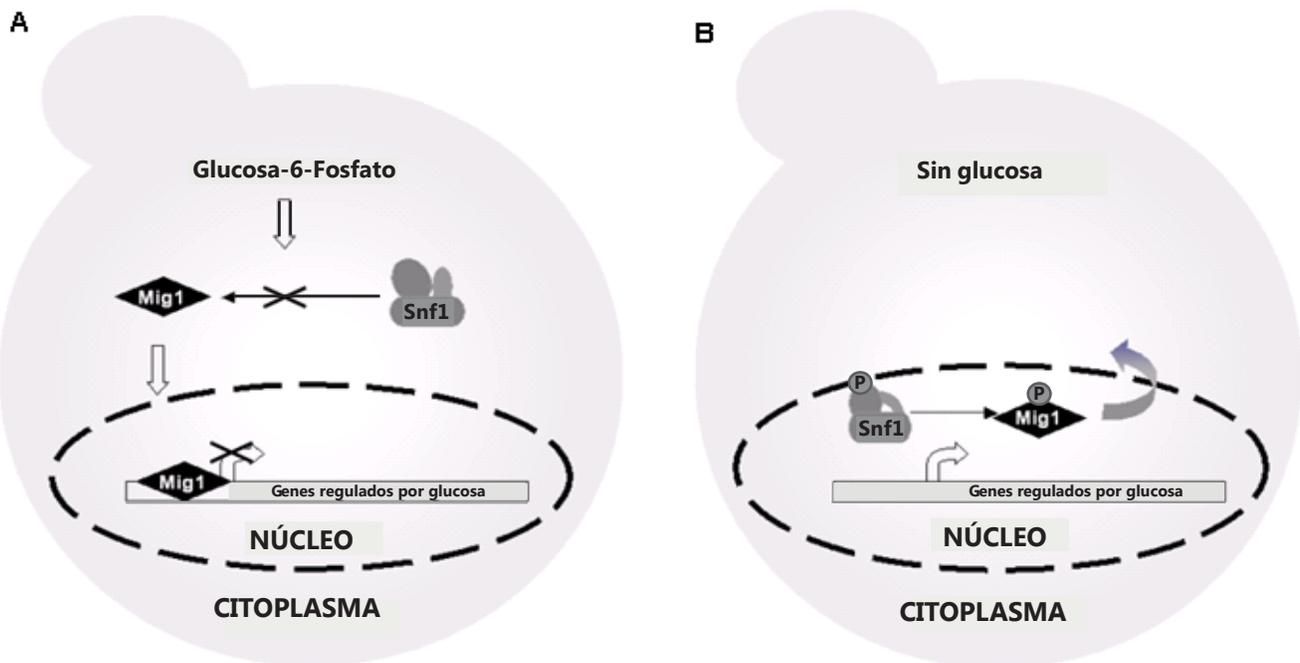
proteínas que permiten el uso de otros carbohidratos, permanecen reprimidos transcripcionalmente; esta represión se da por la acción de la proteína Mig 1 (Multicopy Inhibitor of GAL genes), que en presencia de glucosa, se une a los promotores de los genes blanco. En ausencia de glucosa, Mig1

se fosforila y se transloca rápidamente al citoplasma, liberando a los genes blanco de la represión, permitiendo así la utilización de fuentes alternas de carbono (Fig. 4) (8).

La proteína responsable de la fosforilación de Mig1 es Snf1 quien recibió este nombre porque la mutante  $\Delta snf1$  es incapaz de crecer en ausencia de glucosa. El gen *snf1* es esencial para el crecimiento en cualquier fuente alterna de carbono puesto que se necesita para la activación de los genes reprimidos por glucosa pero además, es necesario para la esporulación, la acumulación de glucógeno y la biogénesis de peroxisomas (9), por lo que Snf1 tiene un papel clave en el metabolismo de la levadura.

#### Cinasas Relacionadas con Snf1

Existen cinasas homólogas de AMPK y por tanto de Snf1, en un gran número de organismos eucariontes; esto ha sido comprobado mediante la búsqueda no sólo del gen, sino de la



**Figura 4.** Representación esquemática de la represión por glucosa en levadura. (A) En presencia de glucosa, Mig1 entra al núcleo donde se une a los promotores de los genes reprimidos por glucosa impidiendo su transcripción. (B) En ausencia de glucosa, el complejo Snf1 fosforila a Mig1 y con ello se exporta del núcleo favoreciendo la expresión de los genes reprimidos por glucosa.

actividad de AMPK. Con este fin y puesto que tanto AMPK como Snf1 presentan dominios catalíticos altamente conservados, se han podido diseñar péptidos sintéticos para la evaluación de la actividad de AMPK; por ejemplo, la acetil-CoA carboxilasa es un sustrato conocido de la AMPK y a partir de su secuencia de aminoácidos se diseñó el péptido SAMS (10), un péptido que ha resultado sumamente útil en la caracterización de cinasas relacionadas con Snf1 (SnRK por *Snf1 Related Kinases*) de plantas.

En plantas, la primera secuencia de una cinasa relacionada con Snf1 (SnRK) se publicó en 1991 y desde entonces se han identificado 73 proteínas más que forman parte de esta familia. Estas pueden ser clasificadas en tres subfamilias SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Se considera SnRK1 como la homóloga funcional a AMPK y Snf1. Se han descrito miembros de esta subfamilia en centeno, cebada, papa, trigo y *Arabidopsis* entre otros. Este subgrupo puede ser dividido a su vez en SnRK1a, que está presente en todas las plantas y SnRK1b, que está representado sólo en los cereales (11, 12). Las SnRK de plantas tienen como sustratos *in vitro* a la HMG-CoA

reductasa, la sacarosa fosfato sintasa y la nitrato reductasa, inactivándolas al fosforilarlas (13).

Además, la expresión en antisentido de una SnRK1 en papa, resultó en un aumento de la expresión de genes que codifican para la sacarosa sintasa y la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzimas clave en el paso de sacarosa a almidón (14). Se ha demostrado también que, SnRK1 es necesaria para la expresión de la  $\alpha$ -amilasa (15). Esto sugiere que estas enzimas, en analogía con las AMPK, pueden regular varias vías biosintéticas incluyendo la síntesis de isoprenoides, la síntesis de sacarosa y la asimilación del nitrógeno a través de la fosforilación directa de las enzimas claves de dichos procesos o regulando la expresión génica.

### CONSIDERACIONES FINALES

Recientemente se ha postulado que la unión de AMP en la subunidad  $\gamma$ , no es el único mecanismo en que esta subunidad participa en la activación del complejo, ya que existe una secuencia pseudosustrato en ella, la cual mantiene bloqueado el sitio activo de  $\alpha$  hasta que la unión del AMP produce un cambio conformacional que favorece la

activación (16). Esta información puede ser de mucha utilidad en el desarrollo de fármacos para activar al complejo, cuyo blanco sea  $\gamma$ .

La información que se tiene de estas cinasas de proteínas ha permitido proponer que la familia AMPK/Snf1/SnRK1, tiene la función principal de ser una especie de "sensor" del contenido energético de la célula ya sea animal o vegetal, lo que a su vez actuaría activando procesos metabólicos esenciales para permitir el funcionamiento óptimo del organismo, incluso en condiciones de estrés.

La existencia de homólogos al complejo AMPK/Snf1/SnRK1, en todos los seres vivos en que se ha buscado, sugiere que este complejo es indispensable para la supervivencia de los seres vivos y que debe haber surgido tempranamente en la evolución para solventar la necesidad innata de los organismos de mantener la homeostasis, particularmente la energética.

### AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Estela Sánchez de Jiménez y Mario Rocha Sosa por la revisión crítica de este escrito.

### REFERENCIAS

1. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters* 548: 113-120.
2. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Wak H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma F, Fougère F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Naga R, Kahn B, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295.
3. Nielsen JN, Mustard KJ, Graham DA, Yu H, MacDonald CS, Pilegaard H, Goodyear LJ, Hardie DG, Richter EA, Wojtaszewski JF (2003) 5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 94: 631-641.
4. Scott WJ, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie G (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113:274-284.

5. Hardie DG, Sakamoto K (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21:48-60.
6. Forcet C, Etienne-Manneville S, Gaude H, Fournier L, Debilly S, Salmi M, Baas A, Olschwang S, Clevers H, Billaud M (2005) Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveal that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity. *Hum Mol Genet* 14:1283-1992.
7. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2:183-20.
8. De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* 8:1603-1618.
9. Halford NG, Hardie DG (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants. *Plant Mol Biol* 37: 735-748.
10. Davies SP, Carling D, Hardie DG (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem* 186:213-128.
11. Halford N, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y (2003) Metabolic signaling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* 54:467-475.
12. Sudgen C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie G (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy, 3-methylglutaryl-coenzima A reductase, nitrate reuctase y sucrose phosphate syntase in vitro. *Plant Physiol* 120:257-274.
13. McKibbin RS, Muttucumaru N, Paul MJ, Powers SJ, Burrell MM, Coates S, Purcell PC, Tiessen A, Geigenberger P, Halford N (2006) Production of high, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol J* 4:409-418.
14. Laurie S, McKibbin RS, Halford NG (2003) Antisense SnF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot* 54:739-747.
15. Trayhurn P, Wood IS (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347-355.
16. Scott JW, Ross FA, Liu JKD, Hardie DG (2007) Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the g subunit. *EMBO J* 26:806-815.

# BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA\*

Jesús Alberto Olivares Reyes y Araceli Arellano Plancarte

## RESUMEN

La insulina es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas. La incapacidad de las células blanco de responder a la insulina, debido presumiblemente a defectos en su señalización, estado conocido como resistencia a la insulina, es una de las principales características de manifestaciones patológicas asociadas con la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), una de las primeras causas de muerte en México y a nivel mundial. El objetivo de la presente revisión es dilucidar las bases moleculares de las acciones de la insulina y de los mecanismos involucrados en regular sus efectos. El comprender estos mecanismos permitirá comprender cuales son las causas asociadas con el desarrollo de la resistencia a la insulina y la DM2.

**PALABRAS CLAVE:** Insulina, diabetes mellitus tipo 2, receptor de insulina, sustrato del receptor de insulina, cinasa Akt, resistencia a la insulina.

## ABSTRACT

Insulin is a hormone released by pancreatic beta cells in response to elevated levels of nutrients in the blood, controlling critical energy functions such as glucose and lipid metabolism. When insulin binds to the insulin receptor (IR), the activated receptor triggers multiple signaling pathways that mediate the biological actions of insulin. Failure of target cells to respond to insulin presumably because of defects in the insulin signaling pathway, a state known as insulin-resistance, is a major attribute to the pathological manifestations associated with diabetes mellitus type 2 (DM2), one of the first causes of death in Mexico and worldwide. The objective of the present review is to unravel the molecular basis for insulin actions and the mechanisms involved in regulating its effects. Understanding these mechanisms will allow us to understand what are the causes associated with the development of insulin resistance and DM2.

**KEY WORDS:** Insulin, diabetes mellitus type 2, insulin receptor, insulin receptor substrate, Akt kinase,

## INTRODUCCIÓN

El apropiado almacenamiento y liberación de energía durante los estados de alimentación y ayuno son esenciales para la sobrevivencia y son controlados principalmente por la acción de la insulina. La insulina es una hormona peptídica de 5.8 KDa, y es secretada por las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal,

entre 80-105 mg/dl favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo y en hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción. Además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos. Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva a una

serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr). Estas cinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula (1, 2).

## RECEPTOR DE INSULINA

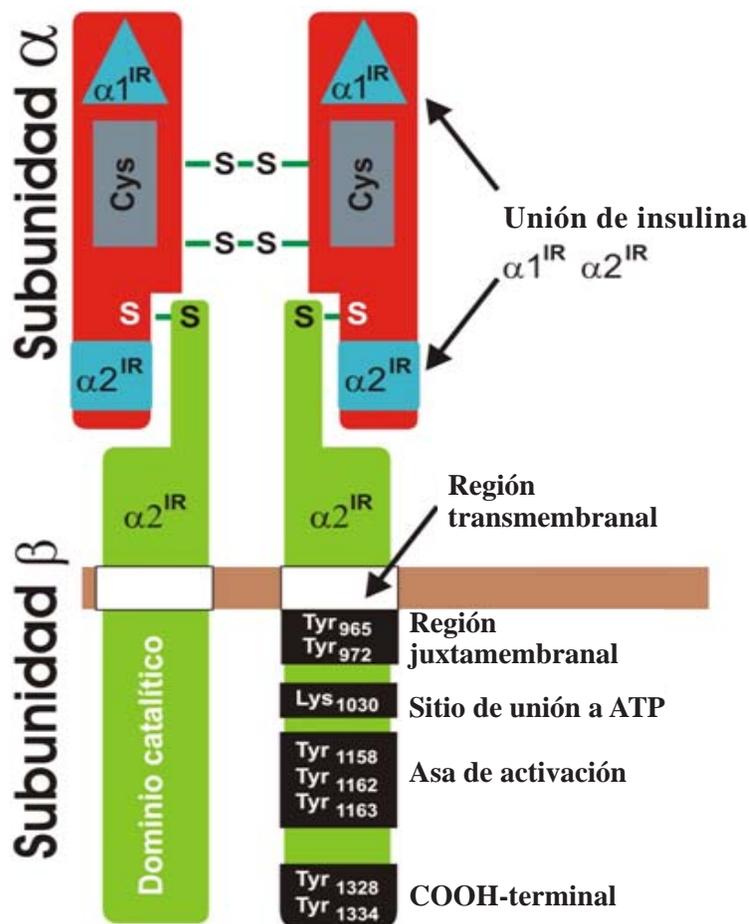
La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (IR) es una glicoproteína que

\*Recibido: 7 de febrero de 2008 Aceptado: 13 de mayo de 2008 (artículo publicado extemporáneamente)  
Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN #2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México, D.F. Correo E: jolivare@cinvestav.mx

pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (3).

El IR es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades  $\beta$  tienen una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de Tyr. En la región intracelular se han identificado tres regiones estructurales que incluyen: 1) región yuxtamembranal intracelular, que parece ser importante en la transmisión de la señal y en donde se localizan las tirosinas Tyr<sup>965</sup> y Tyr<sup>972</sup> (4); 2) región reguladora en donde se encuentran las tirosinas Tyr<sup>1158</sup>, Tyr<sup>1162</sup> y Tyr<sup>1163</sup>. La autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad de cinasa del receptor y 3) región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal (Tyr<sup>1328</sup>, Tyr<sup>1334</sup>) que al parecer puede jugar un importante papel regulador pero no en la señalización del receptor (3) (Fig. 1).

En condiciones de no estímulo, las subunidades  $\alpha$  ejercen un papel regulador sobre las subunidades  $\beta$ , inhibiendo la capacidad del receptor para autofosforilarse. Después de que la insulina se une a su receptor, las subunidades  $\alpha$  sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades  $\beta$  se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de Tyr. El mecanismo de autofosforilación al parecer se da por procesos de cis- y trans- autofosforilación mediante las cuales ciertos residuos son fosforilados por la



**Figura 1.** Estructura del Receptor de Insulina: dominios funcionales del receptor. El IR es un heterotetrámero que consiste de dos subunidades  $\alpha$  extracelulares unidas a dos subunidades  $\beta$  por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  contienen las regiones de unión a insulina  $\alpha 1^{IR}$  y  $\alpha 2^{IR}$  en adición a una región rica en cisteínas (Cys). La subunidad  $\beta$  contiene una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular. En su porción intracelular se localiza un dominio catalítico de cinasa de tirosina con un sitio de unión a ATP y sitios de fosforilación en tirosina que se localizan en las regiones yuxtamembranal (Tyr<sup>965</sup>, Tyr<sup>972</sup>), asa de activación (Tyr<sup>1158</sup>, Tyr<sup>1162</sup>, Tyr<sup>1163</sup>) y carboxilo terminal (Tyr<sup>1328</sup>, Tyr<sup>1334</sup>).

actividad de fosfotransferasa de la misma subunidad  $\beta$  (cis-), mientras que otros son sustrato de la actividad de cinasa de la subunidad  $\beta$  opuesta (trans-). Además, estudios recientes han reportado que se requiere de al menos 7 sitios de fosforilación en Tyr en el IR y de la actividad enzimática de cinasa de Tyr para el apropiado funcionamiento del receptor (5).

### VIAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se

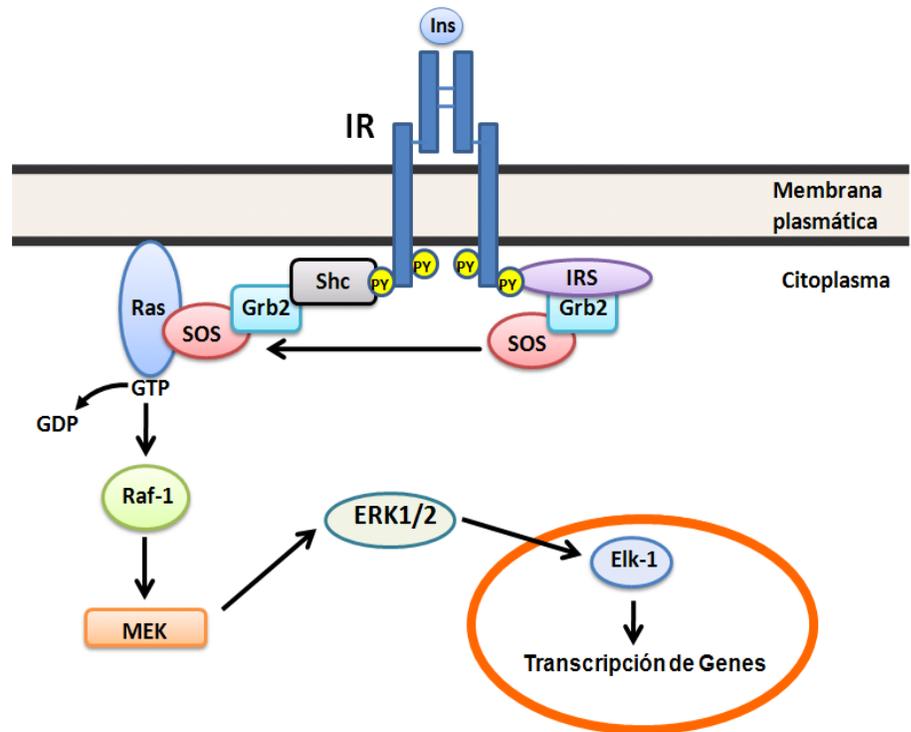
inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (2, 3).

### a) Vía de señalización de las MAP cinasas.

Los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas son mediados principalmente a través de la activación de la vía de señalización de las MAP cinasas (Fig. 2). La fosforilación en residuos de Tyr del dominio citoplasmático del IR, promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de la vía, que involucra el reclutamiento y activación de MEK (también llamada cinasa de MAP cinasa) y de las ERK1 (cinasa regulada extracelularmente 1) y ERK2. Alternativamente a esta vía de señalización que lleva a la activación de las ERK1 y ERK2 (conocidas genéricamente como MAP cinasas), la insulina es capaz de activar a estas proteínas por una vía independiente de Shc, pero que depende de la activación del IRS (sustrato del receptor de insulina). Una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc (Fig. 2). Las MAP cinasas tienen una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras cinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina pero no en la regulación del transporte de glucosa (2, 6).

### b) Vía de señalización de la PI3K

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. La transducción de señales a



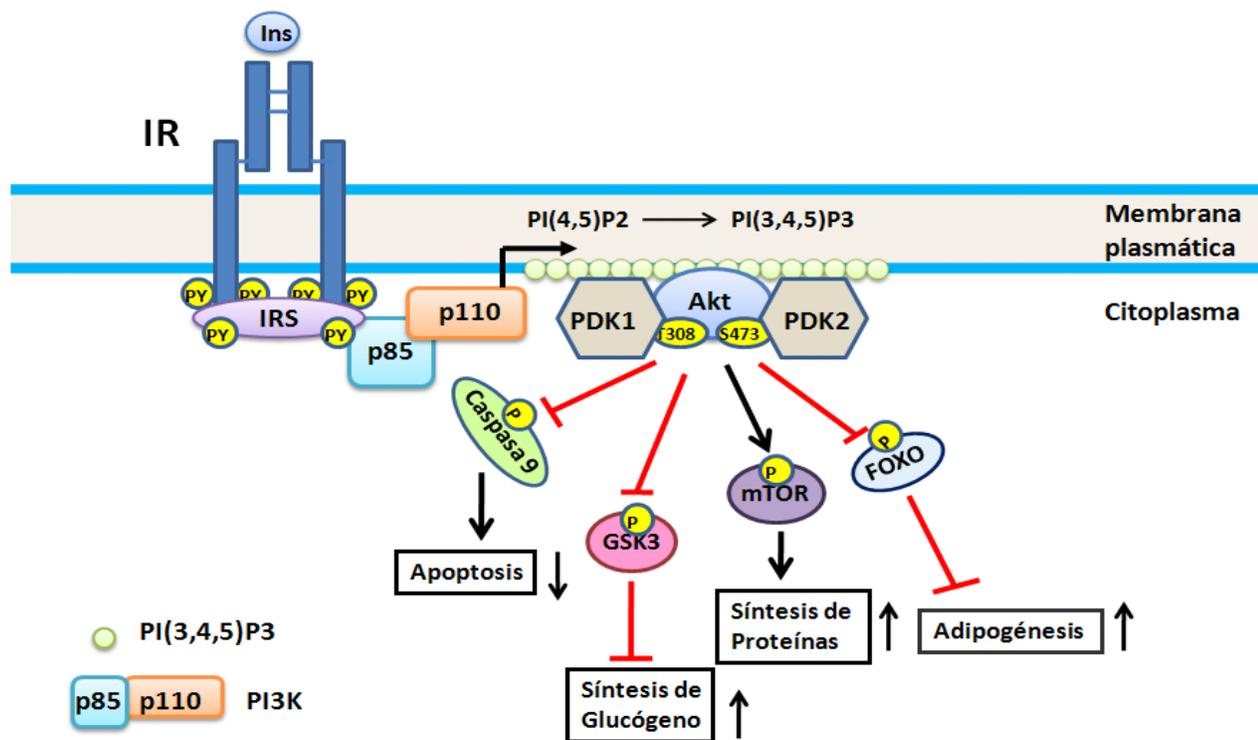
**Figura 2.** Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras, la cual inicia el encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2. Alternativamente existe una vía independiente de Shc pero dependiente de la activación del IRS por la que la insulina es capaz de activar a las MAPKs. En esta, una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc.

través de la vía de PI3K se esquematiza en la figura 3 y se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con IRS y lo fosforila. Las proteínas IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento de IRS al IR activo. Adicionalmente, los IRSs contienen entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación (en función del tipo de IRS, de los cuales se conocen 4 isoformas, IRS-1 a IRS-4), que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), muchas

de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras, como es el caso de PI3K, Grb2 (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento), Crk II, SHP-2 (proteína tirosina fosfatasa con homología a Src), entre muchas otras (6).

A pesar de que existen 4 isoformas de IRS, al parecer la que está involucrada en el transporte de glucosa a las células es la isoforma 1, por lo que en adelante se hará referencia principalmente a esta isoforma.

Las PI3Ks, son heterodímeros que constan de una subunidad reguladora (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  ó p55<sup>PIK</sup>) y de una subunidad catalítica (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  ó p110 $\delta$ ). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los



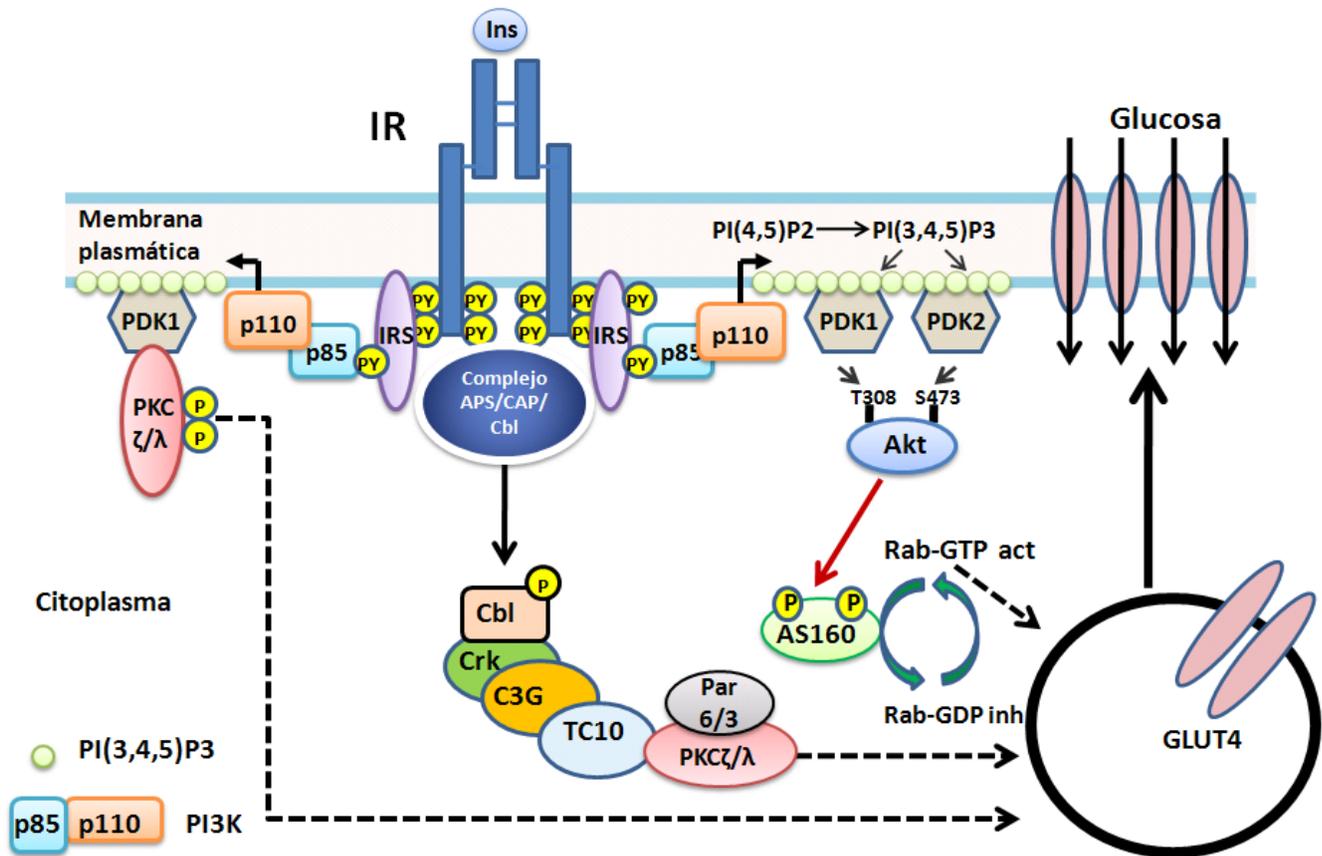
**Figura 3.** Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. El IR activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr (Y) que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P<sub>2</sub>, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser<sup>473</sup> que es seguida por una fosforilación en la Thr<sup>308</sup>, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9.

cuales permiten su unión a las proteínas IRS-1. La interacción entre ambas proteínas provoca cambios alostéricos en la conformación de la subunidad reguladora dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. A consecuencia de ello, p110 se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a sus sustratos PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI4,5-P<sub>2</sub> (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando los productos PIP<sub>2</sub> (PI3,4-bisfosfato) y PIP<sub>3</sub> (PI3,4,5-trisfosfato), respectivamente (Fig. 3). El PIP<sub>3</sub> sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos-1), y Akt o proteína cinasa B (PKB) (7).

En el caso de la cinasa Akt, después de su reclutamiento a la membrana plasmática es fosforilada en dos residuos, la Ser<sup>473</sup> y la Thr<sup>308</sup>. La fosforilación en la Ser<sup>473</sup> ocurre primero por acción del complejo proteico mTor/Rictor, también conocido como PDK2. Esta fosforilación parece promover la interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de Akt y la cinasa PDK1 que la fosforila en la Thr<sup>308</sup>; estas dos fosforilaciones son importantes para que Akt se active completamente (8).

Existen tres isoformas de Akt (Akt1-3), de las cuales, la isoforma 2 parece ser la que juega un papel importante en la incorporación de glucosa inducida por la insulina. La

enzima Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina, incluyendo a la enzima glucógeno sintasa (GS), a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), a la fosfofructocinasa 2 (PFK2), a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD) (Fig. 3) (3). Entre estos destaca la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3 (3, 7), una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucógeno sintasa; la



**Figura 4.** Regulación del transporte de glucosa por la insulina. La insulina promueve la translocación del transportador GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. La proteína AS160 en su estado no fosforilado y activo regula negativamente a las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4. AS160 estimula la hidrólisis del GTP unido a las Rab (generando Rab-GDP, inactivo) e inhibiendo el tráfico vesicular. Cuando AS160 es fosforilada por Akt se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab-GTP (activo) de GLUT4 a la membrana plasmática. Por otra parte, PDK1 induce también la fosforilación de sitios críticos en el asa de activación de dos formas atípicas de la PKC (PKC $\lambda/\xi$ ), que contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina. Recientemente se describió un modelo alternativo independiente de PI3K/PDK1/Akt, mediante el cual la unión de insulina a su receptor activa la proteína G pequeña TC10 vía el complejo APS/CAP/Cbl. TC10 participa en la activación de las PKC- $\lambda/\xi$  que produce la translocación de GLUT4.

inhibición de GSK3 por Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno (6).

La cascada de la PI3K incluye a otras cinasas de Ser que median la respuesta de la insulina, incluyendo a mTOR la cual regula la síntesis proteica a través de las vías de p70S6K/S6 y 4EBP1/eIF4 (6, 7).

### REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA

Quizás uno de los mecanismos de acción de la insulina más estudiado y aun poco comprendido es el relacionado a la regulación del transporte de glucosa

en células adiposas y musculares. La insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K y de la cinasa Akt (8). Evidencias recientes indican que el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática depende de varios mecanismos entre los que se encuentra la participación de la AS160 (la cual contiene un dominio Rab/GAP). AS160 (sustrato de Akt de 160 KDa) es una proteína que en su estado no fosforilado y activo regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas

Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4, inhibiendo la exocitosis basal del transportador. AS160 es sustrato de Akt, y cuando es fosforilada por Akt, AS160 se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab del transportador GLUT4 a la membrana plasmática (Fig. 4) (8).

En años recientes fue descrita en adipocitos una vía de transporte de glucosa independiente de PI3K, e involucra a la proteína Cbl y a las proteínas adaptadoras APS y CAP. La formación de un complejo proteico entre APS/CAP/Cbl, permite la fosforilación de ésta última proteína

por el IR. El complejo CAP/Cbl fosforilado se disocia del IR y a través de CAP interactúa con la flotilina en microdominios de la membrana plasmática conocidos como balsas lipídicas (lipid rafts), en donde Cbl recluta al complejo proteico CrkII-C3G. C3G activa a la proteína TC10, proteína G pequeña, miembro de la familia de Rho, la cual al parecer lleva a la translocación de GLUT4 (Fig. 4) (1, 8).

Por otra parte, la activación de las PKCs atípicas  $\lambda$  y  $\zeta$  inducida por la insulina también las involucra en favorecer el transporte de glucosa inducido por la insulina. Se ha descrito que la activación de PKC- $\lambda/\zeta$  podría darse río abajo de PI3K y de TC10, es decir, podrían ser proteínas en donde convergen ambas vías de señalización involucradas en el transporte de glucosa. Por un lado, se ha sugerido que ambas PKCs pueden asociarse con PDK1 cuando ésta se ancla al PIP<sub>3</sub> generado por la acción de PI3K, induciendo la fosforilación en los residuos de Thr<sup>402</sup>/Thr<sup>410</sup> en el asa de activación de PKC. Por otra parte, cuando TC10 es activado interacciona con el complejo PKC atípica/Par6/Par3, lo que induce el reclutamiento de ambas PKCs en la membrana plasmática donde son activadas (9). Par3/Par6 son dos proteínas de andamiaje recientemente descritas como proteínas que interactúan con PKC- $\lambda/\zeta$ , y que en complejo participan en mediar varias de las funciones celulares de la PKC. Finalmente, podemos decir que independientemente de la vía que lleve a la activación de PKC- $\lambda/\zeta$ , ambas contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina (Fig. 4) (8, 9).

### MECANISMOS DE REGULACION DE LA SEÑAL DE INSULINA

La duración y extensión de las señales inducidas por acción de la insulina son altamente reguladas para promover el

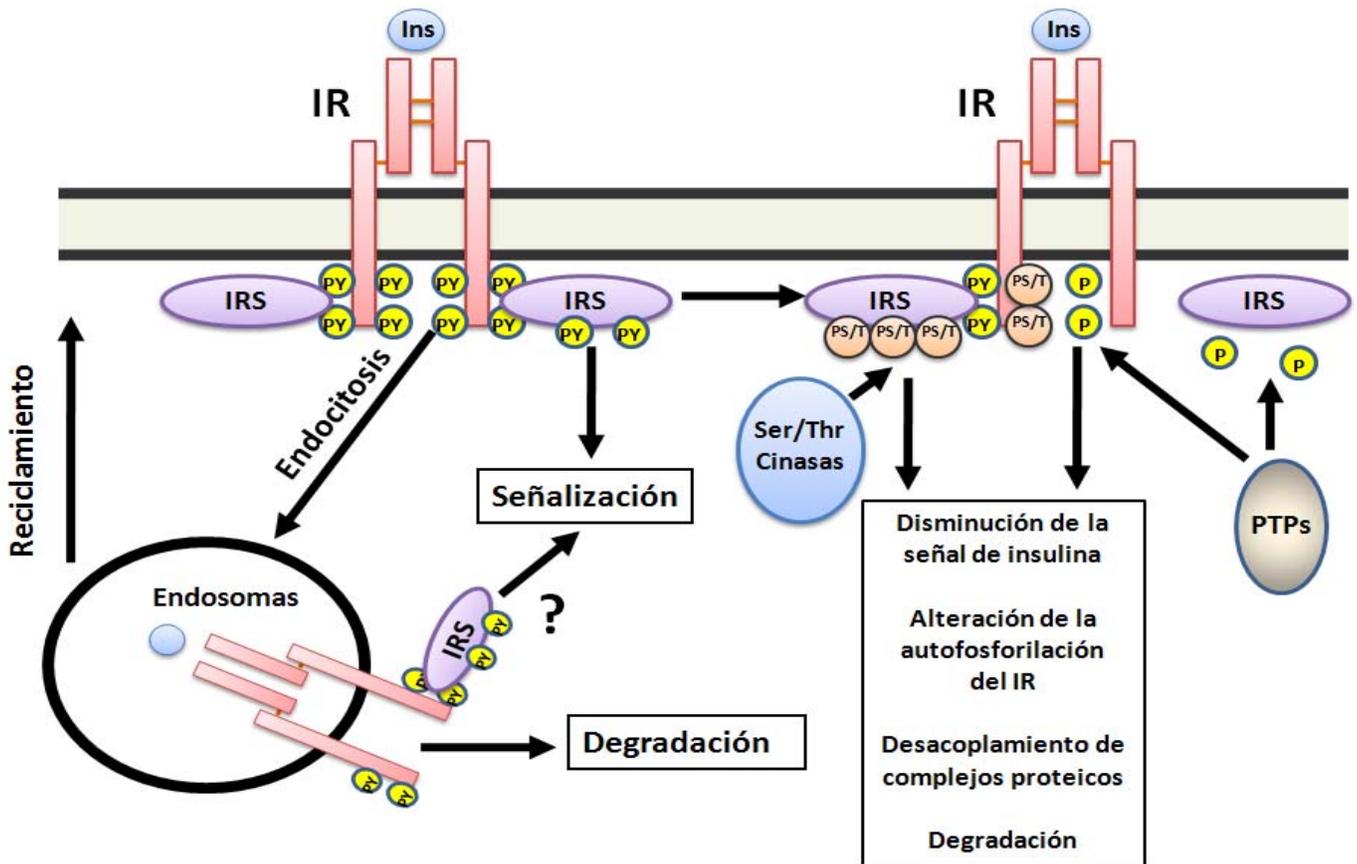
adecuado funcionamiento metabólico, el balance energético y el mantenimiento del peso corporal. El control de las acciones de la insulina se lleva a cabo gracias a mecanismos muy finos de autorregulación (desensibilización homóloga), en donde enzimas de la misma vía que fueron activadas por acción de la insulina inhiben la actividad de proteínas claves de la señalización, como lo son el IR o sus sustratos IRS. Alternativamente, señales de vías no relacionadas a la de la insulina pueden inhibir su señalización a través de mecanismos de desensibilización heteróloga. De esta forma, tanto el IR como su principal sustrato, el IRS, se encuentran sujetos a una combinación de mecanismos de desensibilización homóloga y heteróloga. A continuación se describen los principales puntos de regulación a nivel del IR y de IRS por acción de la insulina (Fig. 5).

#### a) Regulación a nivel del IR

**Endocitosis.** Una vez que la insulina se une con el IR, el complejo insulina-receptor es internalizado hacia los endosomas primarios, principalmente mediante su inclusión en vesículas recubiertas de clatrina, en donde el IR permanece activo y completamente fosforilado. El pH ácido de los endosomas induce la disociación de la insulina del IR; una vez que la insulina se disocia, ésta es degradada por acción de la enzima insulinasa ácida endosomal y el IR es reciclado a la membrana celular. Sin embargo, en condiciones de estimulación prolongada con niveles saturantes de insulina, el IR es transportado a los lisosomas para su degradación. De esta forma la internalización, el reciclamiento y la degradación del IR determinan el número de receptores presentes en la superficie celular disponibles para la unión de la insulina. Aunque la internalización del IR juega un papel crucial en la

atenuación de los efectos de la insulina, también se ha sugerido que es importante en la activación de Shc y la vía de las MAP cinasas (Fig. 5). Este fino mecanismo de regulación del número y de la activación del IR en la membrana plasmática es crucial para determinar la sensibilidad celular a la insulina, no únicamente en condiciones fisiológicas sino también en condiciones patológicas incluyendo a la resistencia a la insulina (10).

**Acción de Proteínas fosfatasa de Tyr.** Se ha postulado que el grado de activación del IR está determinado por acciones opuestas a su fosforilación en residuos de Tyr. Un mecanismo de regulación de la señal de insulina que actualmente es sujeto de un gran número de estudios, involucra la desfosforilación de residuos claves de Tyr en el asa de activación del receptor por la activación de proteínas fosfatasas de Tyr (PTPs) (Fig. 5). Las PTPs se clasifican en dos categorías: PTPs citosólicas y PTPs de membrana y ambos grupos han sido identificados como reguladores de la actividad del IR. Con respecto a las PTPs localizadas en la membrana PTP- $\alpha$ , PTP- $\epsilon$  y LAR al parecer juegan un papel importante en la regulación de la fosforilación del IR. En particular se ha observado que LAR (fosfatasa relacionada al antígeno común de leucocito) interactúa con el IR y lo desfosforila. Sin embargo, las evidencias experimentales más importantes de la participación de las PTPs en la regulación de las acciones de la insulina provienen de estudios realizados con PTPs citosólicas, principalmente con la PTP-1B y SHP-2. PTP-1B no únicamente disminuye la señal de la insulina cuando ésta es sobre expresada, sino también se asocia al IR en células intactas, lo que sugiere que puede funcionar como un regulador de las acciones de la insulina *in vivo*. De manera interesante, la eliminación del gen de PTP-1B en



**Figura 5.** Mecanismos de regulación de la señal de insulina. Las acciones de la insulina son moduladas a través de diferentes mecanismos entre los que destacan: a) la endocitosis y reciclamiento de los receptores, que controlan su degradación y número en la membrana celular; b) la acción de proteínas con actividad de fosfatasa de tirosina (PTPs), que desfosforilan residuos de proteínas clave de la señalización de la insulina como el IRS y su propio receptor, y c) la fosforilación en residuos de Ser/Thr del IR y del IRS. Estos mecanismos regulan la señal de la insulina a nivel del receptor o de proteínas río abajo de éste, alterando su actividad, desacoplando la formación de complejos proteicos y regulando su número y localización celular.

ratones (ratones "knockout") muestra un aumento en la sensibilidad a la insulina relacionado a un incremento en el estado de fosforilación en residuos de Tyr del receptor. Adicionalmente, se ha observado que la desfosforilación del IR por esta fosfatasa induce una disminución en la incorporación de glucosa en tejido muscular y adiposo y alteraciones a nivel metabólico. De esta forma, la inhibición de la PTP-1B resulta ser un atractivo blanco para el diseño de drogas que incrementen la sensibilidad a la insulina (11).

Otra PTP citoplásmica de interés es SHP-2, la cual contiene dos dominios SH2 que le permiten asociarse a diferentes proteínas

durante la señalización de la insulina. Sin embargo, el papel de SHP-2 en la regulación de las acciones de la insulina parece ser diferente en comparación con PTP-1B, ya que diferentes estudios han dado evidencia de que SHP-2 puede tener efectos reguladores positivos y negativos en las acciones de la insulina. En el caso de los efectos negativos, se ha encontrado que SHP-2 se une al IR y a la proteína IRS-1 y que esta unión lleva a la inactivación por desfosforilación de ambas proteínas. Sin embargo, también existen evidencias que involucran a SHP-2 como un regulador positivo en la vía de Ras/MAPK. Estos resultados dan evidencia de la necesidad de más

estudios sobre el papel de las PTPs como reguladores de las acciones de la insulina (11).

*Fosforilación en residuos de Ser/Thr.* La fosforilación en residuos de Ser/Thr ocurre en respuesta a la insulina como un mecanismo que modula su señalización intracelular (Fig. 5). Existe evidencia de que un aumento en la fosforilación del IR en residuos de Ser/Thr altera su autofosforilación en respuesta a la insulina. Diversos estudios han demostrado la participación de la PKC como cinasa clave en la regulación de la actividad del IR, ya que media su fosforilación en las regiones yuxtamembranal (residuos Ser<sup>967</sup> y Ser<sup>968</sup>), catalítica (residuos Ser<sup>1006</sup>,

Ser<sup>1035</sup> y Ser<sup>1037</sup>) y carboxilo terminal (residuos Ser<sup>1288</sup>, Ser<sup>1305</sup>, Ser<sup>1306</sup>, Ser<sup>1321</sup>, Ser<sup>1327</sup> y Thr<sup>1348</sup>) (4). Aunque no es claro el papel de la fosforilación de cada uno de estos residuos en el estado de autofosforilación del IR o en su actividad de cinasa, varios de estos sitios se encuentran en cercana proximidad a los sitios de autofosforilación del IR o se encuentran dentro del sitio catalítico y podrían, por tanto, alterar la conformación del IR o el acceso a residuos de Tyr clave en su activación (5, 12).

### b) Regulación a nivel del IRS

*Fosforilación en residuos de Ser/Thr.* Después del estímulo con insulina, el IRS-1 se fosforila de manera notable, no únicamente en residuos de Tyr sino también en residuos de Ser/Thr (Fig. 5). De un total de 232 residuos de Ser/Thr presentes en IRS-1, a la fecha se han identificado alrededor de 70 residuos como sitios potenciales de fosforilación para diferentes cinasas (conocidas como cinasas de IRS). Actualmente se sabe que, en la mayoría de los casos, la fosforilación de estos residuos está implicada en mecanismos de atenuación de la señal de insulina que desacopla la unión del IRS de proteínas efectoras de la vía de insulina como lo es la PI3K (13, 14).

La fosforilación en residuos de Ser/Thr de IRS puede llevarlo a: a) desacoplarse del IR lo que altera su capacidad de experimentar fosforilación en residuos de Tyr; b) su disociación de complejos intracelulares que lo mantienen en cercanía con el IR; c) su degradación o bien, d) convertirlas en proteínas inhibitoras de la actividad de cinasa del IR (13, 14).

Estudios recientes han identificado varios residuos de Ser/Thr como blancos potenciales de fosforilación de cinasas de IRS que afectan su activación. Entre ellos se encuentran la Ser<sup>307</sup>, fosforilada por la cinasa del

N-terminal de c-Jun (JNK) y por mTOR; la Ser<sup>794</sup>, fosforilada por la cinasa inducible por sal-2 (SIK-2); la Ser<sup>616</sup>, fosforilada por ERK y mTOR; la Ser<sup>636</sup>, fosforilada por ERK y mTOR/S6K1; la Ser<sup>323</sup> fosforilada por PKC $\zeta$ , y la Ser<sup>1101</sup>, fosforilada por PKC $\theta$ . En todos los casos, la insulina lleva a la activación de las cinasas mencionadas, resultando en la disminución de la señalización (7, 12-14).

*Modulación por interacción con proteínas SOCS.* Recientemente se ha demostrado que la familia de proteínas supresoras de proteínas de señalización de citocinas (SOCS) juega un papel importante en regular negativamente la activación del IRS, ya sea por interacciones directas o indirectas. Se ha demostrado que su expresión es inducida por el tratamiento con la insulina en varios tejidos y líneas celulares. Cuando se induce la síntesis de las proteínas SOCS estas son capaces de asociarse con las proteínas IRS, alterando su estructura y su unión tanto al IR como a proteínas efectoras como lo es la PI3K. Además, se ha observado que la asociación de SOCS con IRS promueve su degradación y disminución en el número de células (5).

### c) Mecanismos de regulación río abajo de IRS.

Las fosfatasa de lípidos que desfosforilan los productos de la activación de PI3K están involucradas en la regulación de la vía de insulina río abajo de IRS. Entre estas se encuentran SHIP-2 (inositol fosfatasa con dominio SH2), y PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina removido en el cromosoma 10), proteínas fosfatasa que inducen la desfosforilación del PIP<sub>3</sub> en las posiciones 5' y 3', respectivamente, generando fosfatidilinositol 3,4 bisfosfato, y fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato. Al parecer, estas desfosforilaciones en los lípidos de la membrana tienen

efectos biológicos diferentes. Por ejemplo, PTEN parece funcionar como supresor de tumores ya que se ha observado que mutaciones en esta enzima llevan a síndromes neoplásicos sin tener efectos metabólicos. Sin embargo, en el ratón "knockout" de SHIP-2 hay un incremento en la sensibilidad a la insulina debido a un aumento en la producción de PIP<sub>3</sub> y por la tanto a un aumento en la actividad de proteínas río abajo de PI3K involucradas en procesos relacionados con el transporte de glucosa (14).

### RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el que las células que ordinariamente responden a la insulina dejan de hacerlo. Los individuos con resistencia a la insulina están predispuestos al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), además de asociarseles frecuentemente con un número importante de desordenes de salud entre los que se encuentran la obesidad, la hipertensión, infección crónica y enfermedades de tipo cardiovascular. Por lo anterior, entender los mecanismos que favorecen el desarrollo de la resistencia a la insulina con el fin de generar tratamientos que ataquen esta condición, ha sido y seguirá siendo tarea de muchos grupos de investigación.

De manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (14-16). A nivel molecular, los mecanismos por los que se genera la resistencia a la insulina pueden ser múltiples y variar de un individuo a otro. Sin embargo, la resistencia a la insulina es la

consecuencia de una deficiente señalización de la insulina causada por mutaciones o modificaciones post-traduccionales del IR o de moléculas efectoras río abajo del mismo. En algunos casos la resistencia a la insulina se debe a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, pero más a menudo se atribuye a alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde la funcionalidad de su receptor hasta la actividad de proteínas localizadas río abajo del mismo y que desempeñan funciones importantes en la señalización de la insulina (1, 12, 14). Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución en el número de receptores y de su actividad de cinasa; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas clave como el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4 (15). De estas alteraciones el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel del IR y de IRS, ha sido considerado como uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Un aumento en el estado de fosforilación de ambas proteínas puede alterar su asociación a otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación en Tyr, disminuir su activación e inducir su degradación (14-16).

La importancia de un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de las proteínas IRS también ha sido documentado en estudios clínicos, en donde se ha demostrado que en hígado, músculo y tejido adiposo de pacientes obesos (tejidos que desempeñan un papel

importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina), la expresión de las proteínas IRS-1 disminuye alrededor del 54%, y este aumento en la degradación de IRS puede estar dado por un aumento en la fosforilación de IRS en residuos de Ser/Thr.

Varios agentes y condiciones metabólicas han sido implicados como inductores de la resistencia a la insulina. Los más comunes son los ácidos grasos libres y sus metabolitos; el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otras citocinas; hormonas catabólicas como la epinefrina, el glucagon y la angiotensina II y hormonas secretadas por el tejido adiposo como la resistina. De esta forma parece que la resistencia a la insulina es consecuencia de la acción de una multitud de diferentes inductores. Por ejemplo, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres se encuentra asociado con muchos estados de resistencia a la insulina, incluyendo obesidad y DM2. En humanos, el contenido y composición de triglicéridos y fosfolípidos en músculo correlaciona directamente con la presencia de resistencia a la insulina. Inicialmente, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres, induce resistencia a la insulina por la inhibición del transporte de glucosa estimulado por la insulina, que es seguido por una reducción en la síntesis de glucógeno en músculo y la oxidación de la glucosa. Estudios a nivel molecular han determinado que el incremento en la concentración de ácidos grasos libres puede llevar a cambios en la expresión del IR y alterar, tanto la unión de la insulina con el receptor

como el estado de fosforilación de su dominio de cinasa. Así mismo, pueden inhibir la activación de la enzima PI3K dependiente de IRS-1. La inhibición de la PI3K por los ácidos grasos libres ha sido asociada a un aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr del IRS-1. Recientemente se ha descrito que los ácidos grasos libres también pueden alterar la activación de Akt debido a un aumento en la cantidad de ceramida y diacilglicerol en células musculares en cultivo (16).

## CONCLUSIONES

En la presente revisión se han abordado los principales mecanismos de activación y de regulación de la señalización de la insulina, y se ha presentado un panorama general de uno de los principales factores involucrados en el desarrollo de enfermedades como la DM2, la obesidad y la hipertensión: la resistencia a la insulina. Esta, nos es más que la incapacidad de la insulina de ser reconocida y/o de generar una respuesta intracelular adecuada por fallas en su transducción de señales. Comprender los mecanismos moleculares involucrados en las acciones de la insulina y en el desarrollo de la resistencia a la insulina es importante para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas en el tratamiento de estos desordenes.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por el apoyo recibido (JAOR, proyecto de investigación No. 48777; AAP, becaria CONACYT No. 169944). También agradecen a la DG Norma Cirnes por su ayuda en el diseño de las figuras.

## REFERENCIAS

1. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
2. Avruch J (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182:31-48.
3. Myers MG Jr, White MF (2002) The Molecular Basis of Insulin Action. En: *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, New York, pp 55-87.
4. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID (1985) The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40:747-758.
5. Youngren J (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:873-891.
6. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931-943.
7. Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7:606-619.
8. McCarthy AM, Elmendorf JS (2007) GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res* 125:373-388.
9. Liu XJ, He AB, Chang YS, Fang FD (2006) Atypical protein kinase C in glucose metabolism. *Cellular Signalling* 18:2071-2076.
10. Carpentier J-L, Hamer I, Foti M (2002) Insulin receptor trafficking. En: *Insulin Signaling: from cultured cells to animal models*. Editor: Grunberger G, Zick Y. Taylor and Francis, New York, pp 243-258.
11. Cheng A, Dube N, Gu F, Tremblay ML (2002) Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur J Biochem* 269:1050-1059.
12. Paz K, Zick Y (2002) Ser/Thr phosphorylation of insulin receptor signaling molecules and insulin resistance. En: *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor & Francis, New York, pp 259-280.
13. Gual P, Marchand-Brustel YL, Tanti JF (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109.
14. Le Roith D, Quon MJ, Zick Y (2003) Molecular and cellular aspects of insulin resistance: Implications for diabetes. En: *Signal Transduction and Human Disease*. Editor: Finkel T, Gutkind JS. Hoboken, New Jersey Wiley-Interscience, pp 171-200.
15. Sesti G (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:665-679.
16. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS (2007) Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32:405-413.

# MECANISMOS MOLECULARES DE DIVERSIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS\*

Martha Rendón-Anaya y Alejandro Alagón

## RESUMEN

El sistema inmune es capaz de reconocer una enorme cantidad de antígenos de manera específica por medio de receptores codificados por un número muy limitado de exones funcionales de línea germinal. Es por ello que los linfocitos B cuentan con cuatro mecanismos de diversificación somática de anticuerpos, que producen modificaciones a nivel de secuencia en los genes de inmunoglobulinas para optimizar la especificidad de los receptores de antígenos. Dichos mecanismos involucran una serie de elementos génicos y de complejos enzimáticos, que en su mayoría, participan en vías de reparación de lesiones de ADN. Por este motivo, estudiar las bases moleculares de la diversificación de anticuerpos, además de tener un fuerte impacto desde un punto de vista inmunológico, aporta al entendimiento de procesos que garantizan la integridad génica.

**PALABRAS CLAVE:** Inmunoglobulina, diversificación, recombinación, hipermutación somática, conversión génica.

## ABSTRACT

The immune system is capable of specifically recognizing an immense variety of antigens, due to the presence of receptors which are encoded by a very limited number of functional germline exons. Therefore, the B lymphocytes use four mechanisms of somatic antibody diversification that modify the sequence of the immunoglobulin genes, in order to optimize the specificity of the antigen receptors. These mechanisms involve different genomic and enzymatic factors, which broadly belong to DNA repair pathways. Thus, studying the molecular basis of the antibody diversification has been a very important source of immunological knowledge, and has improved our understanding regarding the pathways which maintain genomic integrity.

**KEY WORDS:** Immunoglobulin, diversification, recombination, somatic hypermutation, gene conversion.

## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es capaz de reconocer una enorme cantidad de antígenos de manera específica por

medio de receptores codificados por un número muy limitado de exones funcionales de línea germinal. Por este motivo, los linfocitos cuentan con

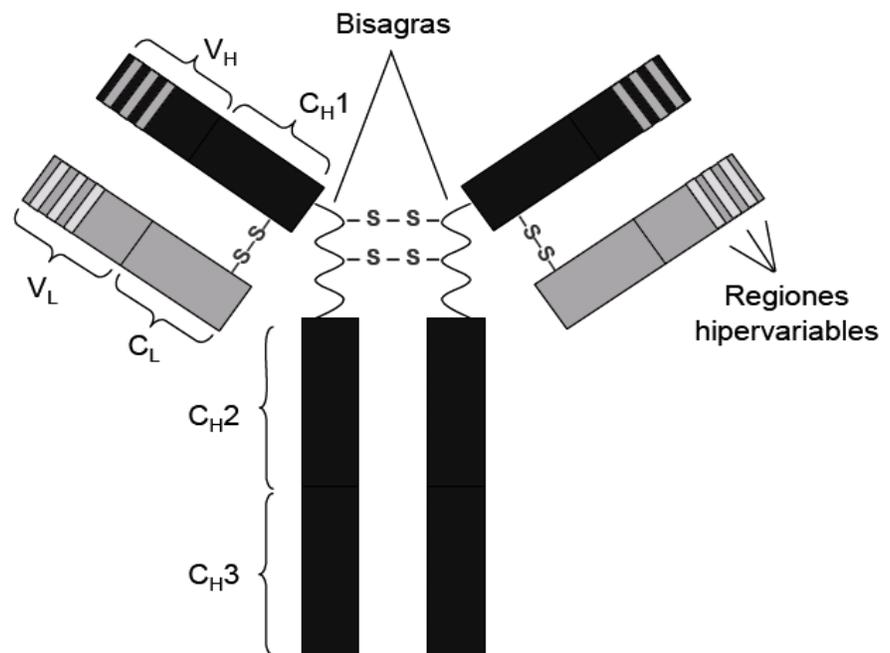
mecanismos de diversificación de anticuerpos que producen modificaciones a nivel de secuencia en los genes de inmunoglobulinas en res-

**Abreviaturas:** ADNcs, ADN de cadena sencilla; AID, activation induced deaminase (deaminasa inducida por activación); APE1/2, apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/2 (endonucleasa apurínica/apirimidínica 1/2); APOBEC, apolipoprotein B mRNA editing enzyme (apolipoproteína B, enzima editora de ARNm); APOBEC1, apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1 (apolipoproteína B, enzima editora de ARNm, polipéptido catalítico 1); ATM, ataxia-telangiectasia mutated (ataxia-telangiectasia mutada); BER, base excision repair (reparación por escisión de bases); CDRs, complementarity determining regions (regiones determinantes de complementariedad); CG, conversión génica; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase (proteína cinasa dependiente de ADN); DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de ADN); HMG1/2, high mobility group protein 1/2 (proteínas del grupo de alta movilidad 1/2); HMS, hipermutación somática; HP1, heterochromatin protein 1 (proteína de heterocromatina 1); Igs, inmunoglobulinas; MLH1, MutL protein homologue 1 (proteína homóloga de MutL 1); MMR, mismatch repair (reparación de apareamientos incorrectos); MRN, complejo Mre11/Rad50/Nbs1; MSH2/6, MutS protein homologue 2/6 (proteínas homólogas de MutS 2/6); NHEJ, non-homologous end joining (unión de extremos no homólogos); PKA, protein kinase A (proteína cinasa A); RAG1/2, recombination activating genes 1/2 (genes activadores de recombinación 1/2); RCC, recombinación para cambio de clase; RH, recombinación homóloga; RPA, replication protein A (proteína de replicación A); RSS, recombination signal sequences (secuencias señalizadoras de recombinación); TDT, terminal deoxynucleotidyl transferase (deoxinucleotidil transferasa terminal); UNG, uracil nucleoside glycosylase (glicosilasa de uracilo-ADN); XRCC4, X-ray cross-complementation protein 4 (proteína de reparación de lesiones de ADN).

\*Recibido: 28 de enero de 2008 Aceptado: 10 junio de 2008 (artículo publicado extemporáneamente)  
Instituto de Biotecnología, UNAM. Avenida Universidad 2001, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México. Autor responsable Martha Rendón-Anaya Correo E: mrendon@ibt.unam.mx

puesta a la presencia de antígenos en el organismo. Las inmunoglobulinas (Igs) están formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, codificadas en *loci* diferentes. Las cadenas pesadas cuentan con una región constante, la cual determina la forma en la que el antígeno es removido del organismo, y una región variable que junto con la región variable de las cadenas ligeras, forma un dominio de reconocimiento de antígenos. Durante el desarrollo temprano de las células B, las regiones variables de los receptores se ensamblan por un proceso de recombinación entre segmentos de línea germinal, el cual corresponde a la diversificación primaria de las Igs. Después de la maduración de las células B, las regiones variables son blanco de una serie de mecanismos de diversificación secundaria, que optimizan la especificidad de los receptores. Estos mecanismos son la hipermutación somática (HMS), la cual introduce cambios puntuales en los segmentos variables rearrreglados; la conversión génica (CG), que produce cambios por medio del intercambio no recíproco de secuencias variables; y la recombinación de cambio de clase (RCC) que reemplaza las regiones constantes, promoviendo cambios de isotipos de Igs. A pesar de ser procesos diferentes, la HMS, la CG y la RCC requieren un primer intermediario común, que resulta de una vía compartida por los tres mecanismos. Esta vía inicia con una lesión en los segmentos V(D)J provocada por la desaminasa AID, daño que al ser reconocido por diferentes proteínas en determinados puntos del ciclo celular, dará paso a alguno de los mecanismos de diversificación secundaria.

A continuación describiremos los mecanismos de diversificación primaria y secundaria, así como las principales características de AID y sus implicaciones en la HMS, CG y RCC.



**Figura 1.** Estructura básica de las inmunoglobulinas: las cadenas pesadas (en negro) y las ligeras (en gris) están divididas en dominios ( $C_{H1}$ , 2 y 3,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $V_L$  respectivamente) y se mantienen unidas por puentes disulfuro

### CÉLULAS B Y ANTICUERPOS

Los anticuerpos, que en conjunto se conocen como inmunoglobulinas (Igs), son producidos exclusivamente por las células B, y constituyen aproximadamente el 20% del contenido proteico en plasma. Cada célula B produce una sola especie de Ig con un sitio de reconocimiento de antígeno único. Las Igs producidas por células B naïve, se insertan en la membrana plasmática, donde funcionan como receptores de antígeno. Al ser activadas por algún antígeno que puedan reconocer, y con ayuda de las células T, las células B (tanto naïve como las de memoria) proliferan y se diferencian en células efectoras productoras de anticuerpos. Estos son solubles, y mantienen el mismo dominio receptor de antígenos usado por los receptores de membrana iniciales (1).

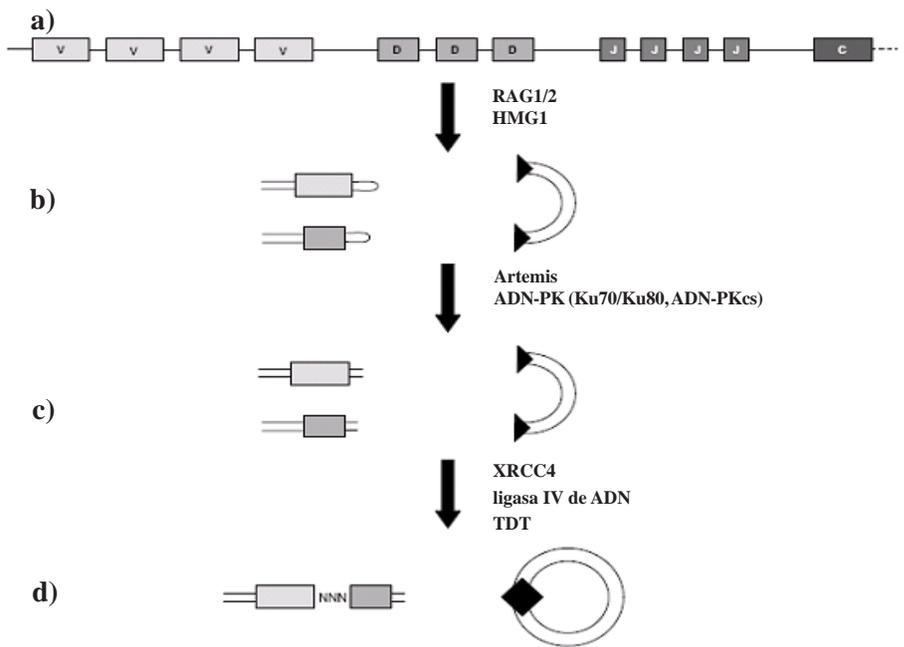
La estructura de Ig más sencilla consiste en una molécula en forma de Y con dos sitios idénticos de unión de antígenos en los extremos de cada brazo, por lo que se conocen como

anticuerpos bivalentes. La estructura básica consiste en cuatro cadenas polipeptídicas unidas por enlaces covalentes (puentes disulfuro) y por interacciones no covalentes. Dos de ellas son cadenas ligeras (L) y las dos restantes son cadenas pesadas (H) de mayor longitud, que contienen una pequeña región flexible que funciona como bisagra para variar la distancia entre los brazos de las Igs en presencia de antígenos (Fig. 1). Ambas cadenas tienen una región variable (V) en el extremo N-terminal y una constante (C) en el C-terminal, ésta última más larga que la región V en el caso de las cadenas H, y de igual longitud a la V en las cadenas L. Las cadenas L y H están formadas por segmentos repetidos de ~110 amino ácidos, que se pliegan con ayuda de un puente disulfuro, para formar los dominios  $C_H$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $V_L$  (Fig. 1). Estos dominios tienen una estructura tridimensional muy similar, que consiste en un sándwich de láminas  $\beta$  unidas por el puente disulfuro. Sin embargo, los

dominios  $V_H$  y  $V_L$  difieren de los  $C_H$  y  $C_L$  pues presentan bucles hipervariables entre las láminas  $\beta$  que se conocen como regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las CDRs en conjunto dan origen al sitio de reconocimiento de antígenos, mientras que el esqueleto del dominio está conformado principalmente por las láminas  $\beta$ , por lo que se denominan regiones marco (1).

Las células de mamíferos pueden producir cinco clases (isotipos) de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uno con una cadena pesada diferente  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ , respectivamente. Adicionalmente, existen subclases de IgA e IgG, codificadas por cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  diferentes. Cada isotipo determina la forma en la que el antígeno es removido del organismo. El IgM es el primer isotipo producido por las células B nuevas; el IgG es el isotipo más abundante en suero y tiene la capacidad de unirse a receptores en células fagocíticas; el IgA se encuentra principalmente en secreciones como lágrimas y saliva; el IgE se une a basófilos y células cebadas para liberar histamina e iniciar una reacción alérgica. Por otro lado, los dos tipos de cadenas ligeras más comunes son  $\lambda$  y  $\kappa$ , sin embargo, la proporción de Igs con cadenas L de tipo  $\lambda$  y de tipo  $\kappa$ , varía entre organismos (1).

Los genes de Igs se distinguen por estar divididos en segmentos génicos, incluso los *loci* de las cadenas H y L pueden estar distribuidos en diferentes cromosomas. Las regiones C son codificadas por un solo segmento de ADN, mientras que las regiones V se ensamblan a partir de por lo menos dos segmentos génicos (Fig. 2a): cada región V de las cadenas L requiere la unión de un segmento variable (V) largo, y otro más pequeño de unión (J), mientras que las regiones V de las cadenas H se forman a través de la unión de un segmento V, un segmento J y un tercer segmento de diversidad



**Figura 2.** Recombinación V(D)J. a) Organización de los segmentos génicos de línea germinal. b) Formación de extremos con estructura de horquilla sellada en los segmentos codificantes. El ADN que separa los segmentos involucrados en la recombinación se escinde del cromosoma, manteniendo las secuencias de señalización fosforiladas en los extremos (triángulos negros). c) Apertura de los extremos en horquilla de los segmentos codificantes. d) Unión de los segmentos codificantes y de los extremos de señalización.

(D). El número de segmentos V, D y J funcionales y de pseudogenes de línea germinal varía considerablemente de un organismo a otro. Por ejemplo, el pollo (*Gallus gallus*) tiene entre 80 y 100 pseudogenes ( $\psi$ ) en el extremo 5' de la región variable de la cadena H mientras que el *locus*  $\lambda$  está conformado por un solo segmento J $\lambda$ , un V $\lambda$  funcional y 25 $\psi$ V. Por otra parte, algunos mamíferos como el humano, cuentan con más de 100 segmentos V de cadena pesada, por lo menos 20 segmentos D y 6 J. Como veremos más adelante, estas diferencias pueden sesgar la diversificación de Igs hacia alguna vía en particular.

### RECOMBINACIÓN V(D)J

Como vimos en la sección anterior, los genes que codifican los receptores de antígenos de las células B y T están separados en diferentes segmentos génicos. En particular, las regiones variables de los receptores de

antígenos se ensamblan durante el desarrollo temprano de los linfocitos por medio de la unión de un segmento variable (V), un segmento de unión (J) y un segmento de diversidad (D) de línea germinal. Este proceso se lleva a cabo gracias a la recombinación denominada V(D)J, y corresponde al primer paso para la diversificación de anticuerpos por dos razones fundamentales. En primer lugar, en función del número de segmentos génicos V, D y J, se puede generar una gran cantidad de combinaciones V(D)J que dan diferentes grados de especificidad a los receptores. En segundo lugar, existen imprecisiones durante la unión de los segmentos génicos, inherentes al proceso de recombinación.

La recombinación V(D)J es un proceso sitio específico iniciado por las proteínas RAG1 y RAG2 específicas de los linfocitos, las cuales reconocen y cortan en doble cadena las secuencias señalizadoras de recombinación

(RSSs) (Fig. 2). Las RSSs flanquean los segmentos génicos involucrados en la recombinación, y están compuestas por un heptámero palindrómico conservado y un nonámero rico en AT, separados por secuencias espaciadoras de 12 ó 23 pb. Se ha observado que esta primera etapa se lleva a cabo en dos pasos: primero, RAG1 ayudada por una proteína de unión y plegamiento de ADN llamada HMG1/2, reconoce las secuencias espaciadoras y se ancla al nonámero; posteriormente, en presencia de RAG2, la interacción ADN-proteína se estabiliza principalmente sobre el heptámero, cerca del punto de corte. Una vez ancladas en las RSSs, RAG1 y RAG2, cortan entre el heptámero y la secuencia codificante, dejando por un lado los extremos codificantes con una estructura de horquilla sellada en el cromosoma y, por otro lado, los extremos de señalización fosforilados (Fig. 2b), los cuales se escinden del cromosoma. Los cuatro extremos se mantienen asociados con las proteínas RAG en un complejo sináptico post-corte. Posteriormente, el daño provocado al ADN es reparado por la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ). De esta forma, el corte en doble cadena es reconocido por el complejo DNA-PK (proteína cinasa dependiente de ADN), el cual está formado por el heterodímero Ku70/ Ku80 (que se une a los extremos del ADN), y la subunidad catalítica (DNA-PKcs) que pertenece a la familia de cinasas de tipo PI3K y requiere de la asociación del complejo Ku70/ Ku80 al ADN para ser activada. DNA-PKcs se une y fosforila a la proteína Artemis, estimulando así su actividad de endonucleasa para abrir la estructura de horquilla en los extremos codificantes (Fig. 2c). Finalmente, el complejo formado por la proteína XRCC4 (proteína de reparación de lesiones de ADN) y la ligasa IV de ADN, cataliza la unión de los segmen-

tos codificantes y de los extremos de señalización (Fig. 2d). En la última etapa de la recombinación V(D)J, la proteína TDT (deoxinucleotidil transferasa terminal) aumenta la diversidad en la zona de unión de los segmentos, pues agrega nucleótidos en ausencia de secuencias molde a los extremos codificantes (2).

Existen diferentes mecanismos que regulan la recombinación V(D)J. En primer lugar, la recombinación ocurre únicamente entre dos genes flanqueados por RSSs que contienen espaciadores de 12 y 23 pb, respectivamente, lo cual se conoce como la regla 12/23. Esta regla garantiza el ensamblado adecuado de las regiones variables, y es regulada por las proteínas RAG y en buena medida por acción del complejo Ku70/Ku80 y DNA-PKcs, los cuales inhiben asociaciones de tipo 12/12 ó 23/23. Un segundo mecanismo de regulación de la recombinación V(D)J es la transcripción. Se ha observado una correlación entre ambos procesos, por lo que elementos que actúan en *cis*, como promotores, intensificadores (denominados *enhancers*), silenciadores, entre otros, parecen ser importantes para la recombinación V(D)J. Por ejemplo, los *enhancers* facilitan la transcripción al inducir un estado abierto de la cromatina asociado con acetilación de histonas, desmetilación de islas CpG, reclutamiento de coactivadores transcripcionales y reposicionamiento de nucleosomas en el promotor. Todos estos eventos, además de inducir la transcripción, determinan la accesibilidad de los segmentos recombinantes para las proteínas RAG. Finalmente, hay factores epigenéticos involucrados en la especificidad de la recombinación, los cuales también regulan el acceso de las proteínas RAG a los *loci* V, D y J. Se ha visto que modificaciones de la cromatina como la acetilación y la metilación están correlacionadas con la recombinación V(D)J. Un estudio

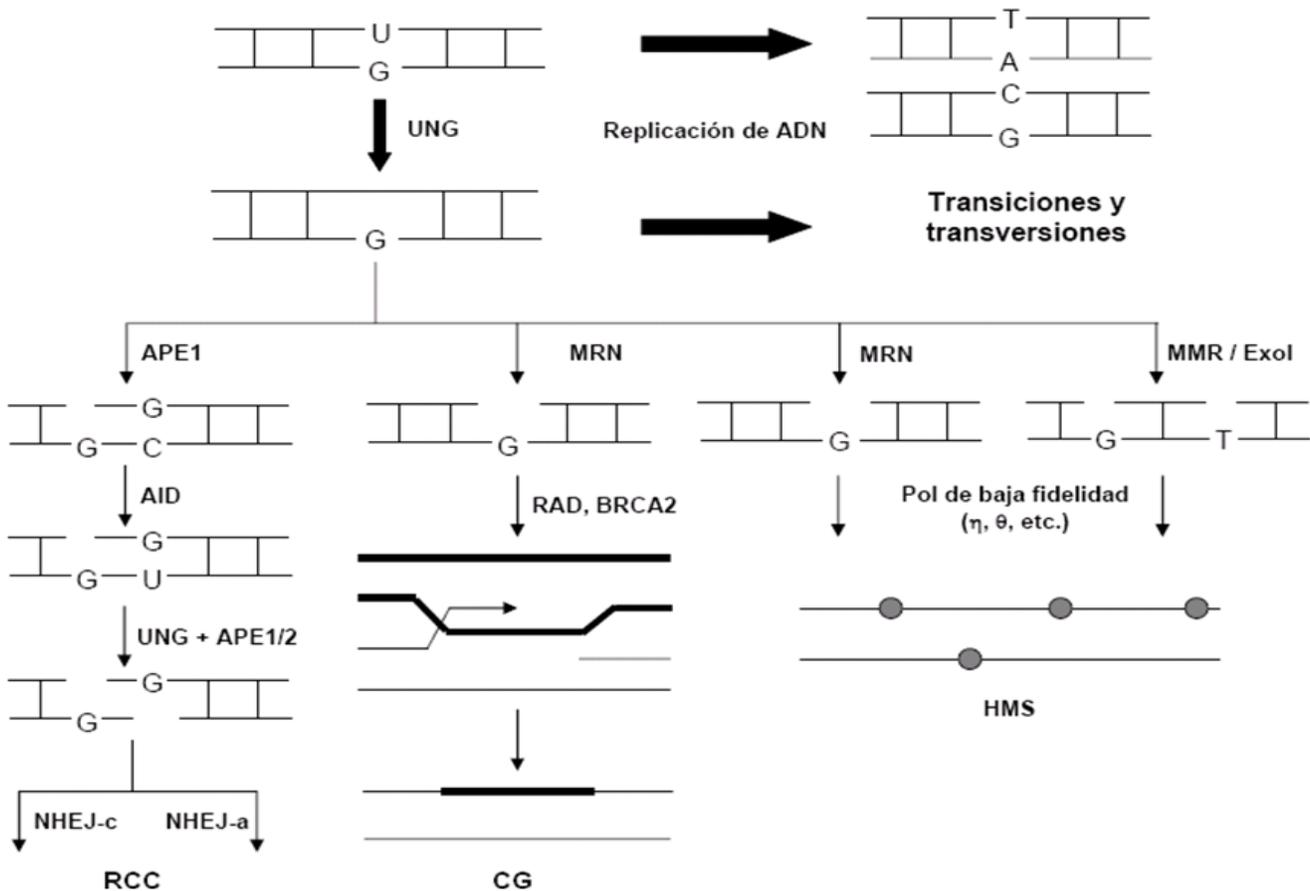
reciente sugiere que el dominio PHD (homeodominio de plantas) de RAG2 se une de manera específica a la histona H3 cuando ésta se encuentra metilada en la arginina 2, y di/trimetilada en la lisina 4 (3), lo cual indica que algunas modificaciones de la cromatina facilitan el anclaje de las proteínas RAG a las RSS y, por tanto, favorecen la recombinación V(D)J.

Recientemente, se ha estudiado un mecanismo de NHEJ alternativo, que parece competir en algunos casos con el NHEJ clásico durante la recombinación V(D)J. Este mecanismo alternativo une secuencias que presentan micro-homología y además produce deleciones largas. Ambas características permiten diseñar sustratos de recombinación que miden la habilidad de células deficientes en uno o varios factores del NHEJ clásico para reparar cortes en doble cadena por el mecanismo alternativo de NHEJ. De esta forma, se observó que células deficientes en RAG1, RAG2, XCCR4 ó DNA-PKcs rescatan de manera limitada la recombinación V(D)J por medio del NHEJ alternativo (4). El NHEJ alternativo es sin duda un mecanismo que deberá ser estudiado a detalle, para entender las implicaciones fisiológicas reales durante la diversificación primaria de Ig.

## PAPEL DE AID EN EL PROCESO DE DIVERSIFICACIÓN DE Igs

Cuando la desaminasa inducida por activación (AID) fue identificada, se clasificó con base en un estudio de homología como miembro de la familia de desaminasas de citosinas de ARN, APOBEC (apolipoprotein B, enzima editora de ARNm). AID se expresa únicamente en células B durante la diversificación de Igs; tiene una longitud de 198 residuos, y tiene cuatro dominios: un dominio de localización nuclear en el extremo N-terminal, un dominio de dimerización que comprende del residuo 47 al 54, un dominio





**Figura 4.** Diversificación secundaria de inmunoglobulinas. La replicación de ADN genera transiciones si ocurre antes de la escisión del uracilo introducido por AID, y transiciones y transversiones si ocurre posterior a la acción de la UNG. De manera alternativa, se pueden generar huecos en los sitios abásicos por la vía MMR o por acción del complejo MRN/Exo1, los cuales son blancos para la CG si se involucran proteínas de RH, o para la HMS si se involucran polimerasas de baja fidelidad. Si por otra parte APE1/2 cortan el sitio abásico, el corte en cadena sencilla puede ser blanco para la RCC.

reparación de ADN de la célula, desencadena alguno de los tres mecanismos de diversificación de Igs (HMS, RCC ó CG; Fig. 3). En primer lugar, cuando la replicación del ADN ocurre antes de que el uracilo pueda ser escindido, se fijará una transición de tipo C/G  $\rightarrow$  T/A, iniciando así el proceso de HMS. En segundo lugar, si la UNG crea un sitio abásico antes de la replicación del ADN, es posible que ocurran tanto transiciones (cambio de bases tipo purina  $\rightarrow$  purina o pirimidina  $\rightarrow$  pirimidina) como transversiones (cambio de bases de tipo purina  $\rightarrow$  pirimidina y *viceversa*), lo cual podría verse sesgado hacia algún tipo de cambio si se usan polimerasas de baja fidelidad con preferencias para introducir

determinados residuos. Esta vía corresponde de igual forma al proceso de HMS. De manera alternativa, MutS $\alpha$  (heterodímero conformado por MSH2 y MSH6) puede reconocer nucleótidos mal apareados de tipo U/G, ante lo cual recluta a MutL $\alpha$  (MLH1/PMS2), que a su vez recluta a la exonucleasa ExoI para generar un hueco que puede ser reparado por un proceso de alta fidelidad. Si por otra parte, APE1 corta el sitio abásico, y esta lesión no es rápidamente reparada por BER, entonces el corte en cadena sencilla puede ser blanco para la CG, RCC ó HMS si se involucra una polimerasa de baja fidelidad, como pol $\eta$  ó pol $\theta$  (Fig. 4).

Otros estudios han revelado una polaridad funcional de AID durante

la diversificación de Igs. Shinkura y colaboradores (7) observaron que mutaciones que afectan el extremo C-terminal de la proteína, afectan la recombinación que da origen al cambio de isotipo, dejando intacta la capacidad para llevar a cabo la HMS. Por otra parte, mutaciones en el extremo N-terminal disminuyen la HMS y no afectan la RCC. Estas observaciones permiten sugerir que los dominios C y N-terminal de la AID interactúan con factores propios de cada mecanismo de diversificación de forma sitio específica.

#### HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA (DIVERSIFICACIÓN SIN MOLDE)

La hipermutación somática (HMS) es

un proceso de diversificación de las regiones variables de los receptores de antígenos que introduce cambios puntuales en los segmentos V(D)J rearreglados, por lo que se conoce como diversificación sin molde. La HMS introduce mutaciones puntuales con una tasa de  $10^{-3}$ /pb/generación, es decir, muchos órdenes de magnitud por encima de la tasa de mutación espontánea. Ocurre en una zona restringida, que comprende aproximadamente 150 pb curso abajo del promotor del *locus* IgV y se extiende entre 1 y 2 kb, disminuyendo a medida que aumenta la distancia al promotor (8).

El primer paso de la HMS, como se discutió en la sección anterior, ocurre cuando previo a la replicación de ADN se da una desaminación provocada por AID. De esta forma se fijan transiciones de tipo C/G→T/A, sobre todo, en las regiones con un alto número de *hotspots*. Sin embargo, hay otras vías que participan en la HMS y que, además, dan origen a cambios puntuales en los pares A/T.

En primer lugar, se ha observado que el complejo Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) facilita la HMS (Fig. 4). El MRN es un complejo que reconoce cortes de ADN, inicia cascadas de señalización durante los puntos de control del ciclo celular frente a cortes de ADN y regula cambios en la estructura de la cromatina en regiones próximas al corte de ADN. La Mre11 es una exonucleasa que se une directamente al ADN, la Rad50 es una proteína involucrada en el mantenimiento estructural de los cromosomas, mientras que la Nbs1 es la subunidad reguladora que determina la localización nuclear del complejo MRN. Se ha visto que la sobreexpresión de la subunidad Nbs1 en células B humanas acelera la hipermutación y que el complejo Mre11/Rad50 corta los sitios abásicos en el *locus* V(D)J para formar ADNcs. Con base en estas observaciones, se puede concluir que el complejo MRN

promueve el corte y la reparación de las lesiones iniciadas por AID por mecanismos que involucran polimerasas de baja fidelidad (8, 9).

Hasta el momento se han identificado aproximadamente 10 polimerasas de baja fidelidad, y son las polimerasas  $\eta$  y  $\theta$  las que presentan mayor actividad durante la HMS. Por un lado, ratones deficientes en pol $\eta$  muestran una reducción de 80% de mutaciones en sitios A/T, mientras que la ausencia de pol $\theta$  reduce en un 20% las mutaciones tanto en sitios A/T como C/G. Incluso se ha propuesto una interacción directa entre ambas polimerasas durante la HMS, lo cual promueve la aparición de cambios en los sitios A/T.

Por otra parte, se ha visto que el complejo MutS $\alpha$  (heterodímero MSH2/MSH6), el cual pertenece a la vía de reparación MMR (reparación equivocada), reconoce apareamientos incorrectos de tipo U/G y da origen a la formación de huecos, posiblemente por interacción directa con la exonucleasa 1 (Exo1). Una vez que se produce el corte en cadena sencilla, las polimerasas de baja fidelidad antes descritas pueden repararlo, dando lugar a nuevos cambios puntuales, los cuales se extienden a los sitios A/T (Fig. 4). Se ha observado que en ausencia de MSH2 ó MSH6 el número de mutaciones en los pares A/T disminuye. Aunado a esto, se sabe que el heterodímero MSH2/MSH6 interactúa y estimula la actividad de la polimerasa  $\eta$ , la cual induce cambios sobre todo en sitios A/T. Rev1 también se ha visto involucrada en la síntesis de ADN en el sitio abásico: Rev1 es una deoxicitidil transferasa, y tiene preferencia para insertar residuos de oxicitidina en la cadena recién sintetizada, lo cual resulta en transversiones de tipo C→G y G→C (8, 9).

Algunos autores han sugerido una correlación entre la transcripción de los *loci* de las regiones variables con

la tasa de hipermutación. Sin embargo, estudios recientes con elementos que actúan en *cis* para incrementar la tasa de transcripción han revelado que ésta es necesaria pero no suficiente para la HMS. Por ejemplo, Yang y colaboradores (10) analizaron la región promotora y el *enhancer* en el extremo 3' del *locus* IgL en células DT40. De dicho estudio derivaron observaciones interesantes. En primer lugar, al reemplazar el promotor endógeno del *locus* IgL por un promotor inactivo del bacteriófago T7, se eliminó por completo la CG y la HMS. En segundo lugar, al usar un promotor activo que mostraba una tasa de transcripción ~1.5 veces más alta que la del promotor endógeno, se observa muy poca CG y HMS. Por otro lado, al probar el promotor de  $\beta$ -actina, el cual incrementa la transcripción del gen hasta 3 veces en comparación con el promotor endógeno, la frecuencia de la CG y de la HMS alcanza el mismo nivel observado por el promotor endógeno. Esto quiere decir que la tasa de transcripción no está necesariamente relacionada de manera directa con la CG o con la HMS. Es posible incluso pensar que el promotor endógeno tiene elementos que lo hacen más eficiente para reclutar los complejos necesarios para ambos mecanismos de diversificación. Finalmente, se observó que al eliminar el *enhancer* en el extremo 3' del *locus* IgL, la CG y la HMS se vieron pobremente comprometidas, lo cual indica que el *enhancer* no es indispensable para la diversificación.

### CONVERSIÓN GÉNICA (DIVERSIFICACIÓN CON MOLDE)

Por definición, la conversión génica (CG) se refiere a un proceso de intercambio no recíproco de ADN entre un *locus* receptor y un *locus* donador. La CG está involucrada en procesos de reparación de daños al ADN como cortes en doble cadena, por lo

que en el contexto de la diversificación de Igs se puede considerar un mecanismo de diversificación con molde. Muchos organismos recurren a este mecanismo como herramienta para la generación de variabilidad en las regiones V(D)J de los receptores de antígenos. El pollo (*Gallus gallus*) es quizás el mejor modelo que ha permitido el estudio de la CG durante la diversificación de Igs (11). En el pollo existe una gran cantidad de pseudogenes ( $\psi$ V) en el extremo 5' de las regiones V tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras, los cuales han perdido señales de recombinación, *enhancers*, promotores, y han sido truncados en los extremos 5' y/o 3'. Por ejemplo, el *locus*  $\lambda$  está conformado por un solo segmento J $\lambda$ , un V $\lambda$  funcional y 25  $\psi$ V. Dado que estos pseudogenes presentan altos porcentajes de identidad con el segmento V funcional, son potenciales donadores de secuencia durante el proceso de CG. Un estudio realizado por Arakawa y colaboradores (6) confirma esta teoría, pues al eliminar  $\psi$ V donadores del *locus* rearreglado de la cadena ligera de células DT40, se elimina la diversificación por conversión génica, mientras que la mutación dependiente de AID aumenta. Es decir, se observó que la mayor parte de los cambios a nivel de secuencia, corresponden a cambios puntuales, que se localizan preferentemente en *hotspots* reconocidos por AID. Esto quiere decir que cuando AID introduce lesiones en el segmento V(D)J rearreglado, la reparación es efectuada, en caso de haber secuencias donadoras, por CG. Sin embargo, en ausencia de dichas secuencias, la HMS se ve incrementada. Esta observación apoya el modelo de un intermediario común para ambos procesos.

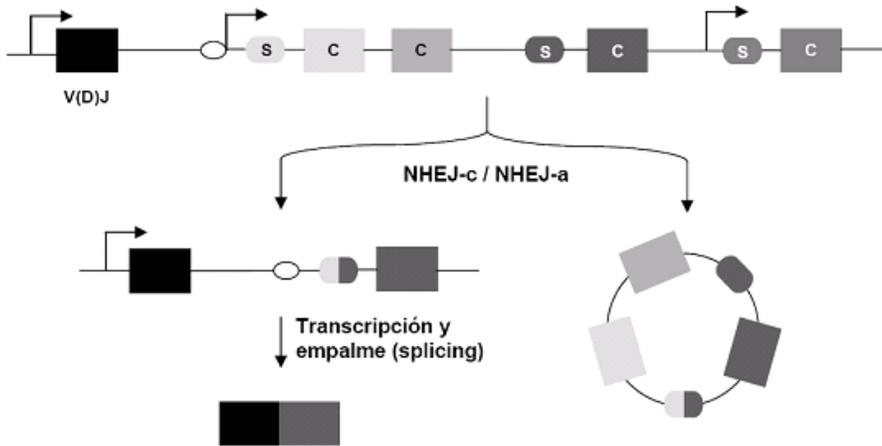
La CG es mediada por el proceso de recombinación homóloga (RH), el cual es un mecanismo de reparación de ADN que involucra un gran número

de proteínas (Rad52, BRCA1 y BRCA2, FA, MRN, helicasas, polimerasas, topoisomerasas y endonucleasas), algunas de ellas críticas para la CG (Fig. 4). En particular, BRCA2, la cual facilita la localización nuclear de Rad51 y el pegado de ésta al ADNcs, y las proteínas del grupo Rad52, un grupo altamente conservado en organismos eucariotes, han sido involucradas en la CG durante la diversificación de Igs. Este grupo incluye a Rad51, una recombinasa de la familia RecA, sus parálogos (Rad51B/C/D, XRCC2/3), Rad52, Rad54 y el complejo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1). En efecto, al mutar XRCC2, XRCC3 o Rad51B en células DT40, se observa una fuerte reducción en el número de eventos de CG, mientras que la frecuencia de cambios puntuales en la región V, principalmente en sitios C/G en *hotspots* reconocidos por AID aumenta considerablemente. Es decir, al impedir la CG se induce la HMS. Por su parte, al reconocer daños en el ADN, el complejo MRN es capaz de reclutar proteínas como la cinasa ATM (ataxia-telangiectasia mutada), iniciando así una cascada de señalización que reúne los componentes de la RH, y puede generar, a través de Mre11, extremos libres para iniciar la CG (12). Sin embargo, el uso de las proteínas del grupo Rad52 en el contexto de la diversificación de Igs parece variar de un organismo a otro: mientras que en el pollo, Rad54 (proteína accesoria de Rad51 durante la RH) es necesaria para la CG, en células B de ratón parece haber independencia entre los eventos de CG y la presencia de Rad54.

La conversión génica puede iniciarse por dos tipos de lesiones en el ADN: cortes en cadena sencilla o en doble cadena. En general, cuando se da un corte en doble cadena, la RH o el NHEJ son los encargados de reparar dicha lesión, siendo el NHEJ el mecanismo preferencial en células de

mamíferos. Dado que hay estudios que sugieren que en ausencia de UNG la CG disminuye fuertemente y la HMS se ve favorecida, se ha pensado que cortes en cadena sencilla pueden dar origen al inicio de la CG. Dicha propuesta se ha analizado midiendo la frecuencia de la CG en células DT40 deficientes en los factores para el NHEJ, es decir, en células deficientes en PKcs y Ku70. En este contexto, se observó que la CG se ve incrementada entre 5 y 10 veces en ausencia de NHEJ, lo cual indica que el corte en doble cadena inicia la CG en el *locus* de Ig. Con base en estos resultados, y dado que el NHEJ funciona durante todo el ciclo celular, es posible pensar que la CG y el NHEJ compiten por la reparación de los cortes en cadena doble durante todo el ciclo celular. La RH por otra parte se usa preferentemente durante la fase S tardía y la G2, por lo que la RH y NHEJ pueden competir únicamente durante estas etapas.

Para que pueda ocurrir la CG, no sólo es necesario tener secuencias homólogas donadoras y receptoras, si no que se debe cumplir una serie de requisitos para que la maquinaria a cargo de la CG pueda acceder a dichas secuencias. Un ejemplo de ellos es el estado de la cromatina en los  $\psi$ V. Estudios por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) han mostrado que los  $\psi$ V $\lambda$  donadores en células DT40 contienen histonas acetiladas (AcH3 y AcH4), lo cual es señal de un estado relajado de la cromatina. Para evaluar si estas condiciones favorecen la CG se usó HP1 (proteína de heterocromatina 1), una proteína de heterocromatina que promueve el silenciamiento de diferentes genes al inducir cambios en el estado de la cromatina (como desacetilación de histonas y propagación de la heterocromatina). Al disminuir el grado de acetilación de las histonas de los  $\psi$ V $\lambda$  por acción de HP1, se observó que la frecuencia de mutaciones acumuladas por CG dis-



**Figura 5.** Recombinación para cambio de clase (RCC). Las flechas indican el inicio de la transcripción de las regiones S involucradas en la recombinación. Los mecanismos NHEJ clásico y/o alternativo unen las regiones S transcritas, y permiten la escisión de los segmentos C restantes. Posteriormente, la transcripción y el empalme ("splicing") permiten la unión del segmento V(D)J reorganizado al segmento C que se encuentra curso abajo. El óvalo blanco representa elementos en cis, como promotores o enhancers, que favorecen la transcripción.

minuyó de 77 a 3%, mientras que los cambios acumulados por HMS aumentaron de 20 a 58%. Esto indica que la estructura de la cromatina de las secuencias donadoras es un factor determinante en la CG (13). Incluso se ha observado que al tratar células DT40 con tricostatina A, un inhibidor de desacetilasas, aumenta la frecuencia de los eventos de conversión génica, acelerando así la diversificación de anticuerpos. Cabe mencionar que al igual que la HMS, la CG ha sido asociada con una tasa de transcripción elevada. Sin embargo, como se discutió en la sección anterior, la transcripción no es suficiente para que ocurra la CG (10).

### RECOMBINACIÓN PARA CAMBIO DE CLASE (RCC)

Inicialmente, las células B expresan IgM, sin embargo, en respuesta al estímulo por algún antígeno y con ayuda de las células T, las células B expresan otros isotipos de Igs. El cambio de isotipo ocurre por medio de un mecanismo denominado recombinación para cambio de clase (RCC), el cual permite el reemplazo de la región constante de los anticuerpos por otro

exón curso abajo en el *locus* IGHC, para modificar la forma en la que el antígeno es removido del organismo, sin afectar la especificidad de la Ig. La RCC es un proceso sitio específico, pues se lleva a cabo en regiones intrónicas, conocidas como regiones S (switch). Las regiones S son secuencias de entre 1 y 10 kb de longitud, y se localizan a una distancia de entre 1 y 5 kb curso arriba de los genes CH (Fig. 5). Contienen patrones degenerados en tandem, ricos en G en la cadena no transcrita, así como blancos de desaminación distribuidos de manera heterogénea que son reconocidos por AID. Dado que son regiones intrónicas, las uniones heterogéneas entre ellas no afectan las secuencias codificantes. Se sabe que la transcripción de las regiones S es fundamental para dar inicio a la RCC, pues permite la formación de bucles, conocidos como *G-loops*, que consisten en híbridos ADN-ARN en la cadena molde. Los *G-loops* prolongan la desnaturalización del ADN y exponen los blancos de desaminación, favoreciendo el acceso de AID a la cadena de ADN rica en C (2).

El cambio de isotipo, al igual que

la recombinación V(D)J, depende del proceso NHEJ, por lo que un corte de ADN en doble cadena es indispensable para la RCC (Fig. 4, 5). Como se discutió en las secciones anteriores, posterior a la desaminación C→U en las regiones S, la UNG genera un sitio abásico en esta posición. Un estudio reciente reveló que células deficientes en APE2 y haploinsuficientes en APE1 muestran niveles muy bajos de RCC, por lo que se puede concluir que ambas proteínas APE son responsables del corte en doble cadena en el sitio abásico en las regiones S.

Las regiones S que participan en la RCC pueden estar separadas por distancias de hasta 150 kb, por lo que se requieren factores que faciliten la sinapsis S-S. Por ejemplo, las proteínas de reparación de ADN  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 se han involucrado en la sinapsis S-S, pues mutaciones en estas proteínas reducen la RCC, mientras que rearrreglos dentro de las regiones S se mantienen. La ATM y la subunidad Nbs1 del complejo MRN también parecen participar en la sinapsis. Por otro lado, la organización de las regiones promotoras y algunos *enhancers* favorecen la sinapsis S-S ya que se ha observado que, durante la activación de células B de ratón, se forma un complejo conocido como sinaptonémico, entre los *enhancers* E $\mu$  y 3'E $\alpha$  y la región promotora, que facilita la RCC. Alteraciones en los *enhancers*, impiden la formación del complejo sinaptonémico y disminuyen fuertemente la RCC (14).

Si bien es cierto que en ausencia de proteínas involucradas en el proceso de NHEJ, como Ku70 y Ku80, la RCC disminuye fuertemente, hay evidencias que sugieren la existencia de mecanismos alternativos para la RCC. Se ha observado que en ausencia de la subunidad catalítica del complejo DNA-PK (DNA-PKcs) puede ocurrir RCC y, recientemente, se ha propuesto un mecanismo alternativo

de NHEJ, que parece competir con el NHEJ clásico durante la RCC. El NHEJ alternativo, como se discutió previamente, es capaz de unir cortes en doble cadena que presentan micro-homología en el contexto fisiológico de la RCC. Esta vía alterna difiere del NHEJ clásico puesto que opera en ausencia de XRCC4 y de Lig4 (es probable que use otra ligasa, como la Lig3) y no parece generar niveles detectables de uniones de RCC; sin embargo, aunque no es el mecanismo más eficiente para la reparación de cortes en doble cadena, sí parece ser un mecanismo robusto durante la RCC (15). Es posible pensar que el NHEJ clásico y la vía alterna compitan para la reparación de cortes en doble cadena en las regiones S durante la RCC, sobre todo en aquellos casos donde los cortes muestran micro-homologías de mayor longitud.

Adicionalmente, se ha visto que la polimerasa  $\beta$  de ADN reemplaza dC desaminados por AID y promueve la reparación correcta del corte en cadena sencilla previniendo, así, la RCC. Es posible pensar que la pol $\beta$  disminuye su expresión durante la diversificación de Igs, o simplemente que las múltiples lesiones iniciadas por AID sobrepasan la capacidad de la polimerasa para ser reparadas. Por ello, se han estudiado los niveles de

expresión de pol $\beta$  durante la RCC (16). Se observó que los niveles nucleares de la polimerasa aumentan frente a la activación de células B durante la RCC. Cuando células deficientes en pol $\beta$  son activadas, hay un aumento de la RCC, pues se presenta un mayor número de cortes en doble cadena y de mutaciones en comparación con los controles. Se ha llegado a pensar que la pol $\beta$  intenta reparar las lesiones en las regiones S, y es sobrepasada por el número de desaminaciones.

### CONCLUSIÓN

Los estudios hechos en los últimos años en relación a la diversificación de Igs, han permitido identificar una serie de factores, tanto génicos como proteicos, necesarios para cada uno de los procesos aquí descritos. Incluso se han propuesto modelos que evidencian un grado de conocimiento considerable con respecto a la generación de variabilidad de anticuerpos. Desafortunadamente, la información que tenemos hasta el momento no deja claro el por qué los mecanismos de reparación, que en general son muy eficientes para garantizar la integridad del ADN, son la principal fuente de variaciones durante la diversificación de Igs en células B. Por otro lado, aún no contamos con estudios contundentes

que expliquen la especificidad de los mecanismos de diversificación para reconocer los *loci* de Igs y, en particular, las regiones V(D)J rearrregladas. Recientemente, se han involucrado elementos adicionales a las vías de reparación en el proceso de diversificación, como promotores y *enhancers* de los *loci* de Igs, y se han observado mecanismos alternativos que pueden competir con las vías de reparación clásicas implicadas en el desarrollo de los receptores de las células B. Lo anterior indica que es posible que existan procesos alternos aún no identificados que pueden, de igual forma, influenciar las modificaciones de los genes de Igs durante la respuesta inmune.

Las investigaciones futuras deberán ayudarnos a entender más a fondo los mecanismos de diversificación de Igs, lo cual redundará en aportaciones al entendimiento de procesos como la reparación de ADN y el mantenimiento de la integridad genómica, de enfermedades autoinmunes, y hasta oncogénesis. Cabe mencionar que la diversificación de Igs ha resultado ser un excelente modelo para el estudio de procesos de recombinación y conversión génica, y que sin duda alguna permitirá resolver preguntas clave en relación a estos mecanismos.

### REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York, NY, USA, p 1375-1384.
2. Maizels N (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 39: 23-46.
3. Ramón-Maiques S, Kuo AJ, Carney D, Matthews AGW, Oettinger MA, Gozani O, Yang W (2007) The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *PNAS* 104: 18993-18998.
4. Corneo B, Wendland RL, Deriano L, Cui X, Klein IA, Wong SY, Arnal S, Holub AJ, Weller GR, Pancake BA, Shah S, Brandt VL, Meek K, Roth DB (2007) Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449: 483-487.
5. Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS (2002) AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418: 99-103.
6. Arakawa H, Saribasak H, Buerstedde JM (2004) Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol* 2: 967-974.

7. Shinkura R, Ito S, Begur NA, Nagaoka H, Muramatsu M, Kinoshita K, Sakakibara Y, Hijikata H, Honjo T (2004) Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 5: 707-712.
8. Teng G, Papavasiliou FN (2007) Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* 41:107-120.
9. Di Noia JM, Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: 1-22.
10. Yang SY, Fugmann SD, Schatz DG (2006) Control of gene conversion and somatic hypermutation by immunoglobulin promoter and enhancer sequences. *J Exp Med* 203: 2919-2928.
11. Sale JE (2004) Immunoglobulin diversification in DT40: a model for vertebrate DNA damage tolerance. *DNA Repair* 3: 693-702.
12. Tang ES, Martin A (2007) Immunoglobulin gene conversion: synthesizing antibody diversification and DNA repair. *DNA Repair* 6: 1557-1571.
13. Cummings WJ, Munehisa Yabuki M, Ellen C, Ordinario EC, David W, Bednarski DW, Simon Quay S, Nancy Maizels N (2007) Chromatin structure regulates gene conversion. *PLoS Biol* 5: 2145-2155.
14. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt FW, Cogne M, Pinaud E, Kenter AL (2007) S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27: 711-722.
15. Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, M, Gumaste S, Geyer M, Zarrin AA, Manis JP, Rajewsky K, Alt FW (2007) IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449: 478-483.
16. Wu X, Stavnezer J (2007) DNA polymerase beta is able to repair breaks in switch regions and plays an inhibitory role during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 204: 1677-1689.

# PROBLEMA BIOQUÍMICO

Angélica Rueda y Sánchez de la Vega  
Correo E: aruedasan@prodigy.net.mx

## Regulación de los receptores de rianodina cardiacos por moduladores endógenos y exógenos: el caso del $\text{Ca}^{2+}$ y la cafeína

En el proceso de excitación-contracción en el músculo cardiaco participa activamente el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ /receptor de rianodina (RyR), que al activarse permite el aumento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) favoreciendo la contracción. La activación del receptor de rianodina ocurre cuando éste une a su ligando natural, el  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante el fenómeno conocido como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (1).

El receptor de rianodina es un homo-tetrámero que se encuentra asociado a la membrana del retículo sarcoplásmico. Se ha determinado que el lado citosólico del receptor tiene al menos 2 sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ : un sitio activador (de mayor afinidad) y otro inhibidor (de menor afinidad), de forma tal que cuando se grafica la actividad del receptor de rianodina en función de diferentes concentraciones de Ca libre (de pCa 9 a pCa 2) ésta tiene forma de campana, en donde la máxima activación se registra a concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  (2). En algunas arritmias letales, como en la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (o CPVT por sus siglas en inglés) se han encontrado mutaciones en el receptor de rianodina que tienen efectos profundos sobre su sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Específicamente la mutación puntual R4497C, modifica significativamente la afinidad del RyR por  $\text{Ca}^{2+}$ , en el sitio activador, de forma tal que el RyR ésta más activo a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango nanomolar (3). Esto funcionalmente se traduce en la aparición de liberaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  anómalas que favorecen la aparición de extrasístoles y en consecuencia participan en el establecimiento de la arritmia.

En un problema anterior calculamos la afinidad del receptor de rianodina por  $[\text{H}^3]$ -rianodina, así como el número total de receptores activos en una preparación microsomal de corazón de perro (REB 26(4): 142-143, 2007). Una forma sencilla para determinar el efecto de moduladores como el  $\text{Ca}^{2+}$ , sobre la actividad de estos receptores, es por ensayos de unión a ligando marcado radiactivamente (*binding*), en este caso,  $[\text{H}^3]$ -rianodina, en presencia de diferentes concentraciones de sus moduladores.

## Planteamiento experimental

Para determinar la sensibilidad de los receptores cardiacos de rianodina a  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó la fracción microsomal (100,000 x g) del homogenado de corazón de perro. En los tubos de unión total, (que se hacen por duplicado) se agregó la solución amortiguadora (pH = 7.2) con las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre indicadas en la tabla 1, más  $[\text{H}^3]$ -rianodina a una concentración fija de 7 nM. Se inició la interacción receptor-ligando al agregar 50  $\mu\text{g}$  de proteína microsomal y se incubó por 90 min a 36 °C, para alcanzar el equilibrio. Posteriormente se filtró, se lavó y se midió la cantidad de  $[\text{H}^3]$ -rianodina que permaneció unida a los microsomas usando el contador de centelleo líquido.

En los tubos de unión inespecífica (que también se hacen por duplicado) se agregó todo lo anterior, más ligando no marcado radiactivamente (10  $\mu\text{M}$  de rianodina) y se procesó de la misma forma que los tubos en donde se determinó la unión total.

La tabla 1 muestra los datos de radioactividad (en cuentas por min, o cpm) que se obtuvieron tanto de los tubos de unión total como en los de unión no específica.

TABLA 1

[Ca <sup>2+</sup> ]-libre ( $\mu\text{M}$ )	Unión Total		Promedio dpm	Unión Específica	
	cpm Serie 1	cpm Serie 2		dpm	pmol/mg Pt
0.1	1028	1003			
1	1053	1095			
10	1454	1475			
100	1629	1579			
1000	1614	1657			
10000	1249	1177			
<b>Unión no específica</b>					
0.1	942	952			
1	939	910			
10	940	1000			
100	967	991			
1000	1053	1017			
10000	961	1007			

El receptor de rianodina es un blanco común para un gran número de factores endógenos (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, ADP, calmodulina, sorcina, y otras proteínas) y exógenos (como rianodoles, metilxantinas, toxinas y anestésicos locales).

Las metilxantinas (dimetilxantina, teobromina, teofilina, cafeína, entre muchas otras) son componentes comunes en la dieta de la mayoría de las personas. Entre los diversos efectos fisiológicos de las metilxantinas se ha encontrado que evocan la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares al incrementar la sensibilidad del RyR por su agonista endógeno. Dentro de las metilxantinas, la cafeína es la que se usa con mayor frecuencia para activar masivamente a los RyRs y determinar el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares. La cafeína ofrece varias ventajas: es hidrosoluble, difunde rápidamente a través de la membrana plasmática y su unión al RyR es muy rápida y reversible.

En otro experimento se determinó el efecto de la cafeína (5 mM) sobre la actividad del RyR a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Los tubos se procesaron de la misma forma descrita anteriormente.

La tabla 2 muestra los datos de radioactividad que se obtuvieron tanto de los tubos de unión total como en los de unión inespecífica, en presencia de 5 mM de cafeína.

**TABLA 2**

Unión Total			Unión Específica		
[ $\text{Ca}^{2+}$ ]-libre ( $\mu\text{M}$ )	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio dpm	dpm	pmol/mg Pt
0.1	1199	1112			
1	1753	1909			
10	2226	2349			
100	2176	2270			
1000	2080	1913			
10000	1769	1573			
Unión no específica					
0.1	954	967			
1	974	1000			
10	1009	968			
100	1049	955			
1000	927	1014			
10000	1174	1127			

## PREGUNTAS

- Haga el promedio de cada punto, tanto para la *unión total* como para la *unión no específica*, en ambas tablas de datos. Convierta el promedio de cpm a desintegraciones por minuto (dpm) sabiendo que se usó un contador de centelleo líquido que tiene una eficiencia del 55 % y tiene una basal de radiactividad de 20 cpm. Calcule la *unión específica* en dpm.
- Si un Curie (Ci) es igual a  $2.2 \times 10^{12}$  dpm, calcule la *unión específica* en pmoles de [ $^3\text{H}$ ]-rianodina/mg proteína, para cada uno de los puntos en ambas tablas, considerando que la [ $^3\text{H}$ ]-rianodina tiene una actividad específica de 56 Ci/mmol.
- Haga las gráficas de regulación de la actividad de los RyRs por  $\text{Ca}^{2+}$ , en ausencia y presencia de cafeína (unión específica en pmol/ mg proteína vs. [ $\text{Ca}^{2+}$ ] libre en  $\mu\text{M}$ ); así como el ajuste correspondiente de los datos. ¿Cual es el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad de los RyR?, ¿Cuál es el efecto de la cafeína sobre la actividad del RyR?
- Haga las graficas normalizadas, considerando como el 100 % el punto en que se encontró la mayor unión específica. Determine: (a) la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cual se alcanza la mayor actividad del RyR (*Bmax*), (b) la constante de activación (*Ka*); (c) el coeficiente de Hill de activación ( $n_a$ ); (d) la constante de inactivación (*Ki*); (e) el coeficiente de Hill de inactivación ( $n_i$ )

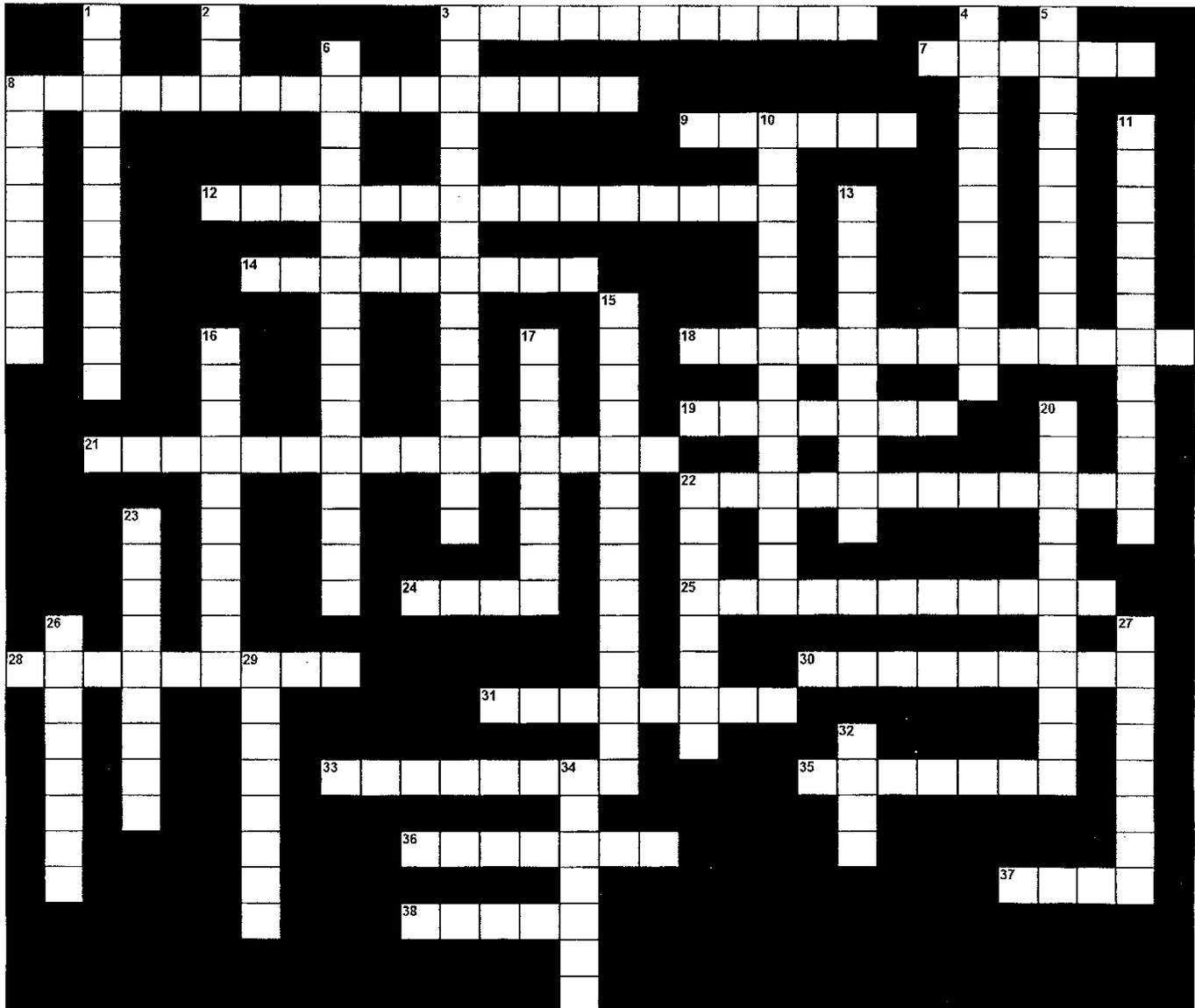
## REFERENCIAS

- Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.
- Meissner G (2004). Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* 35: 621-628.
- Jiang D, Xiao B, Zhang L, Chen SRW (2002) Enhanced basal activity of a cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) mutant associated with ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res* 91: 218-225.

# CRUCIBIOQ

## OBESIDAD

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



### HORIZONTALES

3 Nombre del proceso mediante el cual la oxidación de los ácidos grasos produce acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato y acetona, estas moléculas son utili-

zadas como combustible en los tejidos periféricos; este proceso se acelera en la diabetes mellitus.

7 Nombre del grupo (en singular), en el que quedan incluidas diferentes moléculas como son: ácidos grasos, grasas, colesterol, ácidos biliares, hormonas sexuales, vitamina E, etc., cuya característica fundamental es que son hidrófobas y por lo tanto insolubles en agua.

- 8 Algunos de los principales problemas \_\_\_\_\_ conectados con la obesidad son: hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca, angina de pecho, infarto al miocardio y tromboflebitis.
- 9 Cuando este tipo de ácidos son liberados por acción de la lipasa y si hay suficiente cantidad de glicerol-3-fosfato proveniente de la oxidación parcial de la glucosa, se reesterifican para producir triacilglicérols que van a guardarse en los adipocitos.
- 12 Del 2 al 3% de los casos de obesidad se deben a un daño de este tipo, el cual puede ocasionarse por hipotiroidismo, hipogonadismo, lesiones hipotalámicas ovario poliquístico, o bien por síndrome de Cushing.
- 14 Molécula presente en los tejidos animales y vegetales y que ayuda a la Acil CoA de cadena larga a cruzar del citosol a la mitocondria, para ello recibe al grupo acilo y ayudado de la enzima transportadora específica lo traslada a la matriz mitocondrial donde se asocia nuevamente a la Coenzima A.
- 18 Partículas de lipoproteína que transportan a los triacilglicérols y al colesterol de la dieta, desde el intestino hacia los tejidos.
- 19 Péptido secretado por el estómago que al elevar sus niveles antes de las comidas, estimula el apetito y su valor disminuye después de la ingesta alimenticia.
- 21 Es la molécula que tiene mayor capacidad energética, provee aproximadamente seis veces más energía que un peso equivalente de glucógeno hidratado.
- 22 Su secreción está modulada por la insulina y su función más importante es disminuir la unión de los monocitos a las células endoteliales; en el obeso su concentración se encuentra disminuida.
- 24 Siglas de las lipoproteínas que se encuentran aumentadas en la obesidad, éstas pueden atravesar la pared vascular y acumularse en la placa ateromatosa y liberar colesterol a la pared.
- 25 Uno de los factores de la obesidad en humanos puede ser la \_\_\_\_\_ a la leptina, la cual puede deberse a una disminución en el nivel de receptor de la hormona en el cerebro o a la saturación de su receptor que la transporta hacia el sistema nervioso central.
- 28 Tipo de obesidad en la que el individuo tiene un marcado exceso de grasa desde la cintura hacia la parte baja del cuerpo.
- 30 Hormona secretada por los adipocitos bloqueando la acción que sobre ellos tiene la insulina; al parecer se sintetiza en mayor cantidad en la grasa abdominal que en la subcutánea.
- 31 Trastorno de los sistemas reguladores del peso corporal que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa, debido a que la ingesta calórica rebasa el gasto energético. Esta patología está relacionada con diabetes mellitus, hipertensión, osteoartritis, cálculos biliares y enfermedades cardiovasculares, entre otras.
- 33 Una de las causas de la obesidad se debe a una regulación anormal de estas moléculas peptídicas que son producidas en diferentes tejidos.
- 35 Nombre del núcleo del hipotálamo que tiene a las neuronas estimuladoras y supresoras del apetito.
- 36 Hormona producida por los adipocitos que al llegar por vía sanguínea al cerebro incide en los receptores del hipotálamo que regulan el apetito.
- 37 El índice de \_\_\_\_\_ corporal (IMC) se calcula dividiendo el peso en kilogramos entre la estatura en metros, al cuadrado.
- 38 Es aquel individuo que tiene un índice de masa corporal igual o superior a 30.

## VERTICALES

- 1 Proteína desacopladora que permite que los protones entren a la matriz mitocondrial sin pasar por la ATPasa, de este modo la oxidación continua de ácidos grasos en el adipocito disipa la energía en forma de calor.
- 2 Cantidad de gramos de grasa que se almacena en el cuerpo de un individuo obeso por cada 38 kilojoules que consumen en exceso.
- 3 Hormona que tiene la función de contraer la vesícula biliar y que permite la salida de la bilis al duodeno.
- 4 Nombre que recibe la teoría que postula la existencia de un mecanismo de retroalimentación que inhibe el apetito y aumenta el consumo de energía cuando hay un exceso del peso corporal.
- 5 Las lesiones en el núcleo ventromedial de este órgano ocasionan ingestión excesiva de alimento que conduce a la obesidad.
- 6 Dentro de las complicaciones asociadas con la obesidad, las de este tipo, ocasionan aplanamiento de los cuerpos vertebrales de la columna, artrosis generalizada especialmente en rodillas, caderas y región lumbar.
- 8 Cuando un obeso logra disminuir de peso, nunca logrará disminuir la \_\_\_\_\_ de adipocitos.
- 10 Tipo de neuronas que producen la hormona estimuladora de los  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH) lo que conduce a que se suprima el apetito e incrementan el catabolismo.

- 11 Las neuronas de éste tipo estimulan el apetito al producir y liberar al neuropéptido Y (NPY); durante la inanición este péptido se encuentra elevado.
- 13 Cuando en estas células se depositan los triacilglicérols en exceso, primero se distienden al máximo y luego se dividen, ocasionando una multiplicación de ellas, especialmente en la infancia o pubertad.
- 15 Enfermedad caracterizada por la formación de placas fibrosas con colesterol en la pared interna de los vasos sanguíneos, por tal razón hay pérdida de la elasticidad y disminución del flujo sanguíneo.
- 16 Síndrome en el que la obesidad está relacionada con intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensión.
- 17 La hipertensión\_\_\_\_\_ que desarrollan aproximadamente el 50% de los obesos se debe en parte, a que la hiperinsulinemia provoca aumento de la reabsorción de sodio y agua.
- 20 Es el valor numérico del índice de masa corporal aconsejable para un estado saludable en adultos.
- 22 Así se llama a la obesidad en la que el individuo tiene un marcado exceso de grasa en la parte superior del cuerpo.
- 23 Las personas que se encuentran en esta condición tienen un índice de masa corporal entre 25 y 29.9.
- 26 En la enfermedad de este nombre, llamada del tipo II, los individuos tienen una concentración normal de insulina pero sus células son resistentes a ella, acción que puede deberse a que ante la hiperfagia de los obesos se suprime la síntesis de los receptores de insulina.
- 27 Péptido estimulante del apetito, al parecer la leptina ayuda a descender la expresión de los genes que la codifican, lo que conduce a una menor ingesta de alimento.
- 29 El transportador de glucosa en su isoforma 4 (GLUT4) sensible a esta hormona, activa la expresión de las enzimas lipogénicas y permite que se acumulen moléculas de triacilglicérol en los adipocitos.
- 32 Se llama así al subgrupo de obesidad en la que hay un índice de masa corporal que va de 35.0 a 39.9 y que presenta alto riesgo de adquirir enfermedades conectadas con esta patología.
- 34 Tejido distribuido preferentemente bajo la piel, en la cavidad abdominal y en el músculo esquelético, tiene como función almacenar y liberar ácidos grasos para cubrir demandas energéticas.

# RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Angélica Rueda y Sánchez de la Vega  
 Correo E: aruedasan@prodigy.net.mx

1. Para convertir las cuentas por minuto (cpm) a desintegraciones por minuto (dpm) tiene que considerar la eficiencia del contador de centelleo líquido y la basal de radiactividad del mismo.

Entonces:  $dpm = (cpm \text{ totales} - \text{basal de radiactividad}) \div 0.55$ .

2. Para convertir los valores de radiactividad de dpm a pmol/mg de proteína hay que considerar que 1 pmol de  $[^3H]$ -rianodina (56 nCi) equivale a 123200 dpm, y que se usaron 50  $\mu g$  de proteína microsomal por tubo. Los valores quedaran como se muestra en las Tablas 1 y 2.

3. La gráfica de los datos de ambos experimentos queda como se muestra en la figura 1.

El ajuste corresponde a una ecuación que considera 2 sitios o variables: uno de activación y otro de inactivación, ambos relacionados a la  $[Ca^{2+}]$  libre en la siguiente expresión:

$$B = \frac{Bmax(x^{n_a})}{Ka^{n_a} + x^{n_a}} * (1 - \frac{x^{n_i}}{Ki^{n_i} + x^{n_i}})$$

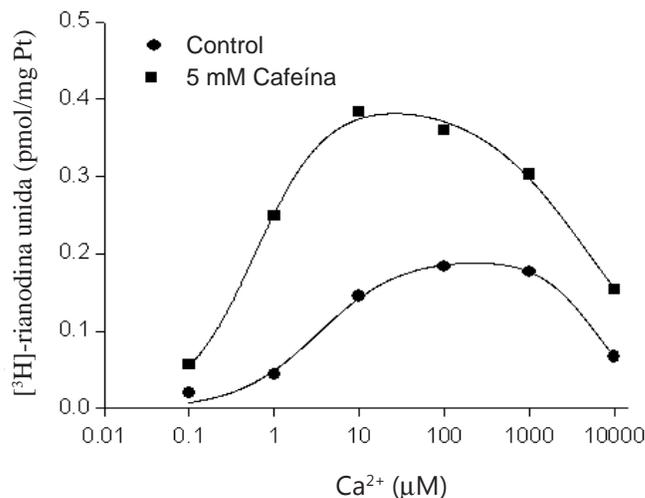


Figura 1.

Donde B es el valor que alcanza la unión específica con respecto a la  $[Ca^{2+}]$ ; Bmax es el valor máximo de unión de  $[^3H]$ -rianodina; x corresponde a la  $[Ca^{2+}]$  libre, Ka y Ki son las constantes de activación y de inactivación, y por último  $n_a$  y  $n_i$  son los respectivos coeficientes de Hill (1).

TABLA 1

$[Ca^{2+}]$ -libre ( $\mu M$ )	Unión Total			Unión Específica		
	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg Proteína
0.1	1028	1003	1015	1810	124	0.020
1	1052	1095	1074	1916	272	0.044
10	1454	1475	1464	2626	899	0.146
100	1629	1579	1604	2880	1136	0.184
1000	1614	1657	1635	2937	1091	0.177
10000	1249	1177	1213	2170	417	0.068
<b>Unión no específica</b>						
0.1	942	952	947	1686		
1	939	910	924	1644		
10	940	1000	970	1727		
100	967	991	979	1744		
1000	1053	1017	1035	1846		
10000	961	1007	984	1753		

TABLA 2

[Ca <sup>2+</sup> ]-libre (μM)	Unión Total			Unión Específica		
	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg Proteína
0.1	1028	1003	1015	1810	124	0.020
1	1052	1095	1074	1916	272	0.044
10	1454	1475	1464	2626	899	0.146
100	1629	1579	1604	2880	1136	0.184
1000	1614	1657	1635	2937	1091	0.177
10000	1249	1177	1213	2170	417	0.068
<b>Unión no específica</b>						
0.1	942	952	947	1686		
1	939	910	924	1644		
10	940	1000	970	1727		
100	967	991	979	1744		
1000	1053	1017	1035	1846		
10000	961	1007	984	1753		

Después del ajuste no lineal, los valores que se obtienen para las variables de la ecuación son:

TABLA 3

Variable	Control	Cafeína
<i>Bmax</i> (pmol/mg Pt)	0.20 ± 0.02	0.40 ± 0.03
<i>Ka</i> (μM)	3.3 ± 1.6	0.6 ± 0.1
<i>n<sub>a</sub></i>	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2
<i>Ki</i> (mM)	6.1 ± 2.6	5.0 ± 1.5
<i>n<sub>i</sub></i>	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.2

El efecto que ejerce el Ca<sup>2+</sup> sobre la actividad de los RyRs es bimodal. A [Ca<sup>2+</sup>] libres menores de 200 μM, el Ca<sup>2+</sup> funciona como activador; sin embargo, cuando se supera esta [Ca<sup>2+</sup>] libre, este catión ejerce su efecto en el sitio inhibitor, disminuyendo la actividad del RyR. Estos efectos no son cooperativos, como lo indican los respectivos coeficientes de Hill. Coeficientes de Hill de uno indican que el comportamiento es hiperbólico (es decir, que se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten) y que no hay cooperatividad. Un coeficiente de Hill mayor a uno indica cooperatividad positiva mientras que un valor menor a uno, pero mayor a cero, indica cooperatividad negativa.

La cafeína aumenta al doble el número de RyR activos (*Bmax*) y disminuye 5.5 veces la afinidad por Ca<sup>2+</sup> del sitio activador. De forma tal que se necesita menos Ca<sup>2+</sup> para activar a un mayor número de receptores.

4. Si los datos se normalizan por el punto donde se obtuvo la mayor actividad de los RyRs y se grafican nuevamente obtenemos la representación de la figura 2.

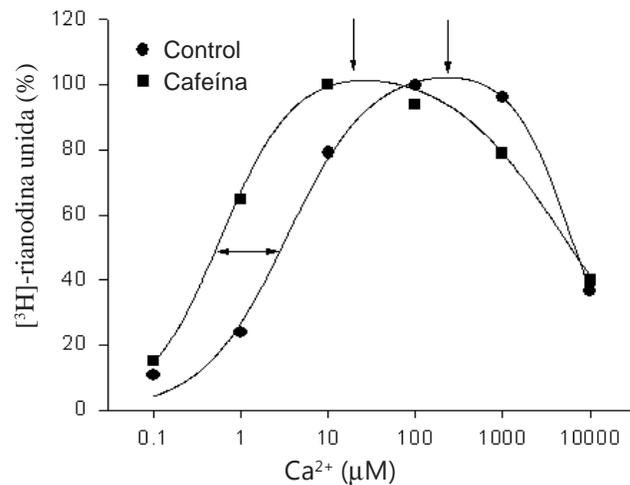


Figura 2.

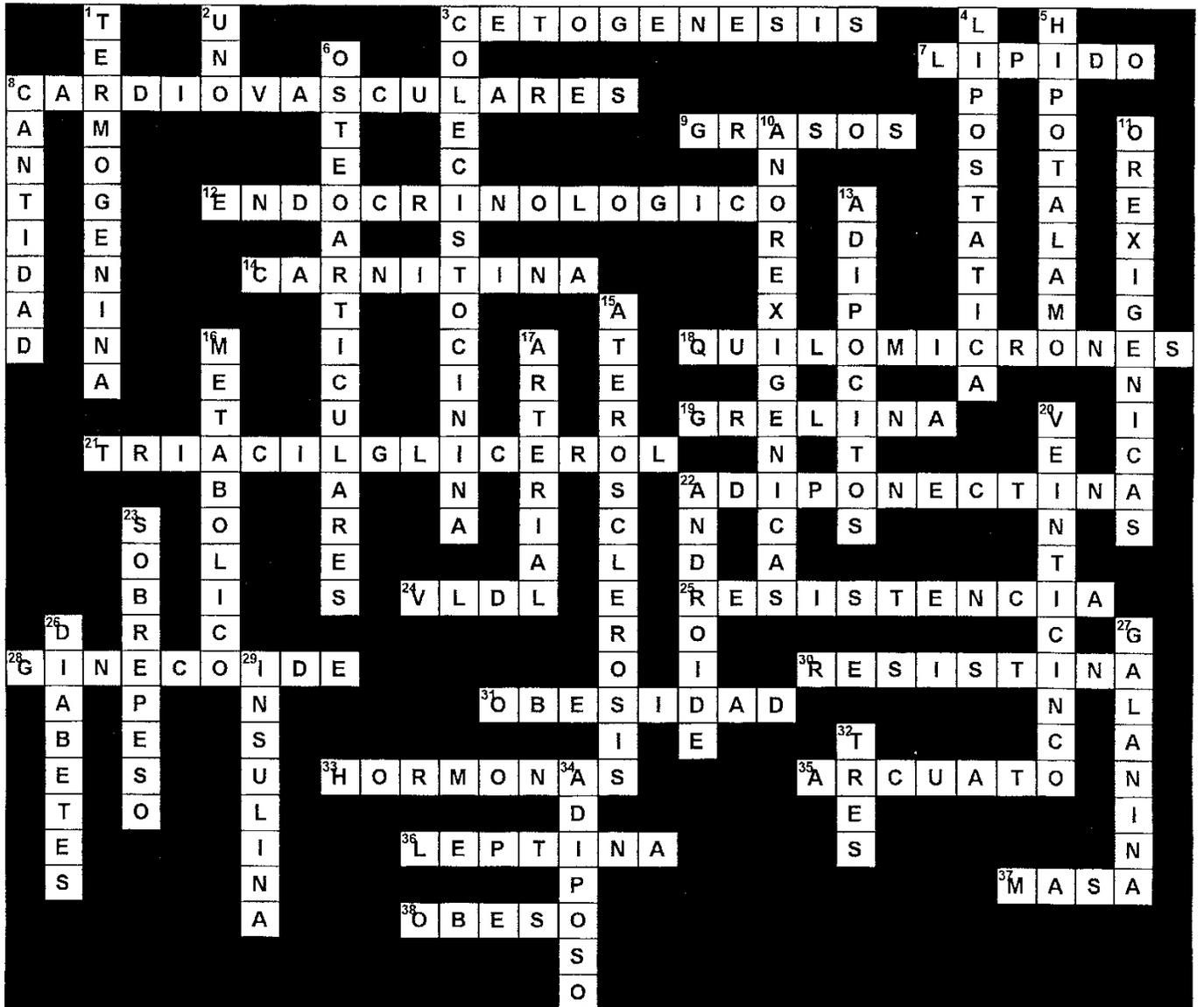
Este tipo de gráfica permite observar fácilmente el desplazamiento -hacia la izquierda- que ocurre en presencia de la cafeína (5 mM), lo que indica un aumento de 5.5 veces en la afinidad por Ca<sup>2+</sup> del sitio de activación. También permite determinar fácilmente la [Ca<sup>2+</sup>] a la cual se obtuvieron los puntos de máxima activación de los RyRs. Para la curva control fue de 231 μM y para la curva con cafeína fue de 26 μM. Los valores de las constantes de activación e inactivación, así como de sus respectivos coeficientes de Hill permanecen iguales a los que se obtuvieron en el primer ajuste no-lineal (Tabla 3).

## REFERENCIAS

1. Meissner G, Rios E, Tripathy A, Pasek DA (1997). Regulation of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (Ryanodine Receptor) by Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations and anions. *J Biol Chem* 272: 1628-1638.

# SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ OBESIDAD

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





## **Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A. C.**

**XVI Congreso el 4 y 5 de  
Agosto del 2008  
Aula Magna “Jacinto Pallares”,  
Facultad de Derecho,  
UNAM, en Ciudad  
Universitaria.**

### **Conferencias:**

- **Anticuerpos terapéuticos.**
- **Linfocitos T CD 57+, ¿Héroes o villanos?**
- **Las interfases en enzimas oligoméricas.**
- **La bioquímica de la memoria.**
- **La participación de canales iónicos en la fisiología del espermatozoide.**
- **Respondiendo a una pregunta hecha hace un siglo: El transporte epitelial.**

Informes e inscripciones (55) 5623 2178

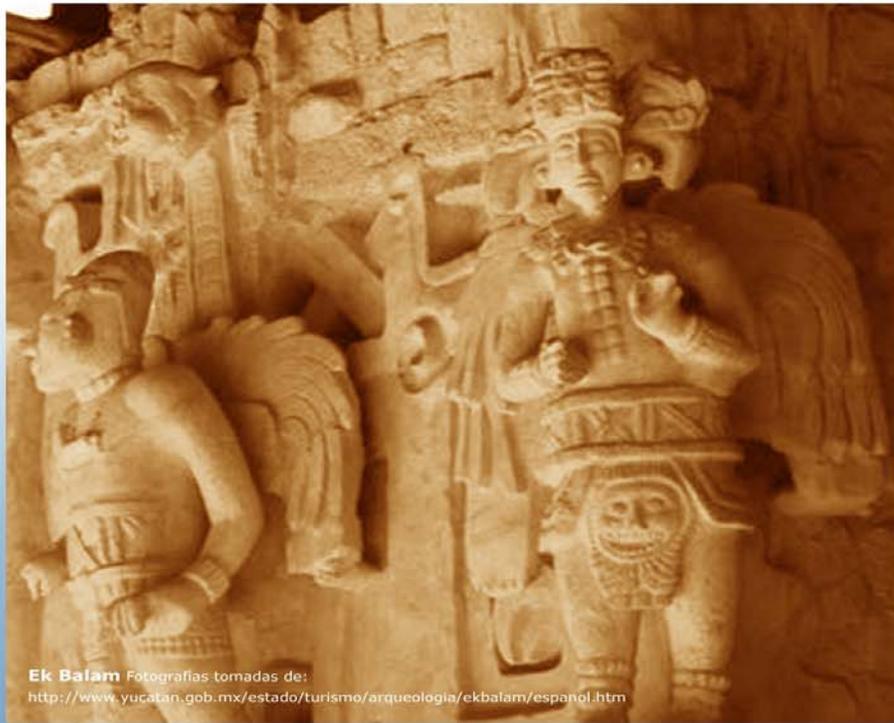
<http://www.ampbac.org/>





# SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA A.C.

## XXVII Congreso Nacional



Ek Balam Fotografías tomadas de:  
<http://www.yucatan.gob.mx/estado/turismo/arqueologia/ekbalam/espanol.htm>

16 al 21 de noviembre, 2008

Mérida Yucatán

INFORMACIÓN:  
<http://smb.org.mx>



# INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)

La REB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y sus áreas afines. La Revista está dirigida a profesores y a estudiantes de licenciatura y de posgrado, por lo cual los trabajos que se sometan para su publicación deberán de ser suficientemente claros y explícitos. Los temas se deben de presentar de forma sencilla, organizada y que de manera gradual permitan la comprensión del trabajo.

Se aceptan contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones que se ajusten a los siguientes lineamientos editoriales:

## I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o, en su caso, definir las al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando el departamento, la institución, la ciudad y estado, el país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.
- 2) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.
- 3) Resumen. Se deberán incluir un resumen en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de diez renglones.
- 4) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.
- 5) Referencias. Se sugieren no más de 15 citas bibliográficas, tanto específicas como de lecturas recomendadas, lo que obliga a los autores a seleccionar aquellas referencias realmente importantes e informativas. Las referencias se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener: apellidos e iniciales de todos los autores, año de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo:

Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature gen* 113:25-34.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The Molecular Biology of Immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, pp 81-104.

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

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 6) Figuras y Tablas. Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, incluyendo figuras y tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras deben de estar en blanco y negro, sin fondo ni sombreados. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales, separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con

arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente u obtener 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 con la abreviatura, la primera letra mayúscula (Fig 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula (Tabla 2). Para la versión electrónica de la revista se pueden admitir figuras a color, en tal caso se deberán de enviar ambos formatos en blanco y negro y en color.

- 7) Abreviaturas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

## II) OTRAS COMUNICACIONES

- 1) Los temas de las otras comunicaciones pueden ser muy variados; desde resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita en no más de dos páginas.
- 3) Se aceptará un máximo de dos referencias que se incluirán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrá incluir una figura o una tabla, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión. Los manuscritos serán evaluados por tres revisores, quienes opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas al autor responsable para su corrección e incorporación en el manuscrito. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la revista, en un lapso no mayor a 30 días; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá identificar plenamente su adscripción con teléfono y dirección postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje se debe expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados.