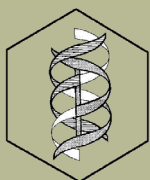


Revista de Educación Bioquímica

REB 2022



Órgano de información de la
Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A.C.



Asociación Mexicana de
Bioquímicos, A.C.

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM

Facultad de Medicina



EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

FABIAN ARECHAVALA VELASCO

Unidad de Investigación Médica en Medicina
Instituto Mexicano del Seguro Social

ARTURO BECERRA BRACHO

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Medicina, Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Pediatría

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

VÍCTOR M. VALDES LÓPEZ

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

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

MARISELA AGUIRRE RAMÍREZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

MARÍA MALDONADO VEGA

Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación
Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío

JUAN RAFAEL RIESGO ESCOBAR

Instituto de Neurobiología, UNAM
Campus Juriquilla, UNAM

ERIKA TORRES OCHOA

Departamento Académico de Ingeniería en Pesquerías
Universidad Autónoma de Baja California Sur

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, Latindex y Scielo.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), Volumen 41, Número 2, junio de 2022, publicación trimestral, editada por Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., Avenida Universidad No. 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad de México, México. Correspondencia: Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Correo E: reb@bq.unam.mx

<http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/index.html>, <https://rebeducation.wordpress.com/>
Editor responsable Dr. José Víctor Calderón Salinas. ISSN: 1870-3690. Reserva de derechos al Uso Exclusivo No. 04-2015-113014523300-203, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en junio del 2022.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente las del Comité Editorial. Se autoriza la reproducción parcial o total de los textos aquí publicados siempre y cuando se cite la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

LA IMPRESIÓN EN TERCERA DIMENSIÓN
DE CÓDIGO ABIERTO, UNA ALTERNATIVA
EN MEDICINA
Felipe de Jesús Mondragón Serrano,
América Padilla Viveros,
José Víctor Calderón Salinas.....49

ARTÍCULOS

¿CÓMO CONTROLAN LAS LEGUMINOSAS
EL NÚMERO DE NÓDULOS PARA EVITAR
COMPROMETER SU CRECIMIENTO Y
DESARROLLO?
Mariel C. Isidra-Arellano,
Oswaldo Valdés-López.....51

¿EN QUÉ EMPLEA EL ERITROCITO SU ATP?
Sara Morales-López,
Lilia Morales-García,
Teresa Fortoul Van Der Goes,
Rebeca Milán-Chávez66

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ
ENFERMEDADES METABÓLICAS
Yolanda Saldaña Balmori.....70

EL SINGULAR CASO DE ALDA-1.
UN MODULADOR DE LA ACTIVIDAD
DE ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS
Javier Alejandro Belmont-Díaza,
José Salud Rodríguez-Zavala.....74

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
ENFERMEDADES METABÓLICAS
Yolanda Saldaña Balmori.....80

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....81

EDITORIAL

LA IMPRESIÓN EN TERCERA DIMENSIÓN DE CÓDIGO ABIERTO, UNA ALTERNATIVA EN MEDICINA

La impresión en tercera dimensión (3D) es una técnica que permite generar objetos capa sobre capa con diversas formas y volúmenes con polímeros, materiales cerámicos y aleaciones metálicas, que resulta en multitud de objetos para las más diversas aplicaciones, incluyendo objetos con formas que difícilmente se podrían realizar con otras técnicas (Campbell et al., Potential, and Implications of Additive Manufacturing. Atl Counc 2011).

Diversos proyectos de código abierto en torno a la impresión 3D promovieron la reducción de costos (aprox. 5,000-20,000 pesos) respecto a las impresoras 3D de código cerrado o de patente (Jones et al., Robotica 2011; Malone & Lipson, Rapid Prototyping Journal 2007). La generación de software amigable y accesible a personas no necesariamente especializadas en materiales, diseño, sistemas e informática y el acceso y costo de los materiales, permitió el desarrollo de nuevas aplicaciones en la investigación. Asimismo, el esquema de código abierto permite que los interesados o expertos en algún rubro puedan profundizar en los mecanismos, diseños, desarrollos y empleo de impresoras y software, generando un gran potencial de fabricación con impresoras prácticamente de escritorio que no requieren grandes inversiones como en el caso de las impresoras industriales (que van de los cientos de miles a los millones de pesos), las que además, adicional al costo de la máquina, requieren pagos de servicio, uso de software y actualizaciones; además, las licencias y los materiales se encuentran regularmente restringidos forzando al usuario a comprar en la misma compañía. Estas máquinas industriales inhiben el desarrollo de procesos y la investigación, ya que no es posible modificar o hacer ajustes en el software o el hardware.

Otras ventajas de las impresoras 3D de bajo costo es que se basan en esquemas de código abierto en varios sentidos: 1) La impresora se puede modificar de manera que se ajuste razonablemente a las necesidades del usuario; 2) Se puede usar una mayor variedad de accesorios y materiales y los mismos pueden ser obtenidos con diferentes proveedores, incluyendo mayoristas de bajo costo; 3) El software que da la vida a la máquina (firmware) es de uso libre y se puede modificar adaptándolo a las necesidades; 4) El software de control para producción es también de uso libre, así como el que genera los códigos de los modelos para que se imprima el objeto; 5) Hay repositorios de comunidades que permiten el intercambio de software (www.github.com), esquemas electrónicos, modelos tridimensionales (www.thingiverse.com) y de ideas. Todo lo cual no solo potencializa la generación de objetos, sino que permite el desarrollo y la investigación dentro de la comunidad de usuarios que alimentan y mejoran las posibilidades de aplicación.

El empleo de estas impresoras favorece entre otros ejemplos soluciones científicas y médicas; dentro de la multiplicidad de objetos que se pueden formar algunos han sido orientados a las aplicaciones médicas, he aquí un breve recuento: Órganos y tejidos con precisión anatómica para enseñanza; modelos anatómicos con sensores para prácticas médicas, paramédicas, odontológicas y veterinarias; modelos para prácticas quirúrgicas o de procedimientos diagnósticos invasivos, que guían y permiten ensayar diferentes técnicas en un modelo personalizado con la información del paciente; generación de componentes farmacéuticos para la administración personalizada con cápsulas impresas para nano-dosis; formar implantes

inertes no-bioactivos para llenar espacios que tienen ausencia de estructuras, ya sea por problemas congénitos, por accidentes o enfermedades que degeneran tejidos; generar implantes bioactivos con andamios para recubrir con células cultivadas del propio paciente que se integren a sus tejidos; generar implantes bioactivos con andamios impregnados de hormonas o de partículas inductoras de la diferenciación de células a tejidos que requiera el paciente. Todas estas aplicaciones están en diferentes etapas de evolución en cuanto a la investigación científica se refiere y solo unos cuantos ejemplos de los implantes bioactivos han llegado a la aplicación en humanos con protocolos estrictos y controlados. Los más frecuentes son los empleados en odontología, lo que ha permitido entender la biocompatibilidad y la generación de formas estrictamente personalizadas, ya que se pueden imprimir incluso en el consultorio. Los de titanio y del polímero policaprolactona para el recubrimiento de lesiones o cirugías de cráneo también se han utilizado con buenos resultados; se debe de resaltar que los tres ejemplos son de implantes no-bioactivos.

Para el caso de implantes bioactivos se han usado andamios con condrocitos para la reconstrucción de orejas y la investigación en modelos animales está muy activa y avanzada para la generación de piel, cartílago, hueso, vasos sanguíneos y otros tejidos, seguramente varios productos alcanzarán próximamente la aprobación para iniciar los tratamientos específicos y especializados en humanos.

También se han tenido grandes fracasos que incluso han cobrado vidas de pacientes a los que se les implantó una tráquea impresa en 3D recubierta de células madre, en un sonado y terrible caso (Gilbert et al., Bioethics 2018), en el que sin embargo el error no se debió *per se* a la impresión 3D, ya que sin hacer las pruebas mínimas de biocompatibilidad,

respuesta al injerto y olvidando por completo la necesidad de la contracción muscular y de células secretoras, en fin, ignorando la complejidad de un órgano y un tejido, fueron implantadas por la única propiedad de que el andamio permitió la integración de células madre y esperando la diferenciación a células sin estímulos hormonales. Todo lo cual nos habla de la necesidad de un enfoque multi y transdisciplinario de conocimientos profundos en el equipo de trabajo de la ingeniería, el diseño, los materiales y por supuesto la anatomía y las funciones de los tejidos, y no solo de una propuesta lineal de la forma y un tipo celular creciendo en el andamio. Sin olvidar las cuestiones éticas absolutamente indispensables en este tipo de investigación y propuestas de aplicación biomédica.

Todo parece indicar que la investigación médica se verá beneficiada y la ingeniería de tejidos potenciada por la introducción de la impresión 3D de código abierto, no solo en lo que a los costos se refiere sino en la interacción trans y multidisciplinar de profesionales y por supuesto por la posibilidad de generar ideas cada vez más creativas de investigación en todos las líneas que atañe a este conocimiento.

M. en Ing. Felipe de Jesús Mondragón Serrano
Programa de Doctorado en Desarrollo Científico y Tecnológico para la Sociedad, CINVESTAV

Dra. América Padilla Viveros
Programa de Doctorado en Desarrollo Científico y Tecnológico para la Sociedad, CINVESTAV

Dr. José Víctor Calderón Salinas
Laboratorio de Bioquímica Médica,
Departamento de Bioquímica CINVESVAV
Editor en Jefe, Revista de Educación Bioquímica

¿CÓMO CONTROLAN LAS LEGUMINOSAS EL NÚMERO DE NÓDULOS PARA EVITAR COMPROMETER SU CRECIMIENTO Y DESARROLLO?*

Maríel C. Isidra-Arellano^{1, 2} y Oswaldo Valdés-López^{1**}

¹Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, 54090, México

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México. **Autor de correspondencia correo E: oswaldovaldesl@unam.mx

RESUMEN

Las leguminosas tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios). El establecimiento de esta simbiosis no sólo permite a las leguminosas crecer en suelos deficientes de nitrógeno, sino que también permite incorporar nitrógeno asimilable (e.g., amonio) para los posteriores cultivos a través de cultivos rotatorios. Obtener nitrógeno asimilable a través de la simbiosis con rizobios, implica un gran gasto energético para la leguminosa. Para evitar comprometer su desarrollo, las leguminosas han desarrollado programas genéticos que les permiten continuar esta simbiosis sin comprometer sus necesidades metabólicas. En esta revisión, se discuten los avances que se han hecho para entender los mecanismos genéticos que permiten a las leguminosas realizar simbiosis con rizobios sin comprometer su desarrollo. Asimismo, proponemos perspectivas que fomentan el pensamiento crítico y que conllevarán al planteamiento de experimentos que ayuden a comprender de forma integral las adaptaciones que han tenido las leguminosas para mantener la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno a través del tiempo.

ABSTRACT

Legumes can engage in symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. This symbiosis allows legumes to grow with little to no nitrogen fertilizers inputs and replenishes the soil with fixed nitrogen (e.g., ammonium) for subsequent crops through crop rotation. Symbiotic nitrogen fixation is an energy-demanding process for the legume host. Because of the high carbon demand, legumes tightly regulate the number of rhizobial infections and the number of nodules per plant. Here, we review the state-of-the-art of genetic programs underlying the fine regulation of the number of nodules in legumes. We also raise different questions that must be experimentally validated to understand better how legumes have retained through their evolution the ability to engage in symbiosis with nitrogen-fixing bacteria without hampering their growth and development.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones benéficas entre plantas y microorganismos ha tomado gran relevancia desde la década pasada. Lo anterior se debe a que muchas de estas relaciones mutualistas optimizan diversos procesos fisiológicos de la planta y contribuyen a su adaptación al ambiente (1). Debido a su importancia ecológica, la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) es una de las simbiosis que se ha

estudiado detalladamente. La FSN se lleva a cabo entre plantas leguminosas [e.g., frijol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*), chícharo (*Pisum sativum*) y alfalfa (*Medicago sativa*)] y bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobios, pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, entre otros. Esta simbiosis se caracteriza por la formación de órganos especializados en las raíces denominados nódulos (2). En estos órganos, los rizobios fijan el nitrógeno

PALABRAS

CLAVE:

Autorregulación de la Nodulación, rizobios, simbiosis, péptidos CLE.

KEY WORDS:

Autoregulation of Nodulation, rhizobia, symbiosis, CLE peptides.

atmosférico en formas asimilables (e.g., amonio y aminoácidos) que pueden ser incorporadas al metabolismo de la leguminosa hospedera, la cual, a su vez, les provee un ambiente hipóxico y fuentes de carbono (2). Gracias a esta simbiosis, las leguminosas son capaces de crecer en suelos deficientes de nitrógeno sin necesidad de agregar fertilizantes sintéticos. Además, a través de esta simbiosis, el nitrógeno atmosférico es incorporado en formas asimilables al suelo, y en consecuencia a la cadena alimentaria. Por lo anterior, la manipulación de esta simbiosis ha sido considerada como una estrategia para reducir el uso de fertilizantes sintéticos y la emisión de gases de efecto invernadero que se generan durante su manufactura (3-5).

¿Cómo las leguminosas establecen simbiosis con rizobios?

El principal requisito para que las leguminosas establezcan simbiosis con rizobios es que la disponibilidad de nitrógeno asimilable en el suelo sea baja o nula. Ante este escenario, la leguminosa "solicita" ayuda a los rizobios que se encuentran en la rizósfera, lo cual lo hace a través de un diálogo molecular. Esta comunicación se da a través del intercambio de moléculas señales difusibles generadas por ambos simbioses (Figura 1a). A través de estudios genéticos en las leguminosas modelo *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, se ha demostrado que este diálogo

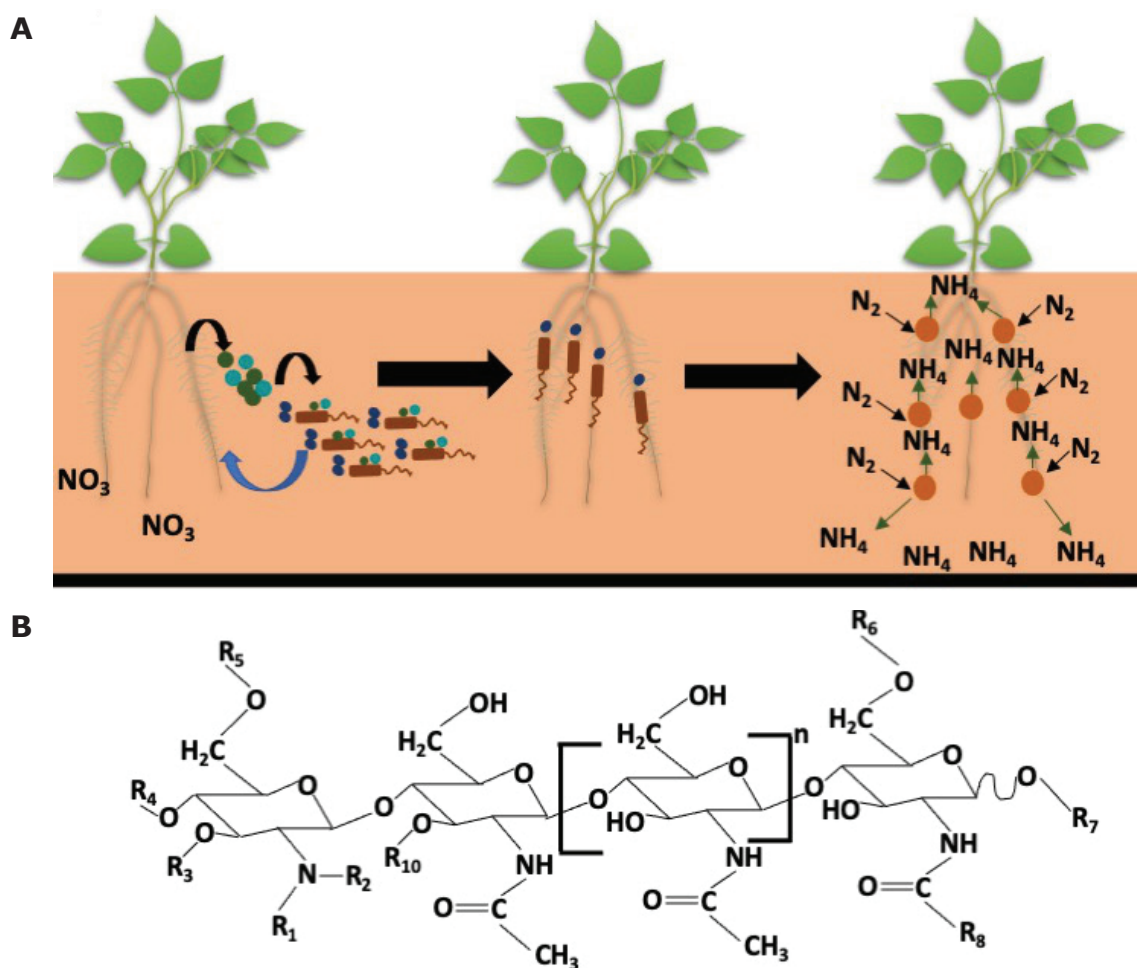


Figura 1. Comunicación molecular entre leguminosas y rizobios. (A) Ante una deficiencia de nitrógeno, las leguminosas secretan flavonoides e isoflavonoides (círculos verdes) a la rizósfera. Estas moléculas señal son detectados por los rizobios, quienes, en respuesta, secretan lipoquitooligosacaridos con diferentes decoraciones químicas, los cuales se denominan Factores de Nodulación (círculos en azul marino). En este primer paso, los rizobios son quimioatraídos a los pelos radicales en donde los Factores de Nodulación son detectados por la leguminosa. La decodificación de esta señal bacteriana activa en la planta diversos programas genéticos que permiten el establecimiento de una simbiosis. El producto final de esta simbiosis es la formación de nódulos, en donde los rizobios fijan el nitrógeno atmosférico (e.g., NH_4) a cambios de fuentes de carbono. El nitrógeno fijado es incorporado al metabolismo de la leguminosa y al suelo. (B) Estructura general de los Factores de Nodulación. La identidad química de sus grupos funcionales (R_1 - R_{10}) y su grado de oligomerización (n) es determinado por la especie del rizobio.

molecular es indispensable para activar programas genéticos en la leguminosa hospedera, los cuales son requeridos para coordinar el proceso de infección/colonización rizobial y el desarrollo de los nódulos (6-7). El diálogo molecular inicia cuando la leguminosa secreta flavonoides a la rizósfera. Estas moléculas quimio-atraen a los rizobios hacia la parte apical de los pelos radicales (Figura 1a) (6-7). En respuesta, el rizobio sintetiza y secreta lipo-quitoooligosacáridos químicamente decorados, denominados Factores de Nodulación (FNs) (Figura 1b) (8). Los FNs son detectados en los pelos radicales a través receptores heterodiméricos tipo cinasa, tales como NFR5 (siglas en inglés de "Nod Factor Receptor 5), NFR1 (siglas en inglés de Nod Factor Receptor 1), así como por el receptor NFR_e (siglas en inglés de Nod Factor Receptor epidermal) (Tabla 1) (9). Una vez detectados los FNs, se activa una serie de eventos moleculares, entre los que destacan oscilaciones en las concentraciones de Ca²⁺ en el núcleo, fosforilación de proteínas y activación de la expresión de genes simbióticos (e.g.,

CYCLOPS, NIN, NF-YA, ERN1) (Figura 2a) (9).

Las respuestas moleculares anteriormente descritas forman parte del primer programa genético, el cual controla las etapas iniciales de esta simbiosis, incluyendo el proceso de colonización/infección rizobial. Este programa regula principalmente la reorganización del citoesqueleto del pelo radical, lo cual permite que éstos se deformen y atrapen al rizobio (Figura 2b). Subsecuentemente, ocurre la invaginación de la pared celular y membrana plasmática del pelo radical, lo cual da paso a la formación de una estructura tubular denominada hilo de infección (Figura 2b). A través del hilo de infección, los rizobios son guiados y liberados en las células del córtex de la raíz. En paralelo, estas células corticales se activan y empiezan a dividirse formando un nuevo meristemo, el meristemo nodular, a partir del cual se formará el nódulo (Figura 2b) (9). Estas divisiones celulares están coordinadas por un segundo programa genético que permite la formación y desarrollo de nódulos (Figura 2b).

TABLA 1. Genes de plantas con función en la simbiosis leguminosa-rizobio

Gen	Nombre	Función en la simbiosis
<i>NFR5</i>	Nod Factor Receptor 5	Receptor de los Factores de Nodulación
<i>NFR1</i>	Nod Factor Receptor 1	Receptor de los Factores de Nodulación
<i>NFR_e</i>	Nod Factor Receptor epidermal	Receptor de los Factores de Nodulación
<i>CYCLOPS</i>	CYCLOPS	Activa el proceso de infección rizobial
<i>NIN</i>	Nodule Inception	Controla cada etapa de la simbiosis
<i>NF-YA</i>	Nuclear transcription factor Y subunit A	Activa el proceso de infección rizobial y desarrollo de nódulos
<i>ERN1</i>	"Ethylene Response Factor Required for Nodulation1"	Activa el proceso de infección rizobial
<i>LHK1</i>	Lotus Histidine Kinase 1	Activa el proceso de formación de nódulos
<i>NIC1</i>	Nitrogen Induced CLE peptide 1	Péptido señal
<i>NRSYM1</i>	Nitrate Unresponsive Symbiosis 1	Regula el número de nódulos
<i>CLE35</i>	CLAVATA3-Endosperm Surrounding Region35	Péptido móvil que activa la AON en condiciones óptimas de nitrógeno
<i>CEP1</i>	C-Terminally Encoded Peptide 1	Péptido móvil que activa el proceso de formación de nódulos
<i>CRA2</i>	Compact Root Architecture 2	Receptor que percibe al péptido CEP1
<i>RIC1</i>	Rhizobia Induced CLE peptide 1	Péptido móvil que activa la AON
<i>RIC2</i>	Rhizobia Induced CLE peptide 2	Péptido móvil que activa la AON
<i>NARK</i>	Nodulation Autoregulation Receptor Kinase	Receptor los péptidos RIC1 y RIC2
<i>PHR1</i>	Phosphate Starvation Response1	Factor de transcripción que regula el número de nódulos en condiciones deficientes de fósforo

La información mostrada en esta tabla fue extraída de las referencias 9 y 36 de este artículo.

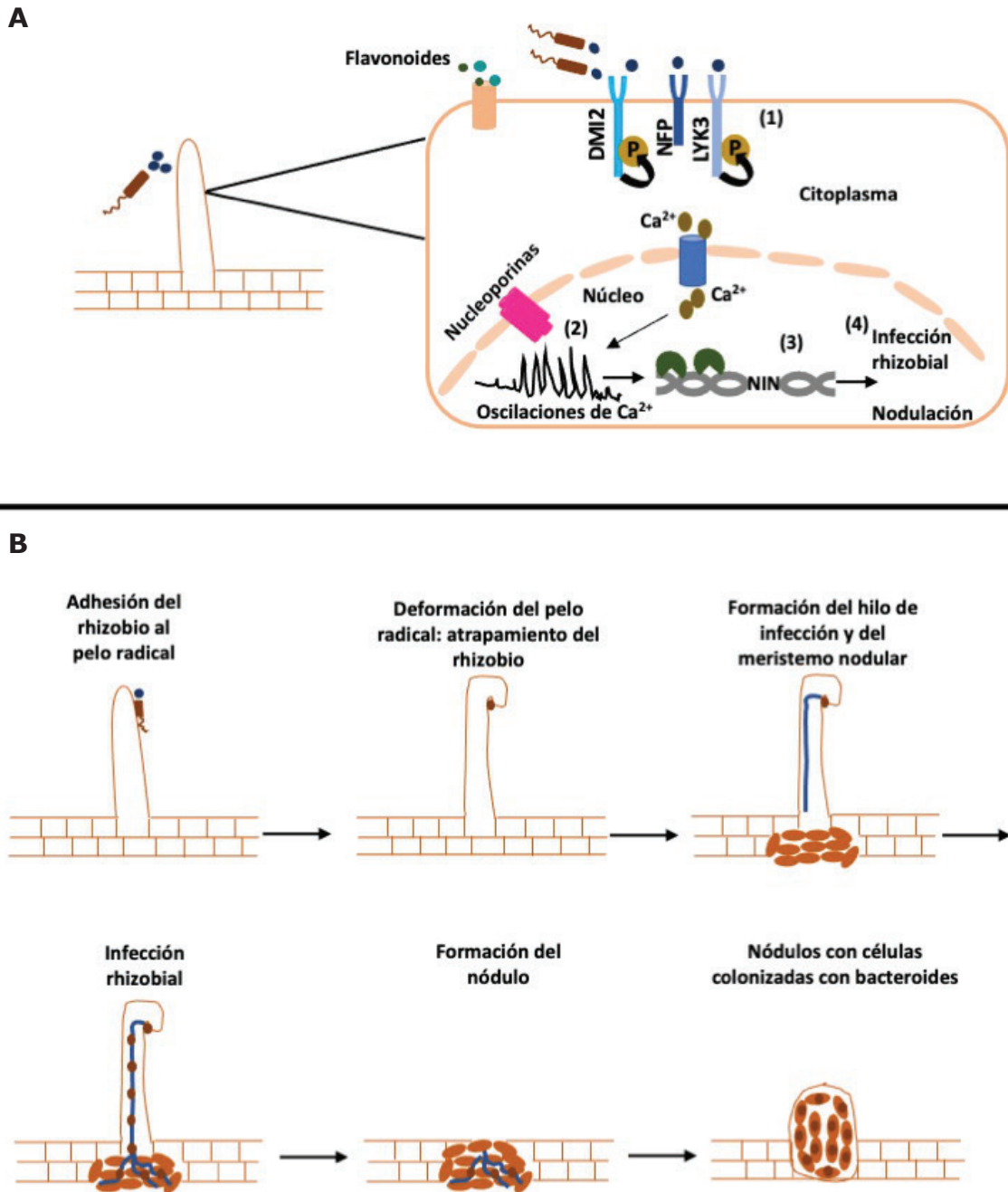


Figura 2. Decodificación de la señal emitido por los rizobios a través de los Factores de Nodulación. (A) Uno de los primeros eventos del dialogo molecular entre leguminosas y rizobios es la detección de los Factores de Nodulación a través de receptores (NFP y LYK3) y co-receptores (DMI2) membranales. La detección de los Factores de Nodulación activa una serie de eventos moleculares, que incluye la fosforilación de proteínas y oscilaciones de calcio nuclear (Ca^{2+}). La decodificación de las oscilaciones de Ca^{2+} es necesaria para la activación de diversos factores de transcripción (e.g., NIN) que, a su vez, son necesarios para activar los programas de infección rizobial y desarrollo de los nódulos. (B) Uno de los programas genéticos que se activa después de decodificar las oscilaciones de Ca^{2+} es el que está relacionado con el proceso de infección rizobial. Este proceso inicia cuando el rizobio es adherido al pelo radical. Posteriormente, el pelo radical se deforma para dar paso a la formación de una cámara de infección, en donde el rizobio es "atrapado". En seguida, en la cámara de infección se forma una invaginación que prolonga a través del interior celular del pelo radical hasta llegar a la primera capa de la epidermis de la raíz. Esta invaginación de la pared celular y la membrana plasmática del pelo radical se le denomina hilo de infección. A la par de la formación del hilo de infección, las células corticales de la raíz experimentan mitosis y desdiferenciación celular, lo cual permite la formación del meristemo nodular. A través del hilo de infección, el cual se ramifica al llegar a las células del meristemo nodular, los rizobios viajan hasta las células que darán origen al nódulo y en donde serán albergadas para fijar nitrógeno atmosférico.

¿Cómo se forman los nódulos?

El desarrollo del nódulo está coordinado por tres procesos que ocurren simultáneamente: infección rizobial, organogénesis, y autorregulación del número de nódulos. Basados en la persistencia del meristemo nodular, existen dos tipos de nódulos, el primero es el tipo indeterminado, el cual mantiene su meristemo durante toda la simbiosis. Los

nódulos indeterminados son característicos de leguminosas de climas templados como la alfalfa, *M. truncatula*, y los chícharos (Figura 3). El segundo tipo de nódulos son los determinados, en los cuales el meristemo es transitorio y desaparece en nódulos maduros. Los nódulos determinados tienen una forma esférica, y son característicos de leguminosas de climas cálidos, como el frijol, soya y *L. japonicus* (Figura 3).

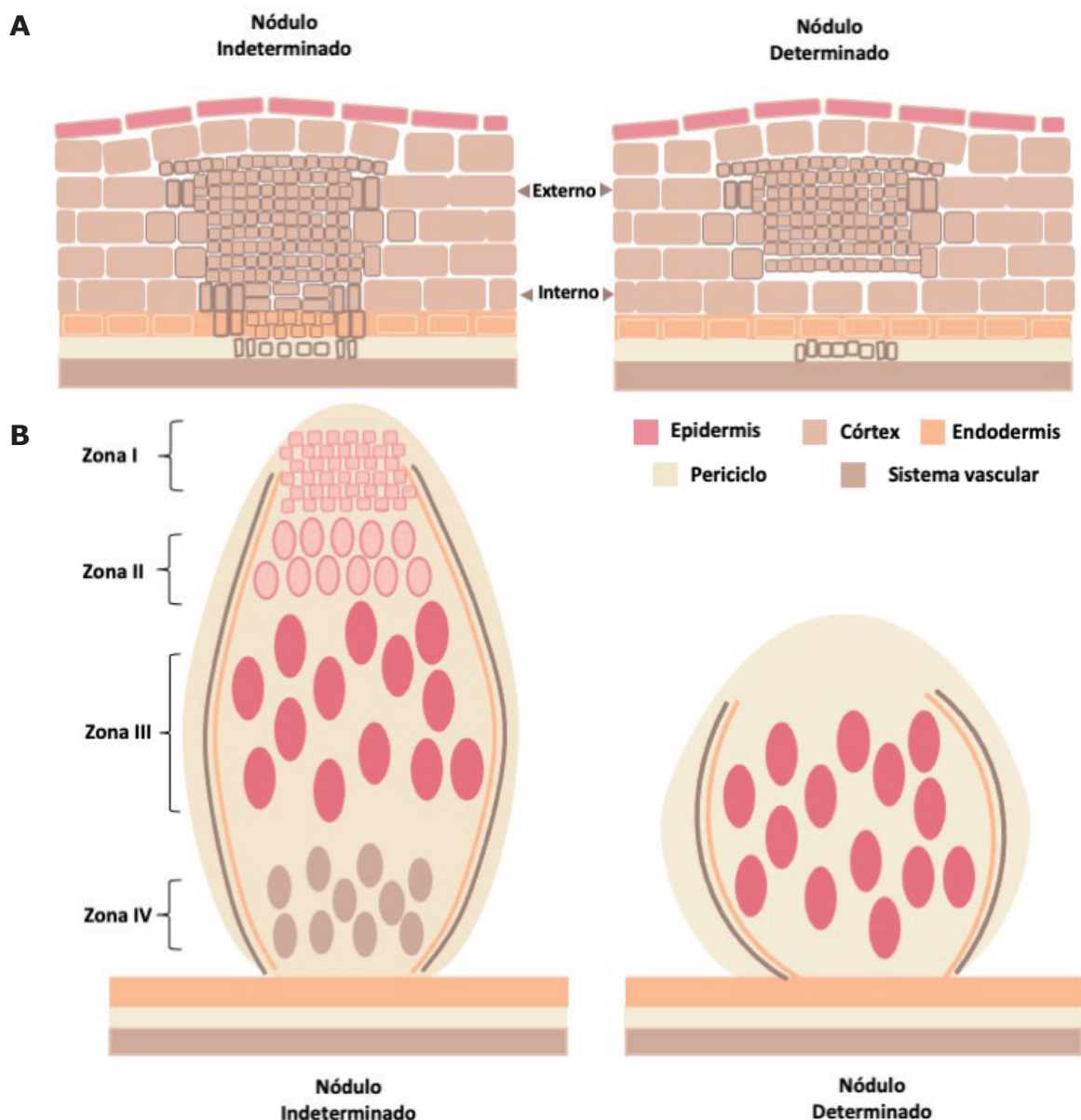


Figura 3. Formación y tipos de nódulos. (A) El desarrollo de nódulos inicia con divisiones de las células del periciclo y se extienden a las células del córtex. De acuerdo con la persistencia del meristemo nodular, existen dos tipos de nódulos: indeterminados, los cuales se forman a partir de células del córtex interno, y se caracterizan por mantener su meristemo durante toda la simbiosis. El segundo tipo de nódulos es el determinado, los cuales se desarrollan a partir del córtex medio y externo, y además carecen de meristemo en su etapa funcional. (B) Adicionalmente, los nódulos indeterminados maduros poseen una forma alargada y diferentes zonas bien diferenciadas: meristemo (zona I), zona de infección (zona II), zona de fijación de nitrógeno (zona III), y zona de senescencia (zona IV). En comparación los nódulos determinados maduros poseen una forma predominantemente esférica y se componen de una sola zona donde ocurre la fijación de nitrógeno.

El programa genético encargado del desarrollo y formación de los nódulos se activa simultáneamente a la formación del hilo de infección. El desarrollo de este órgano simbiótico se da mediante el reclutamiento de una parte del programa genético que participa en el desarrollo de las raíces laterales. Por lo anterior, los nódulos son considerados como modificaciones de las raíces laterales en plantas leguminosas. De acuerdo con estudios en *M. truncatula* y *L. japonicus*, al igual que las raíces laterales, la organogénesis del nódulo inicia con divisiones mitóticas en el periciclo de la raíz (Figura 3a). Posteriormente, se llevan a cabo subsecuentes planos de divisiones celulares en el córtex, las cuales son limitadas en la formación de las raíces laterales. Aunque este proceso celular es requerido para la formación de los dos tipos de nódulos, los indeterminados son formados a partir de células del córtex interno, mientras que los nódulos determinados lo hacen a partir del córtex medio y externo. Los tejidos de los nódulos se componen de córtex externo, endodermis cortical, haces vasculares, y córtex interno, este último es colonizado por los rizobios que son transportados en el hilo de infección (Figura 3a).

En nódulos indeterminados maduros, el córtex interno se divide en cuatro zonas de desarrollo: meristemo (zona I), zona de infección (zona II), zona de fijación de nitrógeno (zona III), y zona de senescencia (zona IV) (Figura 3b). En el caso de nódulos determinados maduros, el córtex interno se compone de una sola zona, la de fijación de nitrógeno, la cual eventualmente se convierte en la zona de senescencia (Figura 3b). Para que cada uno de los tejidos y zonas del nódulo se formen, las células del periciclo, endodermis y las capas C5 y C3 del córtex experimentan sucesivas divisiones anticlinales y periclinales.

Para poder albergar a los rizobios, las células que formarán parte de la zona de infección pasan por un proceso denominado endoreduplicación, en el cual el DNA se replica sin la necesidad de activar la división celular, y se convierten en células poliploides alargadas. A la par de este proceso, las células poliploides son colonizadas por rizobios que provienen del hilo de infección. Conforme los rizobios son liberados en las células poliploides, los rizobios son recubiertos por una membrana de origen vegetal y son internalizados en estructuras denominadas simbiosomas. Subsecuentemente, los rizobios pierden su pared celular, endoreduplican su material genético, y experimentan cambios en su morfología para formar células largas e irregulares denominadas bacteroides (9).

Para que los bacteroides fijen nitrógeno, es necesario que activen la expresión de los genes

de fijación de nitrógeno, comúnmente conocidos como genes *nif*, que codifican para el complejo nitrogenasa (Figura 4a) (Tabla 2). Este complejo metaloenzimático se compone de la proteína catalítica denominada dinitrogenasa, y de la proteína donadora de electrones dependiente de ATP denominada dinitrogenasa reductasa (Figura 4b). El dominio catalítico de la dinitrogenasa contiene un cofactor molibdeno-hierro (Mo-Fe), el cual es fácilmente disociado por oxígeno. Por lo anterior, para que el complejo nitrogenasa fije el nitrógeno atmosférico, es necesario que en los nódulos existan bajas concentraciones de oxígeno para evitar la inactivación de esta metaloenzima. Este ambiente hipóxico se genera cuando en el nódulo se activan genes que codifican para hemoglobinas vegetales denominadas leghemoglobinas. Estas proteínas, al igual que las hemoglobinas de animales, transportan oxígeno y permiten que la nitrogenasa funcione.

Costo energético de la simbiosis con rizobios

Durante la simbiosis leguminosa-rizobio se ejerce un constante intercambio de nutrientes y fuentes de carbono. La eficiencia de este intercambio es crítica para mantener la simbiosis. Por ejemplo, el aporte de diferentes nutrimentos minerales (e.g., fósforo: P; hierro: Fe; y molibdeno: Mo) y de fuentes de carbono, principalmente en forma de fotosintatos, es fundamental para que los bacteroides obtengan la energía necesaria para la síntesis y ensamblaje del complejo nitrogenasa, así como para que este ensamble enzimático pueda reducir el N₂ atmosférico en formas asimilables (10). Al garantizar estos beneficios energéticos y nutrimentales, los bacteroides fijan el N₂ atmosférico en amonio o ureidos (Figura 5). Estas moléculas nitrogenadas son transportadas al citoplasma de las células vegetales y a través del ciclo Glutamino sintetasa-Glutamato sintetasa son incorporados a aminoácidos. Finalmente, estos aminoácidos son exportados hacia los diferentes órganos de la planta (9).

Si se considera cada uno de los eventos moleculares que se requieren para mantener funcional la FSN, esta forma de obtener nitrógeno asimilable resulta altamente costosa para las leguminosas. Por ejemplo, para fijar una molécula de N₂ atmosférico se requiere la inversión de 16 moléculas de ATP (10). Sin embargo, existen otros procesos asociados a la FSN que demandan energía, como el ensamblaje del complejo nitrogenasa, el aporte de poder reductor, y el reciclado de los residuos tóxicos de dihidrógeno resultantes del proceso de fijación de nitrógeno. En consecuencia, el costo energético total de la FSN asciende a 30 ATPs

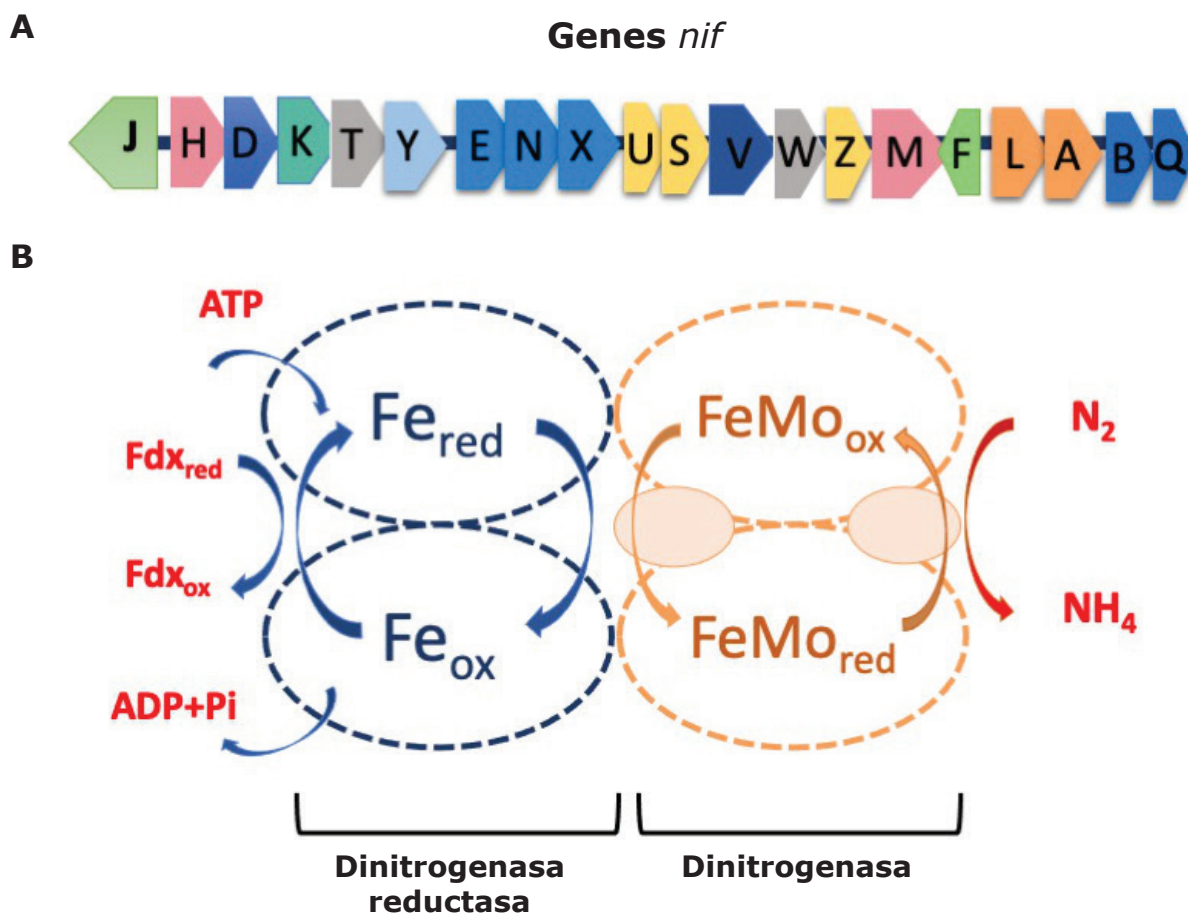


Figura 4. Genes *nif* importantes para definir la estructura y función del complejo nitrogenasa. (A) El complejo nitrogenasa es codificado por 20 genes de fijación de nitrógeno (*nif*, de las siglas en inglés) del genoma bacteriano. La expresión de estos genes se induce una vez que el rizobio se localiza dentro de las células vegetales y se diferencia a bacteroide. Estos 20 genes *nif* codifican para cada uno de los componentes de la nitrogenasa, así como reguladores de su función. (B) La enzima nitrogenasa es un complejo metaloenzimático que se compone de la proteína catalítica denominada dinitrogenasa, y de la proteína donadora de electrones dependiente de ATP denominada dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa, también conocida como proteína MoFe o componente I, es un tetrámero de 220 a 240 kilodaltones (kDa) codificada por los genes *NifD* y *NifK*. Este tetrámero contiene un complejo metálico compuesto de los cofactores Fe y Mo. La dinitrogenasa reductasa, también conocida como proteína Fe o componente II, es un dímero de 60-KDa codificada por el operón *nifHDK*. Este dímero contiene un solo complejo 4Fe-4S y dos sitios de unión a Mg-ATP. Esta subunidad dona electrones a la dinitrogenasa para fijar el nitrógeno atmosférico en amonio. En la tabla 2 de este artículo se resume la función de cada uno de los genes *nif*.

para fijar una molécula de N_2 atmosférico (10). Este alto gasto energético obliga a la leguminosa a controlar el número de nódulos para evitar un excesivo gasto energético que comprometa su óptimo desarrollo y, de ser el caso, la productividad agrícola (11). Esta regulación se realiza a través de la vía de señalización denominada Autorregulación de la Nodulación (AON, siglas en inglés), la cual restringe el número de nódulos formados (11).

A pesar de que en los últimos años se han descrito algunos de los componentes genéticos de la AON, aún se desconoce parte de los genes que son regulados en esta vía y los cuales son determinantes para controlar el número de nódulos. En los siguientes apartados de esta revisión, se analizan

los avances más significativos de los últimos años relacionados con el control del número de nódulos desarrollados durante la simbiosis, así como los modelos que explican este fenómeno y que se han propuesto hasta el momento.

¿Cómo se activa la AON?

La AON no solo restringe la formación de nódulos, sino que también es fundamental para controlar el aporte energético destinado a la FSN. Esta vía de señalización se activa a la par del proceso de infección rizobial y cuando las células corticales de la raíz se dividen para formar el meristemo nodular. El inicio de la AON se caracteriza por la producción

TABLA 2. Genes de plantas con función en la simbiosis leguminosa-rizobio

Gen	Función
<i>nifH</i>	Participa en la biosíntesis del cofactor FeMo y en la maduración de la Dinitrogenasa
<i>nifD</i>	Codifica par la subunidad α de la Dinitrogenasa
<i>nifK</i>	Codifica par la subunidad β de la Dinitrogenasa
<i>nifT</i>	Función desconocida
<i>nifY</i>	Inserta el cofactor FeMo en la Dinitrogenasa
<i>nifE</i>	Forma el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de la Dinitrogenasa
<i>nifN</i>	Junto con NifE Forma el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de la Dinitrogenasa
<i>nifX</i>	Participa en la biosíntesis del cofactor FeMo
<i>nifU</i>	Participa en la biosíntesis del cluster Fe-S de la Dinitrogenasa reductasa
<i>nifS</i>	Participa en la movilización de S al cluster Fe-S
<i>nifV</i>	Homocitrato involucrada en la biosíntesis del cofactor FeMo
<i>nifW</i>	Estabiliza la Dinitrogenasa reductasa
<i>nifZ</i>	Función desconocida
<i>nifM</i>	Participa en la maduración de NifH
<i>nifF</i>	Flavodoxina que dona electrones a la Dinitrogenasa reductasa
<i>nifL</i>	Regulador negativo del complejo nitrogenasa
<i>nifA</i>	Regulador positivo del complejo nitrogenasa
<i>nifB</i>	Dona Fe y S al cofactor FeMo
<i>nifQ</i>	Participa en la biosíntesis del complejo FeMo
<i>nifJ</i>	Flavoredoxina oxireductasa que dona electrones

Fe: Hierro; S: Azufre; Mo: Molibdeno. Información detallada acerca del ensamblaje del complejo nitrogenasa puede encontrarse en las referencias 37, y 38 de este artículo.

en la raíz de moléculas señales móviles que permiten una comunicación constante con el vástago (tallo y hojas), la cual es necesaria para coordinar los eventos moleculares que conllevan a la inhibición de la formación del nódulo (Figura 6) (11). En esta primera etapa, el factor de transcripción NIN (siglas en inglés de Nodule Inception) juega un papel determinante en la activación de la AON (12). Se ha demostrado que, en esta etapa, *NIN* se expresa en el periciclo de la raíz, en donde promueve la transcripción de dos genes que codifican para péptidos de la familia CLE (siglas en inglés de "CLAVATA3-Endosperm Surrounding Region": CLE) (11, 13). Puesto que la activación transcripcional de estos dos genes se da en respuesta a rizobio, éstos son denominados como *RIC1* y *RIC2* (siglas en inglés de *Rhizobia Induced CLE peptide 1 y 2*) en frijol y soya, *CLE-RS1/CLE-RS2* en *L. japonicus* y *CLE12/CLE13* en *M. truncatula* (11) (Figura 6). Estos péptidos derivan de precursores de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y mediante un procesamiento proteolítico surgen cadenas de péptidos de 12-13 aminoácidos (14-16). Los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13*

maduros son transportados vía xilema hacia la parte aérea de la planta y son percibidos por un receptor tipo cinasa conocido en frijol y soya como "Nodulation Autoregulation Receptor Kinase" (NARK), "Hypernodulation and Aberrant Root Formation1" (HAR1) en *L. japonicus* y "Super Numeric Nodules" (SUNN) en *M. truncatula* (Figura 6) (11,17,18). La importancia de la percepción y decodificación del mensaje de los péptidos *RIC1/2* en la AON ha sido demostrada en las mutantes *nark/har1/sunn* las cuales exhiben fenotipos de supernodulación debido a que no pueden restringir el número de nódulos (11).

Con base a estudios de injertos entre el tallo de una leguminosa silvestre (capaz de detectar los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13*) y raíces de mutantes *nark/har1/sunn*, y viceversa, se ha sugerido que la percepción de estos péptidos activa la biosíntesis de una señal regulatoria. Sin embargo, la identidad química de esta molécula señal derivada del tallo aún es cuestión de debate (11). Se ha especulado que esta molécula señal producida en el tallo viaja vía floema hacia la raíz de la leguminosa, en donde

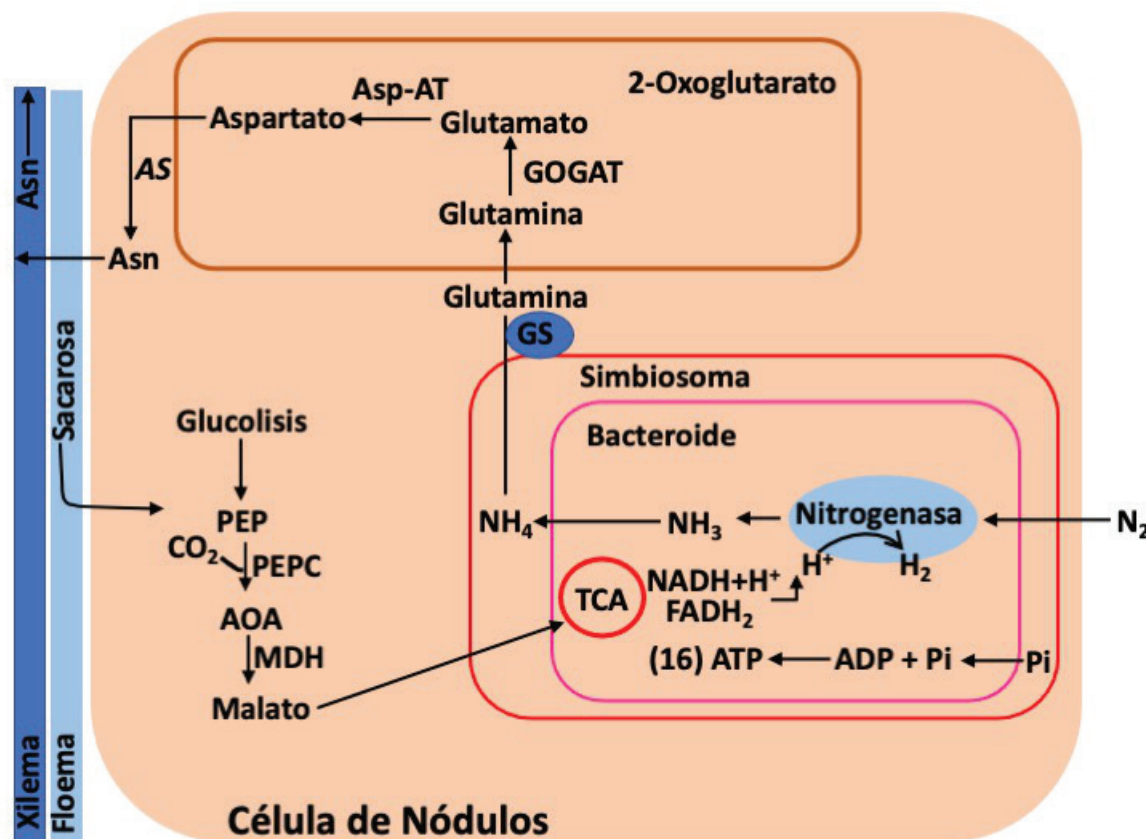


Figura 5. Fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico. Una vez ensamblado el complejo nitrogenasa, se requiere la inversión de la cual de 16 moléculas de ATP y poder reductor en forma de NADH y FADH₂ para fijar una molécula de nitrógeno atmosférico en formas asimilables para la leguminosa (e.g., NH₄). El nitrógeno fijado es translocado a células del nódulo no infectadas, en donde es incorporado al ciclo metabólico Glutamina Sintetasa (GS) – Glutamato Sintetasa (GOGAT). Los productos derivados de este ciclo metabólico (e.g., Asn) son translocados al xilema para ser transportados a los diferentes órganos de la leguminosa.

activa un programa genético que inhibe la formación de nódulos (11). En los últimos años se han realizado diversos esfuerzos para descubrir la identidad química de la señal inhibitoria que viaja de la parte aérea hacia la raíz. Al respecto, se ha propuesto que esta molécula señal puede ser la fitohormona citocinina 6-bencilaminopurina ó transzeatina, de las cuales se ha observado que en altas concentraciones inhiben la actividad meristemática en las raíces. Además, en *L. japonicus* también se demostró que un aumento en la producción de estas citocininas inhibe la formación de nódulos (19-20). Por lo anterior, se ha propuesto que este grupo de fitohormonas puede jugar un papel en la AON. Además de la citocininas, también se ha propuesto que el microRNA (miRNA) miR2111 podría ser la señal derivada del tallo y que inhibe la formación de nódulos. En respuesta a la baja disponibilidad de nitrógeno y, en cierto nivel, a la inoculación con rizobios, este miRNA se sintetiza y madura en las células acompañantes del floema y

de allí viaja a las raíces. Sin embargo, evidencias recientes indican que la producción de miR2111 es necesaria para activar el proceso de formación y desarrollo de nódulos y no para inhibirla (Figura 6) (21-22). Inclusive, existen evidencias que indican que una vez que los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13 son detectados por el receptor NARK/HAR1/SUNN la producción y exportación de miR2111 se inhibe (21-22). Por lo anterior, miR2111 no puede ser considerado como la molécula señal producida en el tallo para inhibir la nodulación (Figura 6).

A pesar de que se desconoce la identidad química de la molécula señal generada en el tallo, evidencias en diferentes leguminosas indican que esta señal activa la transcripción del gen “*Too Much Love*” (*TML*). *TML* codifica para una ubiquitina E3 ligasa de la familia proteica “Kelch repeat-containing F-box” con dos péptidos señal para localización nuclear. En respuesta a rizobios, se induce la expresión de *TML* en meristemos nodulares y en

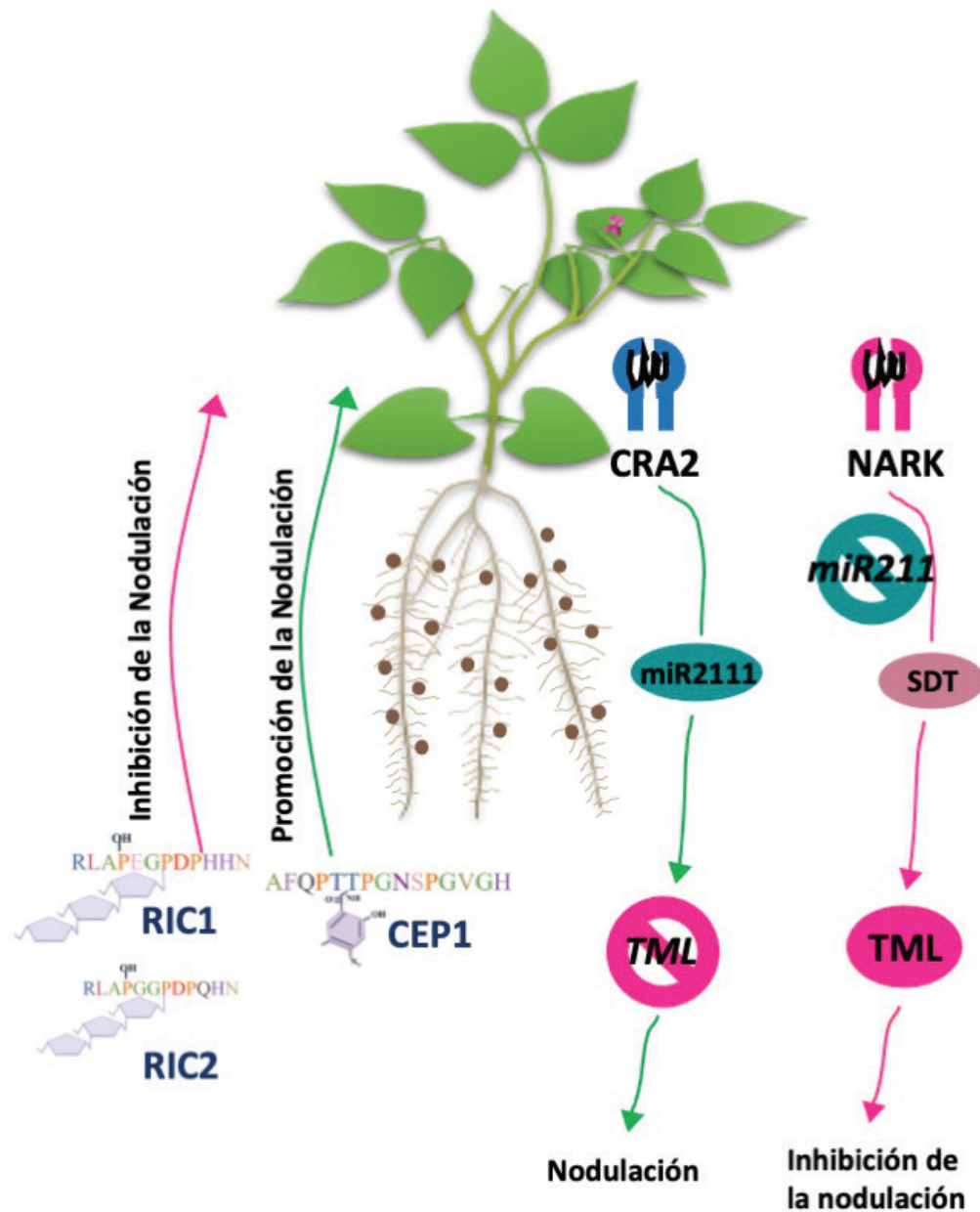


Figura 6. Vías de señalización que controlan la formación de nódulos en leguminosas. Ante una deficiencia de nitrógeno, las leguminosas sintetizan en la raíz los péptidos CEP1, los cuales son transportados vía xilema a la parte aérea de la planta y son detectados por el receptor CRA2. Una vez detectados, inducen la expresión del microRNA miR2111, el cual es transportado vía floema a la raíz, donde provoca el corte y posterior degradación del RNAm de TML. Como resultado, la leguminosa puede iniciar la formación de nódulos. Para evitar que la fijación simbiótica de nitrógeno comprometa el crecimiento y desarrollo de la leguminosa, a la par de las primeras divisiones celulares en el córtex de la raíz, en ella se sintetizan los péptidos RIC1 y RIC2, los cuales son transportados vía xilema a la parte aérea y en donde son censados por el receptor NARK. En respuesta, se genera una molécula señal de identidad química desconocida (SDT: Señal Derivada del Tallo). La SDT es transportada vía floema a la raíz, en donde de alguna forma se evita que TML sea degradado en el RISC. De alguna forma que aún no se ha determinado, TML inhibe la formación de nódulos.

nódulos maduros (23). Interesantemente, leguminosas mutantes *tml* desarrollan un fenotipo de supernodulación (23). Por lo anterior, se ha propuesto que TML es un regulador negativo de la formación de nódulos y un componente esencial de la AON (Figura 6). Puesto que miembros de la

familia proteica "Kelch repeat-containing F-box" participan en la ubiquitinación de proteínas y que TML se localiza en el núcleo, se ha propuesto que TML puede regular factores de transcripción relacionados con la formación de nódulos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce que proteínas son

poliubicuitinadas por TML. Por lo anterior, aún se requiere experimentación adicional, orientada a determinar el mecanismo preciso que juega TML en la regulación negativa en la formación de nódulos mediada por la AON.

Evidencias recientes han demostrado que el gen *TML* es regulado postranscripcionalmente por miR2111 (21-22). Al respecto, se ha demostrado que cuando las leguminosas experimentan bajos niveles intracelulares de nitrógeno, y están interactuando con rizobios, en la raíz se sintetiza el péptido "C-Terminally Encoded Peptide 1" (CEP1). CEP1 viaja vía xilema a la parte aérea de la planta donde es detectado por el receptor "Compact Root Architecture 2" (CRA2) (Figura 6) (24-25). Posterior a la detección de CEP1 se genera una señal sistémica que viaja vía floema a las raíces para activar la formación de nódulos (24-25). Diversas evidencias indican que esta señal es miR2111, por lo que se ha propuesto que CRA2 activa la biosíntesis de miR2111 (Figura 6). Además, la sobreexpresión de miR2111 causa una disminución significativa de los niveles de TML y un fenotipo de supernodulación en *L. japonicus* y *M. truncatula* (21-22). Por lo anterior, se ha propuesto que una vez en las células corticales de la raíz, miR2111 interacciona con el mRNA de *TML* y promueve su degradación en el complejo de silenciamiento inducido por RNAs (RISC). Se ha especulado que la ausencia de la proteína TML permite que diversos factores de transcripción activen la expresión de genes involucrados en la formación de nódulos. Estas evidencias no sólo confirman el papel que juega TML en la AON, sino que también confirman que miR2111 es una señal sistémica promotora de la nodulación.

Autorregulación de la infección (AOI)

La formación excesiva de nódulos es el fenotipo que caracteriza a las mutantes *nark1/har1/sunn* y *tml* (11). Sin embargo, análisis detallados revelan que estas dos mutantes también muestran una excesiva formación de hilos de infección (11). Esta observación indica que la AON inhibe dos procesos genéticos altamente coordinados que ocurren en tiempos y en tipos celulares (epidermis y córtex) diferentes. Por lo anterior, la AON no sólo regula negativamente el programa genético encargado de la formación de nódulos, sino que también inactiva el programa genético que promueve la infección rizobial.

El análisis detallado de las mutantes *nark1/har1/sunn* y *tml* también reveló la existencia de una vía de señalización encargada de regular el número de infecciones a la cual se le ha denominado Autorre-

gulación de la Infección (AOI, siglas en inglés) por rizobios (26). De acuerdo con las observaciones hechas en estas mutantes, se ha planteado que la AOI es regulada por la AON. Hasta el momento se conocen pocos componentes genéticos de la vía AOI. Por ejemplo, se ha demostrado que el receptor de citocininas "Lotus Histidine Kinase 1" (LHK1), el cual se localiza tanto en células epidérmicas, como en el córtex de la raíz, actúa de forma cooperativa con el receptor NARK1/HAR1/SUNN para coordinar las infecciones rizobiales en *L. japonicus* (27). Al respecto, se observó que la doble mutante *lhk1 har1* en *L. japonicus* desarrolla 50% más hilos de infección que las mutantes sencillas y seis veces más que las plantas silvestres. Adicionalmente, el análisis de *lhk1 har1* también reveló que la ausencia de estos dos receptores disminuye considerablemente la expresión de *TML* (27). Estos datos indican que la acción cooperativa de LHK1 y HAR1 es fundamental para restringir la infección rizobial. Evidencias adicionales que apoyan la cooperatividad de la vía AON con la AOI fueron recientemente generadas en *L. japonicus*, donde se demostró que el módulo HAR1-CLE-RS1/2 es necesario para restringir el número de infecciones rizobiales (28).

El hecho de que el receptor LHK1 juegue un papel en la AOI indica que la hormona citocinina también es un elemento clave para regular tanto el proceso de infección como el de formación de nódulos. Sin embargo, estudios recientes en *M. truncatula* indican que el rizobio también juega un papel en la AOI (29). Particularmente en este estudio se demostró que *Sinorhizobium meliloti*, simbionte de *M. truncatula*, una vez dentro de las células del nódulo activa una vía de señalización dependiente de Adenosin 3',5' Monofosfato cíclico (cAMP) que consiste en tres receptores Adenilato Ciclasas (CyaD1, CyaD2, y CyaK), del regulador transcripcional Crp-like dependiente de cAMP y de diferentes genes blanco (29). La activación de esta vía de señalización rizobial conlleva a la producción de un compuesto volátil en raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* y evita futuras infecciones rizobiales (29). Estudios farmacológicos y con plantas mutantes permitieron concluir que este compuesto volátil era etileno, del cual se sabe que en altas concentraciones inhibe la simbiosis entre leguminosas y rizobios (29). Todos estos datos indican que la acción coordinada de las hormonas citocininas y etileno, así como del receptor NARK1/HAR1/SUNN, de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13, así como de TML es fundamental para inactivar el proceso de infección rizobial (Figura 6).

Regulación de la nodulación por disponibilidad de nitrato (NO₃)

Como ya se mencionó anteriormente, la FSN permite a las leguminosas crecer en suelos deficientes de nitrógeno. Sin embargo, el costo energético para la leguminosa por obtener este nutrimento mineral de forma simbiótica es alto. Inclusive, si a través de la actividad de "forrajeo del sistema radical" - concepto usado para describir la actividad del sistema radicular para explorar zonas del suelo que contengan nutrimentos - encuentran en el suelo zonas ricas en nitrógeno asimilable, las leguminosas prefieren obtener este nutrimento por una vía no simbiótica. Ante este escenario, las leguminosas "deciden" no establecer simbiosis con rizobios y evitar un gasto energético innecesario. Estudios en diferentes leguminosas han permitido demostrar que la AON también es necesaria para inhibir la simbiosis con rizobios en condiciones óptimas de nitrógeno. Por ejemplo, en soya se ha demostrado que la alta disponibilidad de NO₃ activa en la raíz la producción del péptido CLE denominado "Nitrogen Induced CLE peptide 1" (NIC1) y CLE35 en *M. truncatula* (30-31). Además, se ha demostrado que el péptido CLE-RS2 se produce en respuesta no solamente a rizobios, sino que también a la disponibilidad de NO₃ en *L. japonicus* (32). A diferencia de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13, el péptido NIC1/CLE-RS2/CLE35 actúa de forma local y es detectado por el receptor NARK que también se expresa en la raíz (30-31). Inclusive, mutantes *nark* en soya son capaces de formar nódulos en presencia de NO₃, demostrando que la percepción de NIC1/CLE-RS2/CLE35 por NARK es determinante para inhibir la nodulación en condiciones óptimas de nitrógeno. Estudios en *L. japonicus* y *M. truncatula* han demostrado que la activación transcripcional de CLERS2/CLE35 es mediada por el factor transcripcional denominado "Nitrate Unresponsive Symbiosis1" (NRSYM1) o "NIN-like Protein1", respectivamente (32). Interesantemente, la sobreexpresión de CLE35 o el tratamiento con NO₃ disminuye significativamente la producción de miR2111 y la formación de nódulos en *M. truncatula* (33). Estas observaciones indican que las leguminosas activan la AON cuando hay disponibilidad de nitrógeno mineral y evaden la simbiosis con rizobios para evitar un gasto energético innecesario.

Regulación de la nodulación por disponibilidad de fósforo

Es bien sabido que la baja disponibilidad de fósforo, el segundo nutrimento mineral más importante

para todos los seres vivos, también conlleva a una disminución en la formación de nódulos y en la FSN en diferentes leguminosas. En los últimos diez años se han hecho avances significativos para entender cómo los nódulos se adaptan a la deficiencia de fósforo. Por ejemplo, se ha documentado que la mayoría de las respuestas metabólicas y transcripcionales de nódulos de frijol, soya y *M. truncatula* están orientadas a la captación, uso eficiente y mantenimiento de la homeostasis del fosfato, única forma molecular en la que las plantas toman el fósforo del suelo (34). Inclusive, se han identificado los componentes moleculares que permiten un aporte constante de fosfato de otros órganos de la planta al nódulo.

Con el propósito de entender los mecanismos genéticos que controlan la simbiosis entre leguminosas y rizobios en condiciones deficientes de fosfato, realizamos estudios fisiológicos (i.e., deformación de pelos radicales, número de nódulos y comunicación sistémica) y transcripcionales en plantas de frijol (35). Estos análisis permitieron demostrar que la deficiencia de fósforo reduce el proceso de infección rizobial, probablemente a través de la activación de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de las fitohormonas etileno, ácidos abscísico y jasmonato, de las cuales se sabe que inhiben esta simbiosis (35). Además, se observó que la deficiencia de fosfato *per se* activa la expresión de los genes *RIC1* y *RIC2* (35-36). Esta observación sugiere que la deficiencia de fosfato activa la AON en ausencia de rizobios, lo cual fue confirmado mediante estudios genéticos y fisiológicos en mutantes *nark* de frijol y soya. Además, también se demostró que el factor de transcripción "Phosphate Starvation Response1" (*PHR1*), el cual es un regulador maestro de las respuestas moleculares que permiten a las plantas adaptarse a la deficiencia de fosfato, juega un papel muy importante en la regulación de componentes de la AON. (36). Esto debido a que el silenciamiento de *PHR1* causa la disminución de la expresión de *NIN*, *RIC1*, *RIC2*, y *TML*, lo que conduce a la formación del mismo número de nódulos tanto en condiciones óptimas como deficientes de fosfato (36). En general, estos datos indican que la AON es una vía de señalización que permite que las leguminosas formen el número óptimo de nódulos acorde a su estado nutricional.


Conclusión y perspectivas

A través de su proceso evolutivo, las leguminosas han reclutado programas genéticos que les permiten establecer simbiosis con rizobios. Mediante esta simbiosis, las leguminosas pueden crecer en suelos

deficientes de nitrógeno y, además, incorporar formas asimilables de este elemento esencial a la cadena alimenticia. Dado el costo energético que representa la FSN para las leguminosas, también durante su evolución han desarrollado mecanismos genéticos que le permiten tener un balance energético y continuar estableciendo esta simbiosis sin comprometer su desarrollo y crecimiento. Aunque las investigaciones realizadas en las últimas tres décadas han permitido identificar y caracterizar los componentes de la AON y AOI, aún estamos lejos de comprender como las leguminosas regulan el número nódulos e infecciones rizobiales. Por ejemplo, a pesar de que se sabe que la comunicación raíz-vástago-raíz es crucial para regular el número de nódulos, aún queda pendiente identificar la molécula señal que se produce en el tallo y que en la raíz activa la transcripción de *TML*, regulador negativo de la formación de nódulos, en las raíces. En este respecto, es necesario determinar el mecanismo de acción de *TML*, así como las proteínas que son poliubiquitinadas por esta proteína de la familia "Kelch repeat-containing F-box". Puesto que miR2111 es necesario para regular los niveles de RNAm de *TML*, también es importante entender cómo se regula la biogénesis de este miRNA y cómo la activación de la AON inhibe la acción de este miRNA. Al respecto, ¿la AON inhibe la transcripción del gen *miR2111*?; si es el caso, ¿cuáles serían los mecanismos moleculares de esta inhibición? Otra alternativa para explicar la regulación de la actividad de miR2111 es que exista un pseudo-blanco que secuestre a este miRNA; si es el caso, ¿cuál es el pseudo-blanco que secuestra a miR2111?

Diversas evidencias experimentales indican que la AON juega un papel importante para que las leguminosas ajusten el número de nódulos acorde a su estado nutrimental. Por ejemplo, se ha demostrado que la AON permite que las leguminosas continúen fijando nitrógeno atmosférico en condiciones deficientes de fósforo, pero con una reducción en el número de nódulos y en su actividad metabólica. A pesar de que este conocimiento es de gran importancia para diseñar estrategias experimentales que permitan hacer eficiente la FSN en condiciones deficientes de

fósforo, aún no es claro como la AON se activa en estas condiciones nutrimentales. Por ejemplo, se cuenta con evidencias de que el factor transcripcional PHR1 juega un papel importante en la activación de la AON en deficiencia de fósforo, pero ¿cuál es su mecanismo de acción? ¿PHR1 activa la transcripción de *NIN* y a su vez la expresión de los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13*? O ¿PHR1 y *NIN* actúan de forma sinérgica para activar la AON en condiciones deficientes de fósforo? Responder experimentalmente estas preguntas generarán conocimiento que permita entender cómo las leguminosas ajustan la FSN ante diferentes condiciones ambientales, particularmente en condiciones de deficiencia de fósforo.

Finalmente, se ha demostrado que regular el número de infecciones rizobiales también es necesario para que la leguminosa alcance un balance energético durante la FSN. A pesar de que se conocen algunos componentes genéticos de la AOI y de que en ciertas leguminosas el rizobio también participa en la AOI, aún se desconoce como se activa la AOI. Al respecto, es necesario determinar en que momento de la infección rizobial se activa la AOI. ¿Se activa al mismo tiempo que la AON? ¿Qué otros componentes genéticos son necesarios para activar y mantener la AOI? Responder experimentalmente estas preguntas nos permitirá comprender de forma integral los mecanismos que usan las leguminosas para mantener un balance energético durante la FSN en cualquier condición ambiental. 

Agradecimientos

M.C.I-A es una estudiante de Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM, y recibe una beca del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) (CVU: 919676). La investigación realizada en el Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas es financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM. Proyecto Número: IN201320) y por el CONACyT (Proyecto Número: A1-S-9454) otorgados a O.V.-L.

REFERENCIAS

1. Ke J, Wang B, and Yoshikuni Y. (2021) Microbiome engineering; synthetic biology of plant-associate microbiomes in sustainable agriculture. *Trends Biotechnol.* 39: 244-261.
2. Murray JD, Liu, C W, Chen Y, Miller AJ (2017) Nitrogen sensing in legumes. *J Exp Bot.* 68: 1919-1926.
3. Castro-Guerrero NA, Isidra-Arellano MC, Mendoza-Cozatl DG, Valdés-López O (2016) Common Bean: A legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Front Plant Sci.* 7:600.
4. Crews TE, Peoples MB (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst Environ.* 102: 279-297.
5. Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Hauggaard-Nielsen H, Alves BJ, Morrison MJ (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agron Sustain Dev.* 32: 329-364.
6. Venkateshwaran M, Volkening JD, Sussman MR, Ane JM (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Curr Opin Plant Biol.* 16:118-127.
7. Oldroyd G (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 11: 252-263.
8. Dénarié J, Debelle F, Promé JC (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem.* 65: 503-535.
9. Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R, Udvardi MK, (2020) Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 32: 15-41.
10. DiCenzo GC, Tesi M, Pfau T, Mengoni A, and Fondi M (2020) Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nat Commun* 11: 2574.
11. Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM (2019) Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ.* 42: 41-51.
12. Soyano T, Hirakawa H, Sato S, Hayashi M, Kawaguchi M (2014) NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 111:14607- 1461.
13. Hastwell AH, Gresshoff PM, Ferguson BJ (2015) The structure and activity of nodulation-suppressing CLE peptide hormones of legumes. *Funct Plant Biol.* 42: 229-238.
14. Yoro E, Nishida H, Ogawa-Ohnishi M, Yoshoda C, Suzuki T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M (2019). PLENTY, a hydroxyproline O-arabinosyltransferase, negatively regulates root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot.* 70: 507-517.
15. Kassaw T, Nowark S, Schnabel E, Frugoli J (2017) ROOT DETERMINED NODULATION1 is required for *M. truncatula* CLE12, but not CLE13, peptide signaling through the SUNN receptor kinase. *Plant Physiol.* 174: 2445-2456.
16. Corcilius L, Hastwell AH, Zhang M, Williams J, Mackay JP, Gresshoff PM, Ferguson BJ, Payne RJ (2017) Arabinosylation modulates the growth-regulating activity of the peptide hormone CLE40a from soybean. *Cell Chem Biol.* 24:1347-1355.e7.
17. Miyazawa H, Oka-Kira E, Sato N, Takahashi H, Wu GJ, Sato S, Hayashi M, Betsuyaku S, Nakazono M, Tabata S, Harada K, Sawa S, Fukuda H, Kawaguchi M. (2010) The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development.* 137:4317-25.
18. Crook AD, Schnabel EL, Frugoli JA (2016) The systemic nodule number regulation kinase SUNN in *Medicago truncatula* interacts with MtCLV2 and MtCRN. *Plant J.* 88: 108-119.
19. Sasaki T, Suzuki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun.* 5:4983.
20. Mens C, Li D, Haaima LE, Gresshoff PM, Ferguson BJ (2018) Local and Systemic Effect of Cytokinins on Soybean Nodulation and Regulation of Their *Isopentenyl Transferase* (IPT) Biosynthesis Genes Following Rhizobia Inoculation. *Front Plant Sci.* 9:1150.

21. Tsikou D, Yan Z, Holt DB, Abel NB, Reid DE, Madsen LH, Bhasin H, Sexauer M, Stougaard J, Markmann K (2018) Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*. 362: 233-236.
22. Okuma N, Soyano T, Suzaki T, Kawaguchi M. (2020) MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*.11:5192.
23. Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzaki T, Kawaguchi M (2013) Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol*. 54:433-47.
24. Mohd-Radzman NA, Laffont C, Ivanovici A, Patel N, Reid D, Stougaard J, Frugier F, Imin N, Djordjevic MA (2016) Different pathways act downstream of the CEP1 peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. *Plant Physiol*. 171: 2536–2548.
25. Gautrat P, Laffont C, Frugier F (2020) Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation through the miR2111 Systemic Effector. *Curr Biol*. 30:1339-1345.e3.
26. Sorroche F, Walch M, Zou L, Rengel D, Maillet F, Gibelin-Viala C, Poinso V, Chervin C, Masson-Boivin C, Gough C, Batut J, Garnerone AM (2019) Endosymbiotic *Sinorhizobium meliloti* modulate *Medicago* root susceptibility to secondary infection via ethylene. *New Phytol*. 223:1505-1515.
27. Miri M, Janakirama P, Huebert T, Ross L, McDowell T, Orosz K, Markmann K, Szczyglowski K. (2019) Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytol*. 222:1523-1537.
28. Yoro E, Suzaki T, and Kawaguchi M. (2019) CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the daphne mutant of *Lotus japonicus*. *Mol Plant Molecular Int*. 33: 320-327.
29. Garnerone AM, Sorroche F, Zou L, Mathieu-Demazière C, Tian C F, Masson-Boivin C, Batut J. (2018). NsrA, a predicted β -Barrel outer membrane protein involved in plant signal perception and the control of secondary infection in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 200: e00019-18.
30. Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM. (2011) Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Mol. Plant Microbe Interact*. 24: 606–618.
31. Mens C, Hastwell AH, Su H, Gresshoff PM, Mathesius U, Ferguson BJ (2021) Characterization of *Medicago truncatula* CLE34 and CLE35 in nitrate and rhizobia regulation of nodulation. *New Phytol*. 229:2525-2534.
32. Nishida H, Tanaka S, Handa Y, Ito M, Sakamoto Y, Matsunaga S, Betsuyaku S, Miura K, Soyano T, Kawaguchi M, Suzaki T (2018) A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*.9:499.
33. Moreau C, Gautrat P, abd Frugier F. (2021) Nitrate-induced CLE35 signaling peptides inhibit nodulation through the SUNN receptor and miR2111 perception. *Plant Physiol*. 185:1216-1228.
34. Hernández G, Valdés-López O, Ramírez M, Goffard N, Weiller G, Aparicio-Fabre R, Fuentes SI, Erban A, Kopka J, Udvardi MK, Vance CP (2009) Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants. *Plant Physiol*. 151: 1221-1238.
35. Isidra-Arellano MC, Reyero-Saavedra MDR, Sánchez-Correa MDS, Pingault L, Sen S, Joshi T, Girard L, Castro-Guerrero NA, Mendoza-Cozatl DG, Libault M, Valdés-López O (2018) Phosphate deficiency negatively affects early steps of the symbiosis between common bean and rhizobia. *Genes (Basel)*. 9:498.
36. Isidra-Arellano MC, Pozas-Rodríguez EA, Reyero-Saavedra MDR, Arroyo-Canales J, Ferrer-Orgaz S, Correa-Sánchez MDS, Cardenas L, Covarrubias AA, Valdés-López O (2020) Inhibition of legume nodulation by Pi deficiency is dependent on the autoregulation of nodulation (AON) pathway. *Plant J*. 103:1125-1139.
37. Rubio LM, Ludden PW. (2005) Maturation of Nitrogensase: a Biochemical puzzle. *J Bacteriol*. 187: 405-414.
38. Dixon R, Kahn D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol*. 2: 621-631.

¿EN QUÉ EMPLEA EL ERITROCITO SU ATP?*

Morales-López Sara¹, Morales-García Lilia¹,
Fortoul Van Der Goes Teresa² y Milán-Chávez Rebeca^{1**}

¹Departamento de Bioquímica, ²Departamento de Biología Celular y Tisular
Facultad de Medicina, UNAM, CDMX, México. **Autor de correspondencia E: milan@bq.unam.mx

RESUMEN

El eritrocito se encarga del intercambio gaseoso entre los tejidos y los pulmones a diferencia de otros tipos celulares, el eritrocito solamente puede sintetizar adenosín trifosfato (ATP) a través de la glucólisis anaeróbica y este ATP se emplea para mantener el estado estacionario iónico, la asimetría de su membrana y para regular el transporte de glucosa lo que le permite sobrevivir un promedio 120 días.

ABSTRACT

The erythrocyte is responsible for the gas exchange between the tissues and the lungs, in difference with other cell types, the erythrocyte can only synthesize adenosine triphosphate (ATP) through anaerobic glycolysis and this ATP is used to maintain the ionic steady state, membrane asymmetry and in regulating the glucose transport, this process allows the erythrocyte to survive an average of 120 days.

PALABRAS

CLAVE:

Glucólisis, glucosa, transporte, GLUT1, Na⁺-K⁺-ATPasa, Ca²⁺-ATPasa, flippasa.

KEY WORDS:

Glycolysis, glucose, transport, GLUT1, Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, flippases.

El eritrocito es la célula que se encarga de transportar el oxígeno a las células del cuerpo y recoge el dióxido de carbono que es generado por las células como parte de su metabolismo aeróbico. Los eritrocitos se producen en la médula ósea, tienen un tiempo de vida media de 100 a 120 días. Durante el proceso de maduración los eritrocitos presentan la pérdida de los orgánulos por lo que no pueden llevar a cabo las diversas vías metabólicas. Para poder obtener su energía los eritrocitos emplean la vía glucolítica para generar adenosín trifosfato (ATP), el producto final de la glucólisis en este caso es el lactato, mismo que sale al torrente circulatorio para llegar al hígado en donde va a ser transformado en glucosa la cual eventualmente puede retornar al eritrocito y mantener la glucólisis, a este proceso se le conoce como el ciclo de Cori (1, 2).

La captación de la glucosa por parte del eritrocito se lleva a cabo por el transportador GLUT1 que se expresa también en la barrera hematoencefálica, las neuronas, los astrocitos y la retina, en todos estos tejidos que expresan este tipo de transportador se requiere de un aporte de glucosa

de manera constante, siendo en el caso del eritrocito y la retina la principal fuente energética. Los transportadores de glucosa son proteínas de membrana que tienen 12 segmentos transmembranales que se organizan en dos grupos 6 del lado amino terminal y los otros 6 en el lado carboxilo, esta organización permite aparezca un "túnel" hidrofílico que permite el paso de la glucosa a través de la bicapa lipídica de la membrana, el transporte se lleva a cabo a través de un cambio conformacional del transportador que se encuentra abierto del lado extracelular lo cual le permite la entrada de la glucosa, una vez en el interior el transportador cambia de forma cerrándose para mantener a la glucosa en su interior manteniéndola aislada del medio extracelular y abriéndose del lado citosólico, permitiendo la entrada de la glucosa (3). La regulación de la actividad del GLUT1 se lleva a cabo de acuerdo con el tipo del tejido en el cuál esta expresado en el caso de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica esta regulación se lleva a través de la activación de una AMP cinasa, lo que favorece la sobreexpresión del transportador cuando se presenta una hipoglu-

emia (<70 mg/dL). En los eritrocitos GLUT1 se expresa en forma de un homotetrámero, lo que facilita la captación de glucosa en condiciones de hipoglucemia (1, 4).

A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos el eritrocito puede captar continuamente glucosa esto es debido a que el GLUT1 tiene una Km de 2 mM, lo que le permite la captación de glucosa aún en condiciones de hipoglucemia (3.3 mM en sangre), lo cual es benéfico dado que no puede almacenar la glucosa en forma de glucógeno o bien transformarlo en ácidos grasos ¿pero que ocurre cuando tenemos una hiperglicemia transitoria postprandial o bien en pacientes con diabetes que tienen hiperglicemia continua?; el GLUT1 puede disminuir la captación de glucosa debido a un aumento en la concentración de ATP intracelular, esto lo realiza para proteger al eritrocito de un exceso de glucosa en su interior, ya que si bien se requiere de grandes cantidades de glucosa-6-fosfato para alimentar la vía de las pentosas (vía del fosfogluconato) y tener suficiente NADPH + H⁺ para el sistema antioxidante, el exceso de glucosa puede causar daños (5, 6).

Pero el ATP producido por la vía glucolítica no solamente se emplea para regular el transporte de glucosa sino que también, es empleado por la P4-ATPasa que son denominadas flipasas que sirven para mantener la asimetría de la membrana del eritrocito la cuál esta compuesta principalmente por fosfatidilcolina y esfingomiolina localizados principalmente en la cara externa de la membrana, mientras que del lado citosólico la membrana se encuentra conformada por fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (7), mantener esta asimetría permite que los eritrocitos no sean reconocidos por los macrófagos los cuáles al detectar la presencia de la fosfatidilserina los fagocitan. Las flipasas requieren estar fosforiladas para translocar a los fosfolípidos de la membrana, sin embargo, para la unión de éste no es necesario que la enzima se encuentre previamente fosforilada, sino que ésta es capaz de primero unir al fosfolípido y después fosforilarse con el gasto de una molécula de ATP como se muestra en la figura 1 (8).

En el eritrocito también se llevan a cabo diversos movimiento de iones para lo cuál emplea diversos

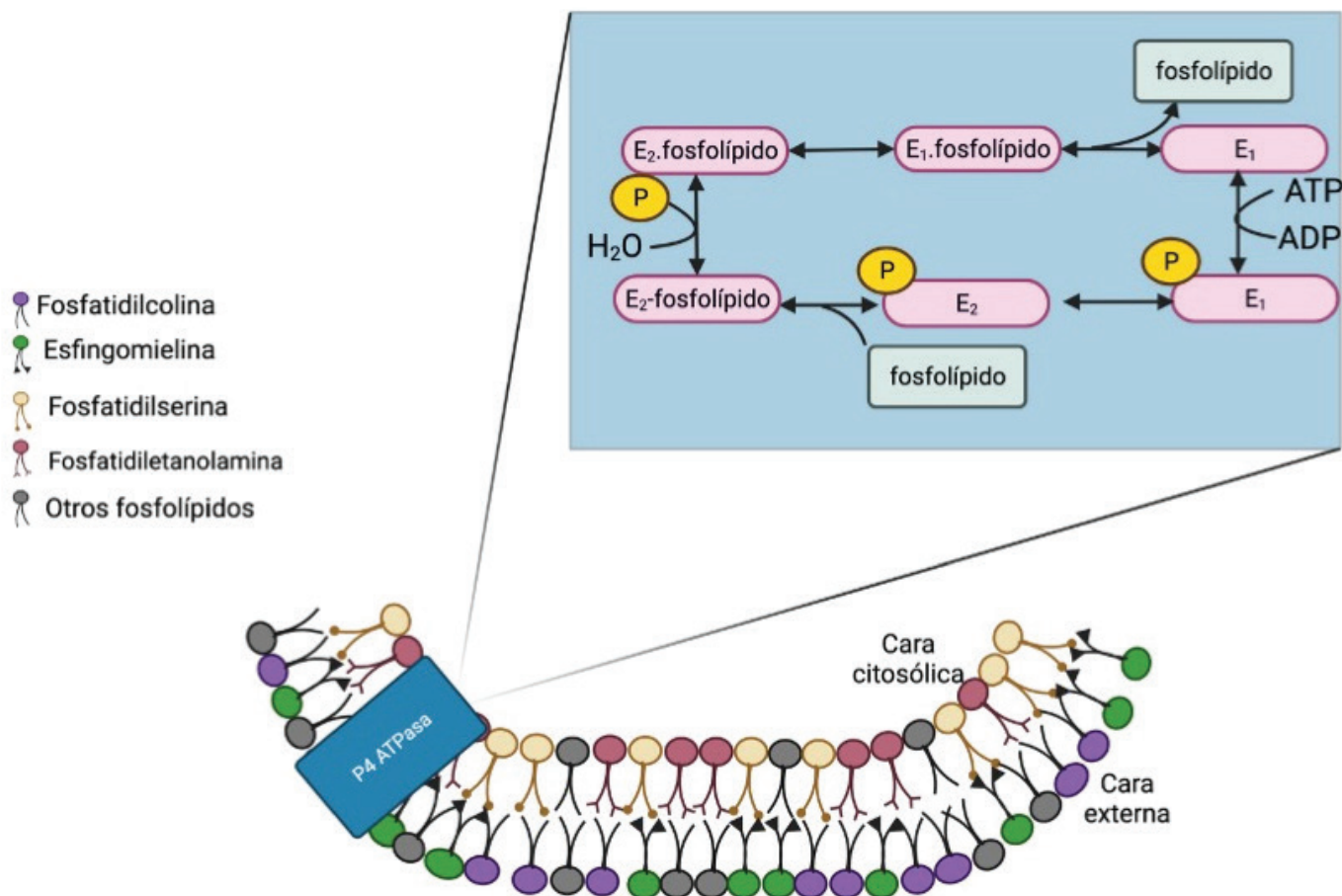


Figura 1. Mecanismo de la flipasa en eritrocito. La P4 ATPasa se encuentra en la membrana del eritrocito la cual ayuda al recambio de los fosfolípidos para evitar la fagocitosis temprana. Creada en BioRender.com.

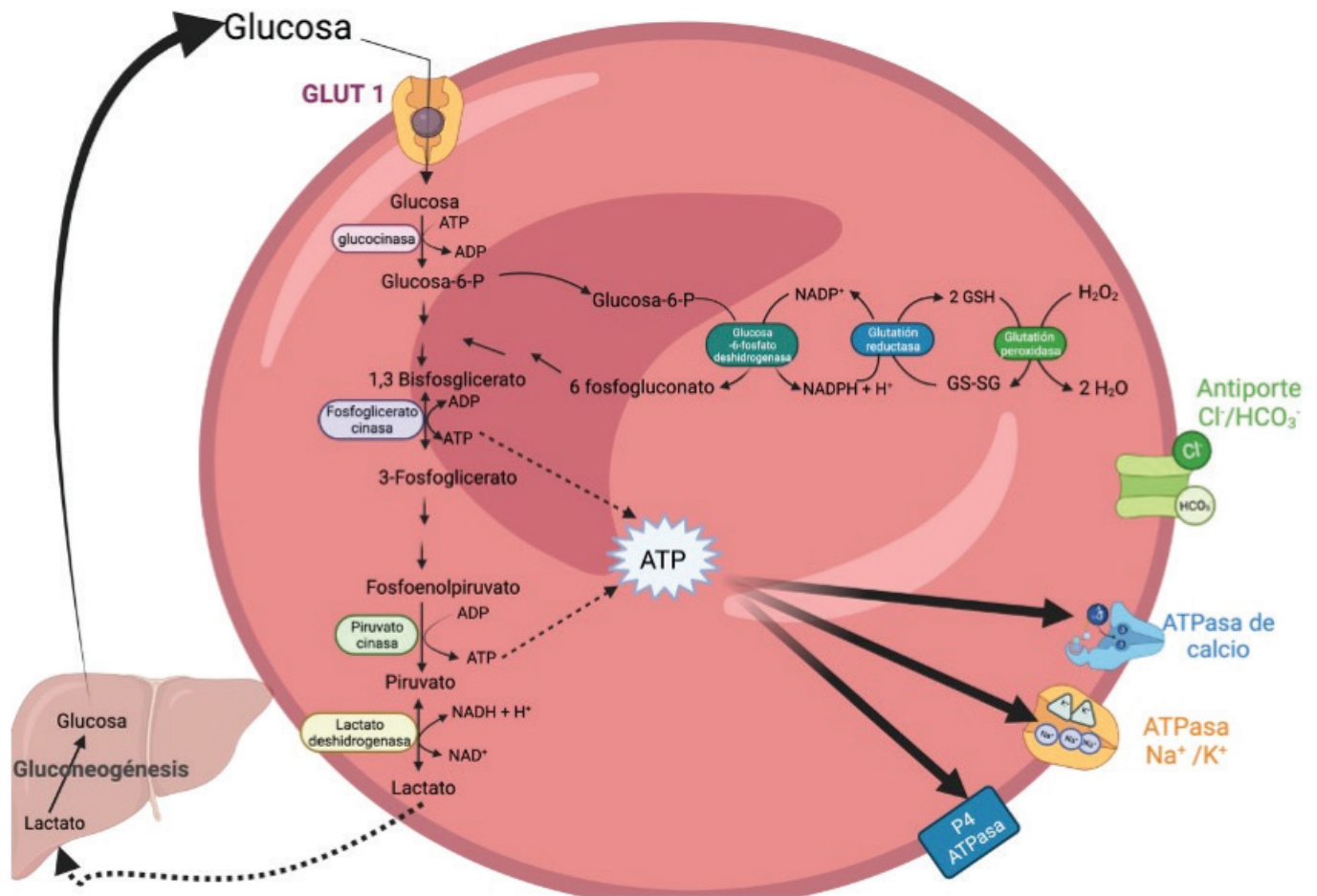



Figura 2. Usos del ATP por el eritrocito. El eritrocito crea su ATP gracias a la glucólisis y es usado por diferentes ATPasas para regular su metabolismo. Creada en BioRender.com.

transportadores entre los cuales se encuentra el intercambiador de aniones que permite el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, lo que ayuda a mantener el pH plasmático pero también cuenta con la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, antiporte que saca 3 Na^+ del interior de la célula y permite la entrada de 2 K^+ debido a que el movimiento de los iones se lleva a cabo en contra de su gradiente, se requiere gastar energía en forma de ATP (transporte activo primario) (9); pero no solamente el eritrocito mueve iones como Na^+ y K^+ sino que también hay movimiento de Ca^{2+} al igual que ocurre en otros tipos celulares, este ion funciona como mensajero intracelular pero el Ca^{2+} no puede permanecer en altas concentraciones en el citoplasma por lo cual se encuentra unido a diferentes proteínas o bien fosfolípidos de la membrana llegando a ser la concentración de 5.7 μM . No todo el Ca^{2+} se encuentra atrapado en estos sistemas así que dentro del eritrocito encontramos Ca^{2+} libre en una concentración de 30 a 60 nM a diferencia de lo que encontramos en el plasma cuya concentración es de aproximadamente 1.8

mM. Un aumento significativo de la concentración Ca^{2+} al interior del eritrocito ocasiona daños en la función de este por lo que es necesario que la concentración sea mantenida y al igual que sucede con otros iones que requieren el movimiento en contra de su gradiente del Ca^{2+} se realiza a través de una bomba que requiere de ATP, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular provoca su unión a calmodulina y con ello la activación de la ATPasa. Debido a que ésta presenta un sitio de unión para el Ca^{2+} - calmodulina en su carboxilo terminal, una de las cosas que limita la actividad del transporte activo primario es la disponibilidad de ATP (Fig. 2) (10, 11).

Estas son algunas de las funciones en las cuales el eritrocito gasta el ATP que genera durante la glucólisis y que les permiten a las células sobrevivir durante los siguientes 120 días que circulan en la sangre. Sin embargo los cambios osmóticos, oxidativos, mecánicos y energéticos repercuten de una o de otra forma en la disminución de la concentración de ATP, el aumento en la concentración

calcio intracelular y con ello la externalización de fosfatidilserina, culminando con la fagocitosis y por

ende la muerte del eritrocito una vez retirado de la circulación. 

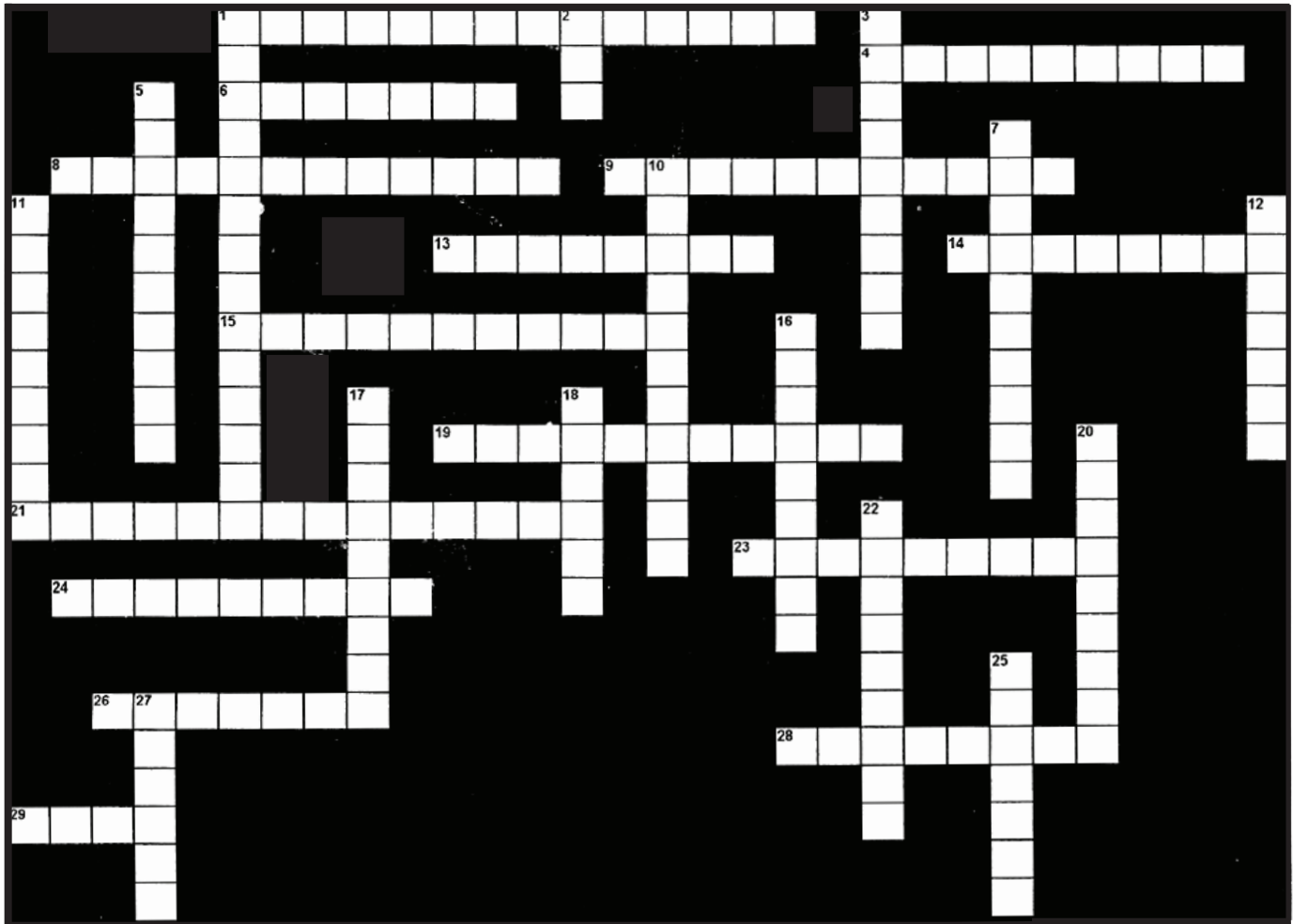
REFERENCIAS

- Galochikina, T., Ng Fuk Chong, M., Challali, L., Abbar, S. and Etchebest, C. (2019) New insights into GLUT1 mechanics during glucose transfer *Scientific Reports*, 9(1):998
- Garcia, C.K., Goldstein, J.J., Pathak, R.K., Anderson, R.G.W. and Brown, M.S. (1994) Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate and other monocarboxylates: implication for the Cori cycle, *Cell*, 76:865-873.
- Holman, G.D. (2020) Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 472(9):1155-1175.
- Blodgett, D.M., De Zutter, J.K., Levine, K.B., Karim, P. and Carruthers, A. (2007) Structural basis of GLUT1 inhibition of cytoplasmic ATP. *The Journal of general physiology*, 130(2):157-168.
- Stepniewska, J., Dolegowska, B., Ciechanowski, K., Kwiatkowska, E., Millo, B and Chlubek, D. (2006) Erythrocyte antioxidant defense system in patients with chronic renal failure according to the hemodialysis conditions. *Archives of Medical Research*, 37:353-359.
- Siems, W.G., Sommerburg, O., and Grune, T. (2000) Erythrocyte free radical and energy metabolism, *Clinical nephrology*, 53:9-17.
- Mohandas, N and Gallagher, P.G (2008) Red cell membrane: Paste, present and future, *Blood*, 112:3939-3948.
- Tadini-Buoninsegni, F., Mikkelsen, S.A., Mogensen, L.S., Molday, R.S and Andersen, J.P. (2019) Phosphatidylserine flipping by P4-ATPase ATP8A2 is electrogenic. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116:16332-16337.
- Geering, K. (1997) Na, K-ATPase. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 6:434-439.
- Kosk-Kosicka, D and Bzdega, T. (1990) Effects of Calmodulin on Erythrocyte Ca²⁽⁺⁾-ATPase Activation and Oligomerization. *Biochemistry*, 29:3772-3777.
- Kosk-Kosicka, D., Bzdega, T., Wawrzynow, A., Scaillet, S., Nemcek, K. and Johnson, J.D. (1990) Erythrocyte Ca²⁽⁺⁾-ATPase: activation by enzyme oligomerization versus by calmodulin. *Advances in experimental medicine and biology*, 269:169-174.

CRUCIBIOQ[®]

ENFERMEDADES METABÓLICAS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



HORIZONTALES

1 Cuadro que se presenta debido a la hipofunción de la glándula tiroides que produce tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), lo que ocasiona que haya un metabolismo lento que conduce a cansancio, disminución en la capacidad de rendimiento, además de apatía, mayor sensibilidad al frío, entre otros; la ausencia del tratamiento adecuado en la mujer gestante puede ser responsable de cretinismo en el producto.

4 Así se identifica a un grupo de alteraciones metabólicas hereditarias en las que hay carencia de las enzimas dedicadas a la degradación de los lípidos, ocasionando daños en células y tejidos como en cerebro, hígado, bazo, médula ósea o sistema nervioso y responsables del desarrollo de enfermedades como la de Fabry, Niemann-Pick o Gaucher entre otras.

6 Alcohol que se metaboliza en el hígado por una deshidrogenasa que tiene una velocidad 5 veces menor que la del etanol, sus productos son formaldehído y ácido fórmico, este último responsable de una acidosis metabólica grave; los síntomas que la intoxicación de esta sus-

tancia ocasiona son: cefalea, náuseas, vómito, trastornos en la visión, en algunas ocasiones coma y puede llegar hasta la muerte cuando el consumo es 1g/kg de peso. El tratamiento de elección es la administración de álcalis, hemodiálisis y etanol para que su enzima deshidrogenasa realice una inhibición competitiva e impida la formación de los productos tóxicos.

- 8 La deficiencia de la galactosa 1-fosfato uridil transferasa impide que la hexosa que junto con la glucosa constituye a la lactosa se incorpore al metabolismo de los carbohidratos ocasionando esta patología; este cúmulo debe ser detectado en el periodo neonatal ya que es responsable de intolerancia al alimento, vómito, ictericia; la ignorancia de este cuadro conduce a hepatomegalia, retraso mental y en ocasiones la muerte.
- 9 Hormona encargada de la reabsorción de agua en el cuerpo y de la concentración de orina; la patología identificada como diabetes insípida se debe a un trastorno en la producción de esta hormona en la hipófisis, lo que ocasiona que haya gran cantidad de orina que al eliminarse se encuentre muy diluida, esto ocasiona sed, irascibilidad, calambres y piel seca entre otros síntomas.
- 13 Esta enfermedad -la cual puede ser tipo I o II- tiene como característica fundamental la deficiencia de insulina, que es la hormona indispensable para que la glucosa, proveniente de la alimentación, sea metabolizada para la producción de energía.
- 14 No hay una causa identificada para el desarrollo de esta patología en la que hay mutaciones en el DNA que pudieron deberse a factores genéticos, radiaciones, etc., es ocasionada por una sobreproducción en la médula ósea de linfocitos que no maduran debidamente (blastos) y que afectan las funciones de los linfocitos sanos, los eritrocitos y las plaquetas; los síntomas de este cuadro generalmente son: desarrollo de moretones, sangrados e infecciones frecuentes, dolor en huesos y articulaciones, inflamación de ganglios linfáticos y disnea entre otros.
- 15 En la neuropatía conocida como Síndrome de Gullian-Barré se han desarrollado _____ como resultado de la infección bacteriana ocasionada por *Campylobacter jejuni* que destruyen la mielina que cubre los nervios periféricos lo que conduce a una disfunción autonómica que se presenta con parálisis flácida, inicialmente de los miembros inferiores y conforme avanza el daño, la parálisis muscular es progresiva y puede ocasionar problemas respiratorios, la administración de inmunoglobulinas es uno de los tratamientos de elección.
- 19 La enfermedad de Tay-Sachs está dentro del grupo de las lipodosis, es de carácter hereditario autosómico recesivo es más común en niños de origen judío, es producida por la _____ de la enzima β -hexosaminidasa que interviene en la degradación de gangliósidos que al acumularse dañan al sistema nervioso central, los síntomas son detectados aproximadamente a los 6 meses de edad al observar que el niño tiene mayor sensibilidad al ruido, visión disminuida, dificultad al tragar, ceguera, manchas rojas en la retina, al segundo año de vida se inician las convulsiones que pueden acabar con la vida hacia los 4 años.
- 21 Su nombre proviene de las raíces griegas $\alpha\theta\eta\rho$ (*athéro* pasta) y $\sigma\kappa\lambda\eta\rho\acute{\sigma}$ (*sklerós* duro), es un síndrome que se caracteriza por la formación de placas que se depositan en la íntima de las arterias lo que ocasiona una reacción inflamatoria con migración de las células de la musculatura lisa de la pared, que conducen a una pérdida de la elasticidad y disminución del paso del flujo sanguíneo.
- 23 Trastorno de la coagulación de la sangre de carácter hereditario, puede ser A o B, está ligada al cromosoma X y afecta a los hombres, puede transcurrir sin manifestaciones, las que se expresan ya sea ante heridas o en procesos quirúrgicos en donde los sangrados pueden conducir a hemorragias.
- 24 Enfermedad neurodegenerativa, suele aumentar su incidencia a edades superiores a los 65 años; los agentes causales pueden ser: genéticos, por daño oxidativo, por alteración en el metabolismo de la dopamina o por la presencia de tóxicos ambientales; todos o algunos de ellos, conducen a la disfunción de complejo I mitocondrial, hay generación de radicales libres, despolarización de la membrana y alteraciones que finalmente conduce a la muerte de neuronas dopaminérgicas.
- 26 Cuando este metabolito aumenta sus valores en circulación, generalmente se debe a que se han destruido las células pancreáticas responsables de la producción de insulina, la patología se identifica como diabetes y los síntomas principales son polidipsia, polifagia y poliuria.
- 28 Es una alteración del equilibrio ácido-base en el organismo, en el que hay una disminución del pH fisiológico de la sangre, según su origen puede ser metabólica ocasionada por disfunción renal o por anomalías metabólicas o respiratoria producida por problemas relacionados con las vías respiratorias.

- 29** Enfermedad que se caracteriza por un aumento de ácido úrico en la sangre, el mismo se puede encontrar cristalizado en las articulaciones; un factor desencadenante de la enfermedad es el consumo de grandes cantidades de carnes rojas, vísceras y etanol.

VERTICALES

- 1** Enfermedad ocasionada por un exceso en la cantidad de fierro en el organismo, puede ser hereditaria, la cual es más frecuente en hombres que en mujeres o adquirida, debida a transfusiones repetidas, hepatitis B o C; los principales síntomas son fatiga, debilidad y malestar general, el tratamiento de elección es la aplicación de sangrías para evitar el cúmulo del metal.
- 2** Siglas del índice que relaciona el peso y la estatura [$\text{peso (kg)} \div \text{altura}^2 \text{ (metros)}$] que se ha empleado para determinar el grado de sobrepeso cuando el valor está entre 25 y 29.99 kg/m^2 ; obesidad grado I cuando el valor está entre 30 y 34,99 kg/m^2 ; grado II es cuando el valor está entre 35 y 39,99 kg/m^2 y grado III cuando excede estos valores
- 3** A esta enfermedad que se desarrolla generalmente después de los 60 años se le llama también demencia senil, inicialmente hay un deterioro cognitivo leve, que a medida que el tiempo avanza se incrementa hasta olvidar rostros, nombres, costumbres de aseo, etc., por estudios bioquímicos se tiene que la proteína precursora de amiloide, (APP) se divide en fragmentos, uno de esos el péptido β -amiloide, que se agrupa con otros y forma las placas seniles, además la proteína tau se hiperfosforila, forma ovillos que dañan el sistema de transporte neuronal.
- 5** Este tipo de anemia llamada también drepanocítica es una enfermedad de origen genético debida a una mutación de una timina por una adenina en el gen de la globina β de la hemoglobina lo que conduce a la sustitución del ácido glutámico por valina ocasionando un defecto en la proteína, el eritrocito adquiere la figura de hoz lo que conduce a una isquemia del tejido que disminuye el aporte de oxígeno tisular.
- 7** La _____ de Fabry es debida a la deficiencia de la α -galactosidasa-A y con ello la acumulación de trihexósido de ceramida lo que ocasiona acumulación de grasa en riñón, con insuficiencia renal; en corazón y cerebro, con la posible presencia de infartos; alrededor de vasos sanguíneos con riesgo de accidente cerebrovascular y aquellos que irrigan al sistema nervioso, ocasionan parestesia.
- 10** Dentro del grupo de enfermedades _____ recesivas se encuentra la de Niemann-Pick que es ocasionada por la acumulación de grasas y colesterol en hígado, bazo, médula ósea preferentemente, esta patología puede ocasionar pérdida de tono muscular, problemas de aprendizaje, dificultad al tragar, incoherencia al hablar, pérdida progresiva de la visión y audición; de las categorías, la más grave es la de la primera infancia en donde el paciente raramente sobrevive más allá del año y medio.
- 11** Proteína intracelular con 24 subunidades que en su parte interna tiene la capacidad de almacenar de 4000-4500 átomos de fierro el que se secreta al plasma con pequeñas cantidades para ser utilizado en la síntesis de hemoglobina, mioglobina, citocromos y algunas enzimas; las irregularidades ya sea en la producción, almacenamiento o liberación del metal de la proteína generará diferentes tipos de anemias.
- 12** Los incrementos séricos del producto terminal de la glucólisis anaerobia ocasiona la acidosis _____ la cual puede deberse a varios factores ya sean ambientales como por ejemplo, ascender a grandes alturas donde la concentración de oxígeno atmosférico se encuentra disminuido o patológicas como en la intoxicación alcohólica en la que la relación de NADH/NAD⁺ se encuentra aumentada, así como en asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva o diabetes mellitus, entre otras.
- 16** Dentro del grupo de enfermedades autosómicas recesivas está la de von Gierke que se caracteriza por la deficiencia de glucosa 6-fosfatasa, enzima que interviene en la liberación de las subunidades monoméricas a partir de la reserva hepática del _____, esto conduce a hipoglucemia, acidosis láctica, hiperuricemia e hiperlipidemia; las complicaciones de este cuadro son alteraciones en el crecimiento, posibilidad de generar gota, crisis convulsivas y cálculos renales, entre otros.
- 17** Cuando se presenta el síndrome de dificultad respiratoria aguda, es inminente la administración de oxígeno; este proceso lleva el riesgo de que puede ocasionar daño a la función pulmonar por la sobreproducción de radicales libres. En los años 50 del siglo pasado se identificó que el aumento de la presión de oxígeno en las incubadoras de recién nacidos prematuros hay una toxicidad por _____ que puede ocasionar ceguera.

- 18** Enfermedad autosómica recesiva, se caracteriza por ictericia, hepatomegalia, somnolencia, que son debidos a una insuficiencia hepática aguda, ocasionada por una deficiencia de ceruloplasmina que genera un nivel bajo de cobre en el plasma, mismo que se deposita anormalmente en hígado, cerebro, bazo, cornea y riñón, que pueden producir espasmos musculares, disfagia, osteoporosis, etc., si no se atiende oportunamente con medicamento o con alimentos pobres en cobre, puede ser causa de muerte temprana.
- 20** Enfermedad que ocasiona inflamación del hígado que puede desencadenarse por infección viral o bacteriana, debida a trastornos de tipo autoinmune o bien por agentes tóxicos; existen diversas formas según el agente causal; la principal sintomatología son dolor abdominal, fatiga, ictericia, inapetencia, pérdida de peso, el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad se realiza con pruebas de funcionamiento del órgano, exámenes sanguíneos para identificar el tipo A, B o C entre otros, la del tipo A generalmente es de corta duración y sin problemas posteriores.
- 22** Son un grupo de siete trastornos genéticos generalmente hereditarios causados por irregularidades en la producción del hemo componente de la hemoglobina, debido a una sobreproducción de ácido δ -amino-levulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG); generalmente el individuo permanece asintomático por toda la vida pero el cuadro puede desencadenarse por la presencia de medicamentos o anestésicos como barbitúricos o hidantoínas entre otros; la sintomatología consiste en: dolor abdominal, náuseas, vómitos, hipertensión y fotosensibilidad; un dato que puede ayudar al diagnóstico es la coloración rojiza de la orina que se va oscureciendo al cabo de unas horas hasta color vino sobre todo si se las expone a la luz.
- 25** Este síndrome se produce por un exceso de cortisol ya sea porque la glándula suprarrenal produce demasiada hidrocortisona o por tratamientos prolongados con glucocorticoides, se identifica por obesidad central, la característica "cara de luna llena" e hipertensión arterial.
- 27** La deficiencia de la _____ ácida ocasiona la enfermedad de Wolman, un trastorno autosómico recesivo en el que se produce un almacenamiento de lípidos como colesterol y triacilglicéridos que ocasionan daño a células y tejidos; el recién nacido desarrolla hepatomegalia, agrandamiento del bazo, abdomen distendido, esteatorrea y endurecimiento de las glándulas suprarrenales por depósitos de calcio.

EL SINGULAR CASO DE ALDA-1. UN MODULADOR DE LA ACTIVIDAD DE ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

Javier Alejandro Belmont-Díaz y José Salud Rodríguez-Zavala*

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".
Ciudad de México, México.

Resumen

La activación de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) tiene un gran potencial terapéutico para múltiples enfermedades humanas. El activador de ALDHs mejor caracterizado es un compuesto sintético denominado Alda-1. En el presente trabajo se muestra el efecto de Alda-1 sobre la cinética de la ALDH2 humana (isoforma mitocondrial), se analiza el tratamiento matemático para obtener los parámetros cinéticos y se discute el significado biológico del efecto de este singular activador.

Abstract

Activation of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) has great therapeutic potential for multiple human diseases. The best characterized ALDHs activator is a synthetic compound called Alda-1. The present work shows the effect of Alda-1 on the kinetics of human ALDH2 (mitochondrial isoform), analyzes the mathematical treatment applied to the data to obtain the kinetic parameters, and discusses the biological significance of the effect of this unique activator.

Introducción

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son una súper familia de enzimas que se encargan de oxidar aldehídos a sus correspondientes ácidos (1). Los aldehídos son compuestos orgánicos reactivos que se pueden formar por diversos procesos como en el metabolismo del etanol (2), la exposición a xenobióticos o como producto de la peroxidación de lípidos en condiciones de estrés oxidante (3). Estos aldehídos, pueden modificar la estructura de biomoléculas como el DNA (ácido desoxirribonucleico) (4) o proteínas (5), por lo que pueden ser muy nocivos para la célula, es por esta razón que la actividad de las ALDHs se considera de vital importancia para mantener la integridad celular (6).

Estudios en diversos modelos han mostrado que la activación de las ALDHs es capaz de proteger a la célula de diversos tipos de estrés (6-8), aunque se ha dado más énfasis al estudio del efecto sobre la activación de la isoforma mitocondrial (ALDH2). El activador de ALDH2 mejor caracterizado hasta la fecha es Alda-1, el

cual es un compuesto sintético con propiedades cardioprotectoras (9), neuroprotectoras (10) y hepatoprotectoras (11).

Cinética de los activadores no esenciales

Un activador no esencial se define como "una molécula capaz de incrementar la velocidad de una reacción catalizada por una enzima". El esquema general para describir la activación no esencial se presenta en la figura 1, donde α y β son factores adimensionales que representan la magnitud en la cual el activador modifica la afinidad de la enzima por el sustrato (K_s) y la velocidad máxima (V_m), respectivamente.

La ecuación de velocidad que rige la activación no esencial se presenta a continuación:

$$v = \frac{V_m[S] \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)}{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right) + [S] \left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right)} \dots \dots (1) [13]$$

*Autor de correspondencia: José Salud Rodríguez Zavala. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. Juan Badiano No.1, Col. Secc. XVI, Del. Tlalpan 14080, Ciudad de México. Correo E: jose.zavala@cardiologia.org.mx

En su forma de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) tenemos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \dots \dots (2)$$

La posición en el plano cartesiano de la intersección de las líneas resultantes del gráfico de dobles recíprocos, depende de la relación entre los factores α y β . Las ecuaciones 3 y 4, representan el valor en el punto de intersección en el eje de las ordenadas "Y" ($1/v$) y en el eje de las abscisas "X" ($1/[S]$), respectivamente.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \frac{(1 - \alpha)}{(\beta - \alpha)} \dots \dots (3)$$

$$\frac{1}{[S]} = \frac{1}{K_s} \frac{(1 - \beta)}{(\beta - \alpha)} \dots \dots (4)$$

En un caso ideal, el activador aumentaría la afinidad por el sustrato ($\alpha < 1$) y también la velocidad de catálisis ($\beta > 1$), por lo que la intersección ocurriría en el segundo cuadrante ($Y > 0$; $X < 0$). Existen activadores que sólo modifican la V_m ($\beta > 1$) sin modificar la afinidad ($\alpha = 1$) (activadores tipo V), cuya intersección del gráfico de dobles recíprocos ocurre sobre el eje negativo de "X" ($Y = 0$; $X < 0$). También se pueden encontrar moléculas que no modifican la V_m ($\beta = 1$), pero si incrementan la afinidad de la enzima por su sustrato ($\alpha < 1$) (activadores tipo K), por lo que el patrón de líneas intersecantes ocurre sobre el eje "Y" ($Y > 0$; $X = 0$). Es importante hacer

notar que la ecuación 1 también describe el comportamiento de inhibidores parciales ($\beta < 1$) o de un inhibidor competitivo parcial simple ($\beta = 1$; $\alpha > 1$; panel j), y tanto el patrón de inhibición como el de activación dependen de los valores de α y β (Fig. 2). Los casos presentados en los paneles k) y l) de la figura 2, corresponden a moléculas que poseen un comportamiento dual (notar la intersección en el primer cuadrante), es decir, en algunas concentraciones de sustrato la molécula se comporta como inhibidor y en otras concentraciones tiene propiedades de activador, por lo que en este trabajo nos referimos a estas moléculas simplemente como moduladores. Los casos reportados en la literatura de este tipo de moduladores son extremadamente raros.

2. Problema

En la tabla 1 se presentan los datos de actividad de la ALDH2 humana al variar la concentración de un aldehído (propanal), a una concentración saturante de NAD^+ , en presencia de diferentes concentraciones de Alda-1 (12). Con estos datos, calcular los parámetros cinéticos V_m , K_s , K_a , α , β y analizar cómo cambia la eficiencia catalítica con respecto a la concentración de Alda-1.

3. Solución

Al graficar los datos del problema se obtiene una familia de hipérbolas con velocidad cada vez mayor al incrementar la concentración de activador, como era de esperarse; sin embargo, las hipérbolas muestran un cruce a una concentración aproximada de $5 \mu\text{M}$ propanal (Fig. 3A). Al obtener el gráfico de dobles recíprocos, se toma la línea recta en

Tabla 1

Actividad de ALDH2 humana recombinante al variar la concentración de propanal y del activador Alda-1. La concentración de NAD^+ se mantuvo constante a 1 mM .

[Propanal] (μM)	v (nmol/min/mg)			
	Alda-1 (μM) 0	2	5	20
0	0	0	0	0
1	318	227	164	136
2	388	325	294	234
5	427	444	432	427
10	451	497	521	528
20	462	514	580	629
50	500	559	654	724

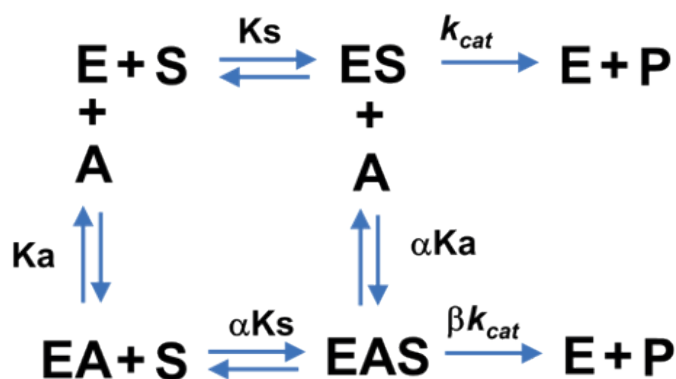


Figura 1. Esquema cinético que representa los posibles equilibrios de un activador no esencial (A), en una reacción catalizada por la enzima (E), donde el sustrato (S) es transformado a un producto (P). K_s representa la constante de disociación del complejo ES, k_{cat} es la constante de velocidad de catálisis, α es un factor adimensional que modifica a la K_s y β es un factor adimensional que afecta la velocidad de catálisis.

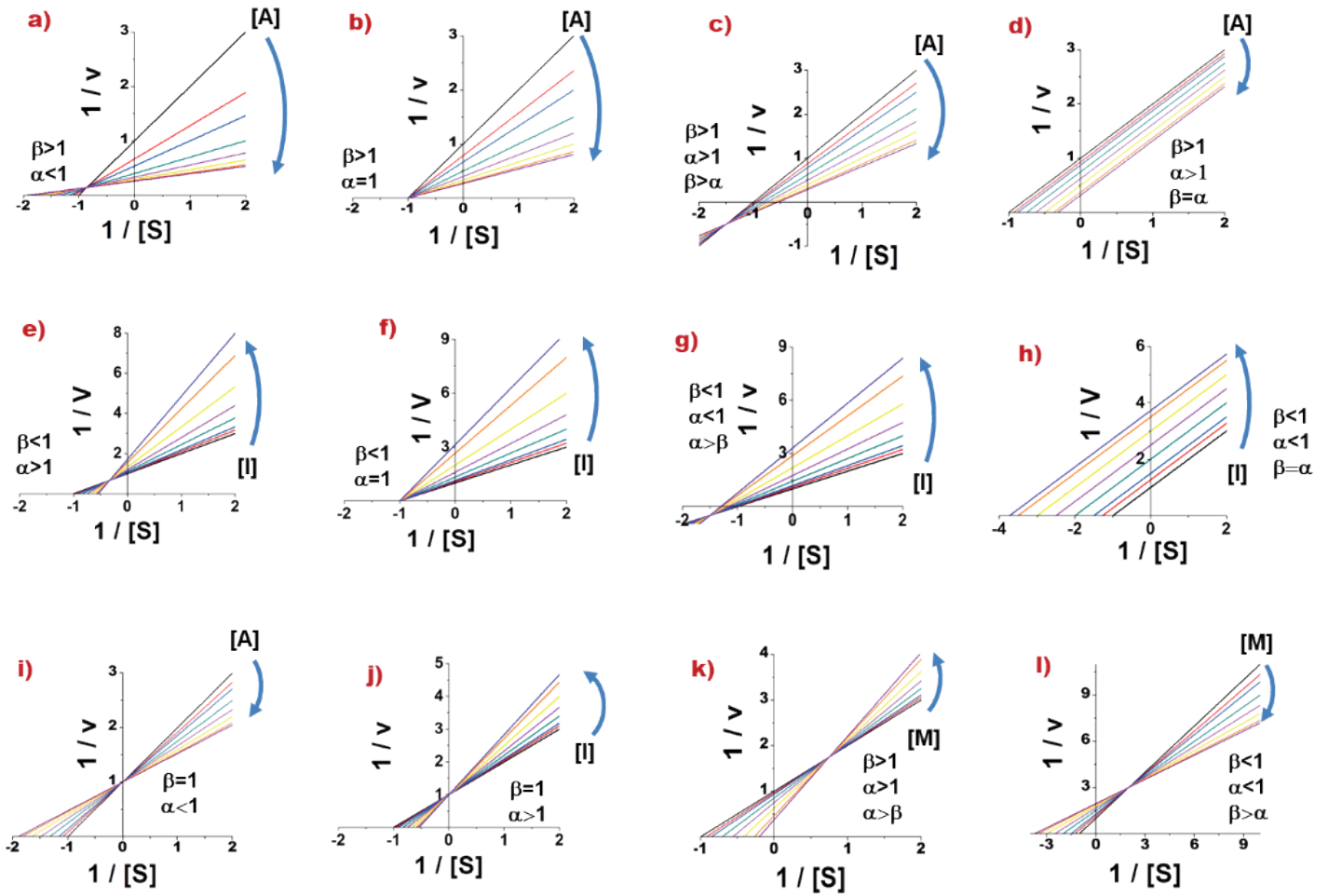


Figura 2. Patrones gráficos obtenidos a partir de la ecuación para un activador no esencial, donde [A] es la concentración de activador, [I] es la concentración de inhibidor y [M] es la concentración de modulador (una molécula con propiedades de inhibidor/activador). Las simulaciones se realizaron utilizando el software Microcal Origin ver 8.0. Las condiciones modeladas fueron: $K_s = 1$; $K_a = 1$; $V_m = 1$; [A], [I] ó [M] = variable (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10), los valores de α y β varían en cada caso.

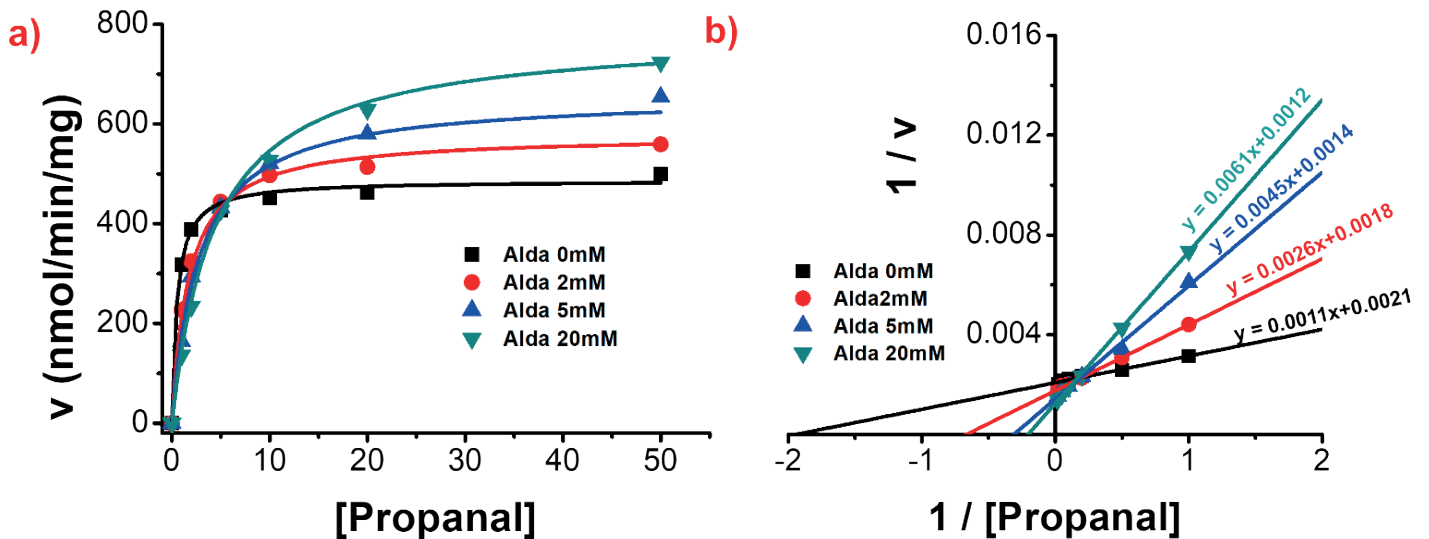


Figura 3. Gráfico directo (a) y de dobles recíprocos (b) de los datos de la actividad de ALDH2 en presencia de varias concentraciones de Alda-1. Los datos fueron obtenidos a partir de la tabla 1.

ausencia de activador y de ella se pueden calcular el valor de V_m a partir de la ordenada al origen y el valor de K_s a partir de la abscisa al origen (Fig. 3b). A partir de los términos que corresponden a la pendiente y a la ordenada al origen en la ecuación 1, se pueden crear regráficos que serán útiles para calcular los valores de α , β y K_a .

Análisis de la pendiente

La pendiente de la ecuación en su forma de dobles recíprocos (Ec. 2) se puede arreglar de la siguiente manera:

$$m = \frac{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \rightarrow$$

$$m = \frac{\alpha K_a K_s + \alpha K_s [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (5)$$

Cuando $[A]=0$ la ecuación (5) se expresa como:

$$m_0 = \frac{K_s}{V_m} \dots \dots (6)$$

Definiendo $\Delta m = m - m_0$ entonces tenemos:

$$\Delta m = m - m_0 = \frac{\alpha K_a K_s + \alpha K_s [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} - \frac{K_s}{V_m} \rightarrow$$

$$\Delta m = \frac{K_s [A] (\alpha - \beta)}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (7)$$

Al obtener el doble recíproco de la ecuación 7, se obtiene una línea recta que es de utilidad para obtener los parámetros que restan por calcular (Ec. 8).

$$\frac{1}{\Delta m} = \frac{\alpha K_a V_m}{K_s (\alpha - \beta)} \frac{1}{[A]} + \frac{\beta V_m}{K_s (\alpha - \beta)} \dots \dots (8)$$

Análisis de las ordenadas al origen

Al igual que el análisis de las pendientes, el de las ordenadas al origen nos permitirá obtener una expresión de utilidad para calcular K_a , α y β . La ordenada al origen de la Ec. 2 puede arreglarse de la siguiente manera:

$$b = \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right)}{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)} \rightarrow b = \frac{\alpha K_a + [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (7)$$

Cuando $[A]=0$ la ecuación (7) se expresa como:

$$v_0 = \frac{1}{V_m} \dots \dots (8)$$

Definiendo $\Delta b = b - b_0$ entonces tenemos:

$$\Delta b = b - b_0 = \frac{\alpha K_a + [A]}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} - \frac{1}{V_m} \rightarrow$$

$$\Delta b = \frac{[A] (1 - \beta)}{\alpha K_a V_m + \beta V_m [A]} \dots \dots (9)$$

Al obtener el doble recíproco de la ecuación 9, se obtiene una línea recta que también es de utilidad para obtener los parámetros que restan por calcular (Ec. 10)

$$\frac{1}{\Delta b} = \frac{\alpha K_a V_m}{(1 - \beta) [A]} + \frac{\beta V_m}{(1 - \beta)} \dots \dots (10)$$

Determinación de los parámetros cinéticos

- K_s y V_m

Cuando el término $[A]=0$, entonces la expresión de dobles recíprocos queda expresada de la siguiente manera:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \dots \dots (11)$$

Por lo tanto, la ordenada al origen de la recta sin activador es igual a $1/V_m$ y la abscisa al origen de la recta es $-1/K_s$, de tal forma que obtenemos los valores de la Tabla 2.

- K_a , α y β

Al obtener $1/\Delta m$ y $1/\Delta b$ a partir de las rectas de la figura 3, se obtienen los datos de la tabla 3. La grafica de $1/[Alda-1]$ vs $1/\Delta m$ ó $1/\Delta b$ da como resultado el regráfico mostrado en la figura 4. Utilizando las ecuaciones de los regráficos presentes en la figura 4, es posible obtener los parámetros faltantes (Tabla 4).

Conclusiones

El análisis de la ecuación para activadores no esenciales revela la posibilidad de la existencia de moléculas que disminuyan la afinidad de la enzima por el sustrato ($\alpha > 1$) al mismo tiempo que incrementan su velocidad máxima ($\beta > 1$), si se dan estas condiciones y además $\alpha > \beta$, entonces se obtiene una

Tabla 2

Parámetros cinéticos determinados a partir del análisis de dobles recíprocos de los datos de la tabla 1 en ausencia de activador.

Parámetro	Valor
$1/V_m$	0.0021
V_m (nmol/min/mg)	476
$-1/K_s$	-1.91
K_s (μM)	0.52

Tabla 4

Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de los datos de la figura 2.

Parámetro cinético	Valor
K_a (μM)	1.03
α	29.34
β	3.4

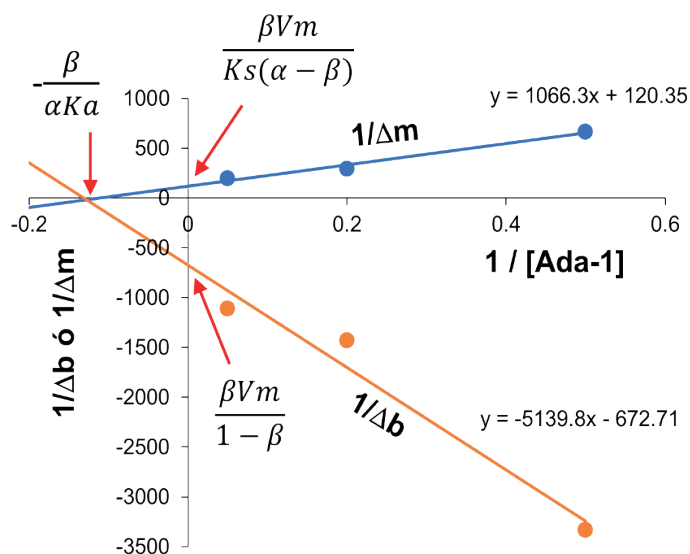


Figura 4. Re gráfico obtenido del análisis de las pendientes y de las ordenadas al origen de la ecuación de activación en su forma de dobles recíprocos. Este gráfico es útil para el cálculo de K_a , α y β . El valor de β se puede estimar a partir de la ordenada al origen del regráfico de $1/\Delta b$ vs $1/\text{Alda}$ y utilizando el valor de V_m previamente calculado. A partir de la ordenada al origen del regráfico de $1/\Delta b$ vs $1/\text{Alda}$ y puesto que se conoce el valor de la V_m , se obtiene el valor de β . Este valor se puede usar en la ordenada al origen de $1/\Delta m$ vs $1/\text{Alda}$ para obtener α , y los valores de α y β se usan en la abscisa de cualquiera de los regráficos ($1/\Delta b$ vs $1/\text{Alda}$ ó $1/\Delta m$ vs $1/\text{Alda}$) para obtener la K_a .

Tabla 3

Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de los datos de la figura 2.

[Alda-1] (μM)	m	b	Δm (m-m ₀)	Δb (b-b ₀)	1/Alda	1/Δm	1/Δb
0	0.0011	0.0021	0	0			
2	0.0026	0.0018	0.0015	-0.0003	0.5	667	-3333
5	0.0045	0.0014	0.0034	-0.0007	0.2	294	-1429
20	0.0061	0.0012	0.005	-0.0009	0.05	200	-1111

zona de inhibición y una zona de activación dependiendo de la concentración de sustrato. El caso de Alda-1 es uno de los pocos documentados donde se puede estudiar este fenómeno dual de inhibición / activación, el cual puede ser un factor muy importante para considerar en un contexto terapéutico.

Se ha propuesto que el mecanismo de protección celular por la activación de las ALDHs se debe a un incremento en la capacidad de desintoxicación de aldehídos reactivos. Dado que Alda-1 muestra una cinética dual de inhibición (en concentraciones bajas de aldehído) y activación (en concentraciones altas de aldehído) en el caso de ALDH2, entonces, es razonable pensar que el efecto protector de Alda-1 al activar a esta enzima será posible solo en condiciones donde la exposición a aldehídos reactivos sea elevada ($>5\mu\text{M}$), mientras que en condiciones de bajos niveles de aldehído ($<5\mu\text{M}$), no habrá protección por ALDH2, e incluso se podrían promover efectos nocivos.

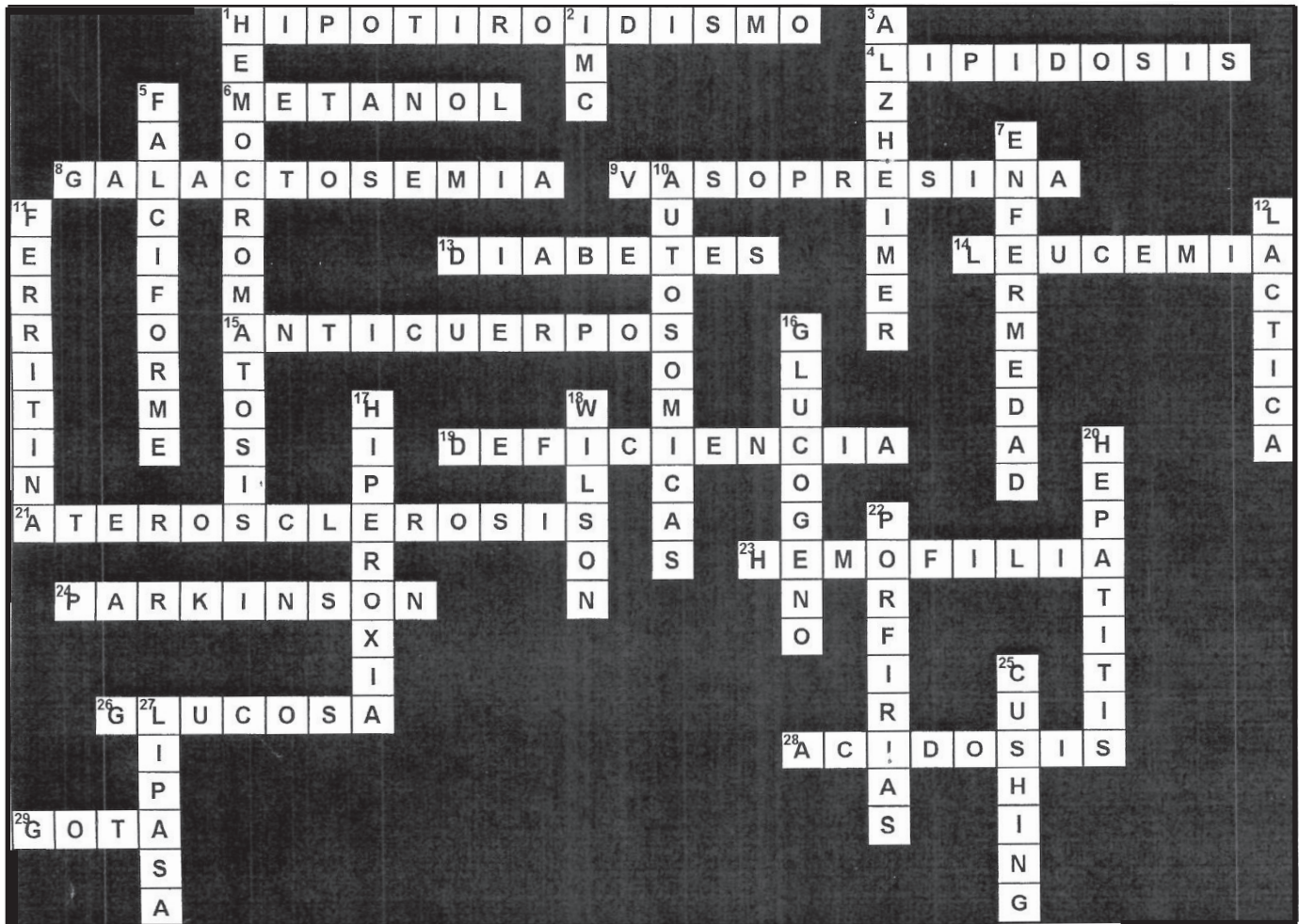
5. Referencias

- Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD & Vasiliou V (2012) Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol. Rev.* 64, 520–539.

2. Lieber CS (2004) Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34, 9–19.
3. Fritz KS & Petersen DR (2013) An Overview of the Chemistry and Biology of Reactive Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 59, 85–91.
4. Voulgaridou GP, Anastopoulos I, Franco R, Panayiotidis MI & Pappa A (2011) DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 13–27.
5. Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S & Uchida K (2001) Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: Implications for oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276, 23903–23913.
6. Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER & Mochly-Rosen D (2014) Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.* 94, 1–34.
7. Calleja LF, Yoval-Sánchez B, Hernández-Esquivel L, Gallardo-Pérez JC, Sosa-Garrocho M, Marín-Hernández Á, Jasso-Chávez R, Macías-Silva M & Rodríguez-Zavala J (2021) Activation of ALDH1A1 by omeprazole reduces cell oxidative stress damage. *FEBS J.* 288, 4064–4080.
8. Yoval-Sánchez B, Calleja LF, de la Luz Hernández-Esquivel M & Rodríguez-Zavala JS (2020) Piperlonguminine a new mitochondrial aldehyde dehydrogenase activator protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1864, 129684.
9. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD & Mochly-Rosen D (2008) Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* (80-.). 321, 1493–1495.
10. Khan M, Qiao F, Kumar P, Islam SMT, Singh AK, Won J & Singh I (2022) Neuroprotective effects of Alda-1 mitigate spinal cord injury in mice: Involvement of Alda-1-induced ALDH2 activation-mediated suppression of reactive aldehyde mechanisms. *Neural Regen. Res.* 17, 185–193.
11. Li M, Xu M, Li J, Chen L, Xu D, Tong Y, Zhang J, Wu H, Kong X & Xia Q (2018) Alda-1 ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by activating aldehyde dehydrogenase 2 and enhancing autophagy in mice. *J. Immunol. Res.* 2018, 9807139.
12. Belmont-Díaz JA, Yoval-Sánchez B, Calleja-Castañeda LF, Pardo Vázquez JP & Rodríguez-Zavala JS (2016) Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS J.* 283, 3637–3650.
13. Segel IH. (1993) Enzyme Activation. in *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* (Segel IH, ed), pp. 227–231. John Wiley & Sons Inc., New York, NY.).

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ[®] ENFERMEDADES METABÓLICAS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



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

La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La Revista está dirigida a investigadores, profesores y estudiantes de posgrado, licenciatura y educación media superior. Los trabajos que se someten a evaluación para su posible publicación no deben de haberse presentado total o parcialmente en otras publicaciones.

Se aceptan únicamente contribuciones originales con estricto contenido científico en forma de artículos de investigación, de revisión, de crítica, de análisis y otras comunicaciones que tengan que ver con diversas formas de estimular el aprendizaje de la bioquímica y sirvan de apoyo a investigadores, profesores y alumnos, tanto en aspectos de investigación, académicos y de actualización.

I. Los artículos se deben ajustar a los siguientes lineamientos editoriales:

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 departamento, institución, ciudad, estado y 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) Resumen. Se deberán incluir dos resúmenes, uno en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de 350 caracteres.

3) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.

4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada 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.

5) Referencias. Se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán por orden numérico de aparición en el texto al final del trabajo y deben incluirse en el formato "Vancouver".

Autor/es. Título del artículo. Abreviatura internacional de la revista. Año; volumen (número): página inicial-final del artículo de acuerdo con el siguiente ejemplo: Dawes J. Rowley J. Enhancing the customer experience: contributions from information technology, *J Business Res.* 2005; 36(5):350-7. Los libros deben citarse de la siguiente forma: Libro completo: Autor/es. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Por ejemplo: Bell J. *Doing your research project* 5th. ed. Maidenhead: Open University Press; 2005. Capítulo de libro: Autor/es del capítulo. Título del capítulo. En: Director/Coordinador/Editor del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial-final del capítulo. Por ejemplo: Franklin AW. Management of the problem. En: Smith SM, editor. *The maltreatment of children.* Lancaster: MTP; 2002. p. 83-85.

6) 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 pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y 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 después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

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 y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

7) Abreviaturas. Las abreviaturas seguirán las normas de la IUPAC, aquellas específicas o poco comunes deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II. Otras comunicaciones incluyen: resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, problemas teóricos, ejercicios prácticos, juegos didácticos con orientación educativa, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, entre otras. Éstas deberán seguir los siguientes lineamientos:

- 1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, 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 lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre

ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorpore en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. 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 indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá 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. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.