

Facultad de Medicina, UNAM
Departamento de Bioquímica

FACULTAD DE MEDICINA



XXX
MENSAJE
BIOQUÍMICO



*EDITORES: O. FLORES HERRERA; J. ORIA HERNÁNDEZ;
E. RENDÓN HUERTA; I. VELÁZQUEZ LÓPEZ.*

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

**OSCAR FLORES-HERRERA
ISABEL VELASQUEZ LÓPEZ
ERIKA RENDÓN HUERTA
JESÚS ORIA HERNÁNDEZ**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

VOL. XXX

2006

PORTADA

“El pasado colonial” de Juan O’Gorman (1949-1951).
Mosaico de piedras naturales. Muro Sur del edificio de la
Biblioteca Central, Ciudad Universitaria, Coyoacán.

DISEÑO DE LA PORTADA

Julieta Ambriz Laguna
Liliana Garrido

ORGANIZADOR

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNAM**

Derechos reservados conforme a la ley
©2006. Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F.

ISSN-0188-137X

MENSAJE BIOQUÍMICO es una publicación anual, editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de la Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510. Editor Responsable OSCAR FLORES-HERRERA. Número de Certificado de Licitud de Título (5552). Número de Certificado de Licitud de Contenido (4295). Número de Reserva al Título de Derechos de Autor (648-91). Distribuido por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Impreso en los Talleres de la Facultad de Medicina de la UNAM.

ÍNDICE

EDITORIAL	VII
AGRADECIMIENTOS	X
PROGRAMA	XI
LA BIBLIOTECA CENTRAL DE LA CIUDAD UNIVERSTITARIA A 50 AÑOS DE SU FUNDACIÓN	XVI
Margarita Elena Varela Ruiz EL PROFESOR DICE LO QUE SABE, ENSEÑA LO QUE ES (IDENTIFICANDO ESTILOS DE ENSEÑANZA-APRENDIZAJE)	1
Adela Rodríguez Romero, Martha Pedraza Escalona y César Augusto Reyes López ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES DE ALERGENOS DEL HULE Y DE SU INTERACCIÓN CON ANTICUERPOS	13
Gustavo Dávila y Rafael Vázquez Duhalt ENZIMAS FÚNGICAS PARA FINES AMBIENTALES	29
Jorge Manuel Vázquez Ramos EL CICLO CELULAR: MODELOS ANIMALES Y VEGETALES	57
José Vázquez Prado, Maria Luisa Guzmán Hernández, Jorge Carretero Ortega, Sandra Sánchez Barbosa, Ricardo Hernández García y Guadalupe Reyes Cruz MECANISMOS MOLECULARES DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y ANGIOGÉNESIS: PAPEL REGULADOR DE LAS GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho	77

Leonor Fernández Rivera Río LA INFORMÁTICA EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA Y DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR	105
Paola de los Heros Rios, Tomás Garzón Muvdi y Gerardo Gamba REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS POR LAS CINASAS WNK	129
José de Jesús García Trejo VIDA Y OBRA DEL DÍMERO Y EL MONÓMERO DE LA F ₁ -F ₀ -ATP SINTASA MITOCONDRIAL Y DE SUS SUCURSALES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA	147
Edgard Málaga-Trillo y Gonzalo P. Solis PROTEINAS DE PRION: DE LA PATOGÉNESIS A LA FUNCIÓN	167
Hugo A. Barrera Saldaña, Elva Aréchiga, Iram Rodríguez y Rafael González HABÍA UMA VEZ UN GEN... LA HISTORIA DE LA DRAMÁTICA EVOLUCIÓN DEL LOCUS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN PRIMATES	185



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EDITORIAL

Cuando una serie de investigadores de nivel internacional aportan sus conocimientos de vanguardia sobre sus áreas de desarrollo científico para la confección de un libro, la labor editorial es un placer y un honor que pocos pueden presumir. El papel del editor es análogo al del director de orquesta: se enfrenta al compromiso de coordinar de manera armoniosa las voces y palabras de diferentes científicos. Es necesario señalar que la edición del número XXX del Mensaje Bioquímico, Temas Bioquímicos de Vanguardia 2006, conlleva la responsabilidad que exige la tradición de una publicación de 30 años de antigüedad y que constituye la mejor colección de trabajos en el área de la bioquímica publicada en el idioma español. De esta manera, los miembros del comité editorial de este nuevo volumen del Mensaje Bioquímico agradecemos la generosa contribución de los científicos quienes además de elaborar de manera impecable una revisión científica, participan como expositores de sus avances científicos en el XXXIII Taller de Actualización Bioquímica. Este taller ha venido consolidándose como un importante foro para la difusión y actualización del conocimiento científico dentro de la comunidad universitaria del país.

En esta ocasión, presentamos la edición XXX del Libro "Mensaje Bioquímico" que publica la Facultad de Medicina desde hace tres décadas. En los últimos 5 años el comité editorial ha dado un giro a la edición de este material. Se ha cambiado el formato del libro que ahora se presenta con un formato tamaño carta en papel de mayor calidad, lo que reditúa en una mejor presentación del libro y mejora la resolución de las figuras; además, las pastas de nuestro libro son ahora plastificadas, lo que aumenta la vida útil de los ejemplares. Otro cambio importante que incluimos en las últimas ediciones del libro es la presencia de figuras a color directamente impresas por inyección de tinta. Todos estos cambios hacen a los ejemplares del "Mensaje Bioquímico" un libro muy atractivo y actualizado. Sin embargo, algunos otros cambios son de índole editorial. Por ejemplo, se ha incluido un resumen en español y otro en inglés del capítulo además de una semblanza del autor principal del capítulo así como sus direcciones tanto postal como electrónica; todo esto con la finalidad de facilitar la localización de los diferentes manuscritos de interés así como de los científicos, lo que permitiría la consolidación de lazos productivos.

La importancia de esta publicación anual ha hecho que desde el número XXVI, además de la tradicional edición en papel, se elabore la edición electrónica del mismo (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico/>), con lo que se da una mayor difusión de la obra, no sólo entre los asistentes al Taller de Bioquímica, sino entre la comunidad hispano parlante interesada en la Bioquímica. Debido a la calidad de los trabajos incluidos en estas páginas, el Mensaje Bioquímico ha sido incorporado desde el 2005 en las bases de datos PERIÓDICA y LATINDEX.

El contenido del Mensaje Bioquímico, Temas Bioquímicos de Vanguardia 2006, responde a la amplia gama de intereses que tiene la comunidad bioquímica hispanoamericana. Así pues, los investigadores invitados nos llevan a explorar diferentes tópicos de la bioquímica. En esta ocasión se organizaron las diferentes ponencias en cuatro rubros importantes: proteínas-enzimas, biología

molecular, biología celular y enseñanza de la bioquímica. Sin embargo, cabe señalar que esta organización es artificial, y que en la práctica, estas áreas de investigación se entremezclan y se complementan, produciendo un nuevo e interesante horizonte de la bioquímica, que tiene repercusión en la medicina actual, en la bio-remediación y en la educación.

Las pláticas involucradas con las proteínas-enzimas incluyen las del **Dr. Gerardo Gamba Ayala**, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, quien nos invita a explorar los mecanismos que emplea la célula para la regulación de los cotransportadores iónicos electroneutros y sus implicaciones en el control del volumen celular, la excitabilidad de las neuronas y la presión arterial. La **Dra. Adela Rodríguez Romero** del Instituto de Química de la UNAM, nos invita a conocer los avances recientes en el conocimiento molecular del fenómeno de la alergia al látex, por medio del estudio fisicoquímico y estructural de los alérgenos del hule y de su interacción con los anticuerpos. El **Dr. Ricardo García Cabazos** del Instituto Nacional de Perinatología, nos platicará sobre los marcadores bioquímicos que se encuentran en el suero materno y que permiten monitorear el bienestar materno-fetal. El **Dr. José de Jesús García Trejo**, del Instituto Nacional de Cardiología, nos platicará sobre los nuevos descubrimientos de una vieja enzima: la F_1F_0 -ATP sintasa, su participación en la estructuración de las crestas mitocondriales y su controversial localización en la membrana plasmática. El **Dr. Héctor Riveros Rosas**, de la Facultad de Medicina de la UNAM, nos platicará sobre la visión del concepto “una enzima, una función”, provocando un giro de 180° a esta idea y aportando las bases de un nuevo y más amplio concepto de las enzimas y sus funciones. Dentro de los problemas que se nos presenta a la humanidad es la remediación de nuestro entorno ecológico, y en ese campo contamos con el **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, quien nos platicará sobre las características de las enzimas de los hongos y su utilización en la bio-remediación de nuestro planeta. Por otro lado, el **Dr. Edgard Málaga Trillo**, de la Universidad de Konstanz en Alemania, nos llevará a explorar los últimos hallazgos sobre la naturaleza del prión y sus implicaciones en la medicina y la evolución.

Las pláticas sobre biología celular y molecular estarán sustentadas por el **Dr. Jorge Vázquez Ramos** de la Facultad de Química de la UNAM, quien nos presentará sobre los descubrimientos más recientes sobre los modelos celulares animales y vegetales. Un fenómeno relacionado con el ciclo celular, es la migración de las células. Para este tópico contamos con la excelente participación del **Dr. José Vázquez Prado**, del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional, quien nos hablará sobre la participación de las GTPasas de la familia Rho en la migración de las células endoteliales y su papel en la angiogénesis. Por otra parte, el **Dr. Hugo Barrera Saldaña**, de la Universidad Autónoma de Nuevo León nos conducirá por los caminos de la evolución del locus de la hormona del crecimiento en primates.

Un área de gran interés para todos aquellos involucrados en la generación del conocimiento bioquímico, es la enseñanza del mismo. Para esta sección contamos con la colaboración de la **M en C. Leonor Fernández Rivera Río**, de la Facultad de Medicina de la UNAM, quien nos platicará sobre el impacto de la informática en la enseñanza de la bioquímica y la biología molecular. La **M en C. Margarita Varela**, de la Facultad de Medicina de la UNAM, nos ayudará a conocer la manera en que el profesor puede identificar los diferentes estilos de enseñanza-aprendizaje, para mejorar la transmisión de los conocimientos. Así mismo, contamos con la participación de **Centro de Enseñanza y Certificación de Aptitudes Médicas** de la Facultad de Medicina de la UNAM, que esta a cargo del **Dr. José Alberto García Aranda**, donde se realizará una visita para conocer las instalaciones y los programas diseñados para la enseñanza y la certificación de aptitudes médicas de los egresados de la carrera de medicina.

Estamos seguros que muchos de los trabajos aquí plasmados, se convertirán en referencia obligada para todos los estudiantes de habla hispana, interesados en la Bioquímica. Esperamos además que estas revisiones sirvan a los profesores de bioquímica y contribuyan a un mejor desarrollo de su trabajo en clase.

Dentro de la celebración del XXXIII Taller de Actualización en Bioquímica y la XXX edición del Mensaje Bioquímico, queremos recordar que en este año se cumplen 50 años de la inauguración de la Biblioteca Central de nuestra Universidad; símbolo de la Ciudad Universitaria, el edificio diseñado y construido por el pintor y arquitecto mexicano Juan O'Gorman fue inaugurado el 5 de abril de 1956. En la actualidad la Biblioteca atiende alrededor de 18 mil usuarios a la semana, y continúa representando el conocimiento científico y humanístico que su proyectista plasmó en los murales que recubren sus muros exteriores. Por este motivo, la Biblioteca Central fue elegida este año como la imagen representativa del XXXIII Taller de Actualización en Bioquímica y de la XXX edición del Mensaje Bioquímico.

Junio 2006

Oscar Flores Herrera
Jesús Oria Hernández

AGRADECIMIENTOS

Para la edición e impresión del volumen XXX de la Colección “Mensaje Bioquímico” y para la organización del ciclo de conferencias del XXXIII Taller de Actualización Bioquímica 2006, es indispensable la participación de los patrocinadores. Este trabajo recibió el apoyo del **Dr. Edgar Zenteno Galindo**, Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, cuya actitud emprendedora y entusiasta lo convirtió en un organizador más del evento. También agradecemos el apoyo del Director de la Facultad de Medicina, el **Dr. José Narro Robles**, del Dr. Luis Enrique Graue Wiechers, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la FM-UNAM y de la Dra. Rosalinda Guevara, Coordinadora de Investigación de la FM-UNAM. También recibimos apoyo financiero del **posgrado en Ciencias Bioquímicas** de la UNAM sede Facultad de Química y de la Secretaria de Desarrollo Institucional de la UNAM, cuya directora es la **Dra. Rosaura Ruíz**.

En la Facultad de Medicina, agradecemos a la **Lic. Julieta Ambriz Laguna** y al personal de diseño gráfico a su cargo por el diseño de los carteles, trípticos y la portada del volumen XXX del libro “Mensaje Bioquímico”, incluyendo por supuesto la impresión de los mismos y de todas las figuras a color del libro. Al personal de la imprenta por su compromiso con el trabajo, en especial al **CP Alfonso Aguirre Herrera** y los **Sres. Félix Pacheco** y **Juan Carlos Macías**; así como al **Lic. Armando Barbosa Calderón** y al personal administrativo del Departamento de Bioquímica. Finalmente, no quisiéramos dejar de mencionar a las **Sras. Marivel Rojas García**, y **Rosa María López**, quienes de una u otra manera nos apoyaron en las diferentes etapas de organización de este evento. Dentro del programa de las visitas guiadas al CECAM-FM, agradecemos la participación de las médicas cirujanas **Magali Lozano Armendariz**, **Leticia Jaimes Betancourt**, **Guadalupe García Meraz**, **Eleonora Stainés Uria** y **Miriam Herrera Segura**.

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, UNAM

Auditorio Alfonso Caso, del 2 al 4 de agosto de 2006

MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
9:00-9:30 INAUGURACIÓN		
9:30-10:45 Dr. Gerardo Gamba Ayala Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran <i>"Regulación de los cotransportadores electroneutros por las cinasas WNK: Implicaciones para la regulación del volumen celular, de la excitabilidad neuronal y de la presión arterial"</i>	9:30-10:45 Dr. Hugo Barrera Saldaña Universidad Autónoma de Nuevo León <i>"Había una vez un gen... La historia de la dramática evolución del locus de la hormona del crecimiento en primates"</i>	9:30-10:45 Dr. Jorge Vázquez Universidad Nacional Autónoma de México <i>"Ciclo celular: modelos animales y vegetales"</i>
10:45-11:10 RECESO	10:45-11:10 RECESO	10:45-11:10 RECESO
11:10-12:25 Dra. Adela Rodríguez Romero Universidad Nacional Autónoma de México <i>"Estudios fisicoquímicos y estructurales de alérgenos de hule y de su interacción con anticuerpos"</i>	11:10-12:25 Dr. José de Jesús García Trejo Instituto Nacional de Cardiología <i>"Vida y obra del dímero y el monómero de la F_1F_0-ATP sintasa mitocondrial y de sus sucursales en la membrana plasmática"</i>	11:10-12:25 Dr. Edward Málaga Trillo Universidad Konstanz, Alemania <i>"La proteína de prión: entre vacas locas, humanos dementes y peces deformes"</i>
12:25-13:40 Dr. Ricardo García Cavazos Instituto Nacional de Perinatología <i>"Marcadores bioquímicos en suero materno para bienestar materno-fetal"</i>	12:25-13:40 Dr. Héctor Rivero Rosas Universidad Nacional Autónoma de México <i>"Proteínas: Rompiendo Paradigmas"</i>	12:25-13:40 Dr. José Vázquez Prado Instituto Politécnico Nacional <i>"Mecanismos moleculares de migración de células endoteliales y angiogénesis: Papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho"</i>
14:00-16:00 COMIDA	14:00-16:00 COMIDA	14:00-16:00 COMIDA
16:00-18:45 Dra. Margarita Varela Universidad Nacional Autónoma de México <i>"El profesor dice lo que sabe, enseña lo que es" (Identificando estilos de enseñanza-aprendizaje)</i>	16:00-17:15 Dr. Rafael Vázquez Universidad Nacional Autónoma de México <i>"Enzimas fúngicas para fines ambientales"</i>	16:00-17:15 Dra. Leonor Fernández Rivera Rio Universidad Nacional Autónoma de México <i>"La informática en la enseñanza de la bioquímica y de la biología molecular"</i>
	17:15-18:45 CECAM	17:15-18:45 CECAM

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alfonso Caso, del 2 al 4 de agosto de 2006

MIÉRCOLES

8:30 hrs Registro e Inscripciones

9:00 hrs Inauguración. **Dr. José Narro Robles**. Director de la Facultad de Medicina, UNAM.

9:15 hrs Presentación. Dr. Edgar Zenteno Galindo. Jefe del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Conferencias:

9:30-10:45

Dr. Gerardo Gamba Ayala

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

"Regulación de los cotransportadores electroneutros por las cinasas WNK: Implicaciones para la regulación del volumen celular, de la excitabilidad neuronal y de la presión arterial"

11:10-12:25

Dra. Adela Rodríguez Romero

Instituto de Química

Universidad Nacional Autónoma de México.

"Estudios fisicoquímicos y estructurales de alérgenos de hule y de su interacción con anticuerpos"

12:25-13:40

Dr. Ricardo García Cavazos

Instituto Nacional de Perinatología

"Marcadores bioquímicos en suero materno para bienestar materno-fetal"

16:00-18:45

Dra. Margarita Varela

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

"El profesor dice lo que sabe, enseña lo que es" (Identificando estilos de enseñanza-aprendizaje)

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alfonso Caso, del 2 al 4 de agosto de 2006

JUEVES

9:30-10:45

Dr. Hugo Barrera Saldaña

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

"Había una vez un gen... La historia de la dramática evolución del locus de la hormona del crecimiento en primates"

11:10-12:25

Dr. José de Jesús García Trejo

Instituto Nacional de Cardiología

"Vida y obra del dímero y el monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial y de sus sucursales en la membrana plasmática"

12:25-13:40

Dr. Héctor Rivero Rosas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

"Proteínas: Rompiendo Paradigmas"

16:00-17:15

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

"Enzimas fúngicas para fines ambientales"

17:15-18:45

Centro de Enseñanza y Certificación de Aptitudes Médicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alfonso Caso, del 2 al 4 de agosto de 2006

VIERNES

9:30-10:45

Dr. Jorge Vázquez

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

"Ciclo celular: modelos animales y vegetales"

11:10-12:25

Dr. Edward Málaga Trillo

Universidad de Konstanz Alemania

"La proteína de prión: entre vacas locas, humanos dementes y peces deformes"

12:25-13:40

Dr. José Vázquez Prado

CINVESTAV

Instituto Politécnico Nacional

"Mecanismos moleculares de migración de células endoteliales y angiogénesis: Papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho"

16:00-17:15

Dra. Leonor Fernández Rivera Rio

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

"La informática en la enseñanza de la bioquímica y de la biología molecular"

17:15-18:45

Centro de Enseñanza y Certificación de Aptitudes Médicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alfonso Caso, del 2 al 4 de agosto de 2006

Comité organizador

Oscar Flores Herrera
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
oflores@bq.unam.mx

Isabel Velásquez López
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Isabel@bq.unam.mx

Erika Rendón Huerta
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
erendon@bq.unam.mx

Jesús Oria Hernández
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
joria@bq.unam.mx



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA BIBLIOTECA CENTRAL DE LA CIUDAD UNIVERSITARIA A 50 AÑOS DE SU FUNDACIÓN

Oscar Flores-Herrera, Erika Rendón-Huerta, Isabel Velázquez-López
y Jesús Oria-Hernández

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 50-174, Ciudad Universitaria, México, D. F., México



El universo (que otros llaman la Biblioteca) se compone de un número indefinido, y tal vez infinito, de galerías hexagonales...

La biblioteca es una esfera cuyo centro cabal es cualquier hexagono, cuya circunferencia es inaccesible.

Jose Luis Borges

La Ciudad Universitaria

La publicación en 1943 de la Ley de Fundación de la Ciudad Universitaria marcó un hito en la historia de la Universidad Nacional Autónoma de México; con el decreto de expropiación de 1946, esta nueva era comenzó a tomar forma al otorgársele a nuestra Honorable Casa de Estudios una superficie de seis millones de metros cuadrados para la edificación de su nuevo *Campus Universitario*.

El Pedregal de San Ángel, ubicado en el manto del volcán *Xitle* al sur de la Ciudad de México, fue el campo fértil para el desarrollo de las ideas de Mario Pani, Enrique del Moral y Domingo García Ramos, ganadores del concurso convocado por la Escuela de Arquitectura de esta Universidad para la proyección de la Ciudad Universitaria. Los arquitectos Pani, García y Del Moral fueron los encargados del diseño del Plano de Conjunto y de la organización de los trabajos de urbanización y edificación de las nuevas instalaciones. Durante los siguientes tres años, obreros, arquitectos e ingenieros trabajaron en el mayor taller de diseño y experimentación arquitectónica para dar lugar a una de las edificaciones más bellas e innovadoras del México moderno. De esta manera, el *Xitle* cedió espacio a nuestra Universidad para permitir el desarrollo del centro de docencia, investigación y difusión de la cultura más grande de nuestro país, y probablemente de toda América Latina.



Los arquitectos y constructores deseaban mantener la tradición plástica de nuestro país, que había logrado combinar de una manera excepcional la arquitectura con el diseño artístico. En este sentido, el proyecto de la Ciudad Universitaria fue el lienzo en el que los artistas mexicanos más notables de la época: Diego Rivera, José Clemente Orozco, Jean Charlot y Fermín Revueltas entre otros, plasmaron la revolución intelectual que se germina en nuestra Universidad. Fue así como David Alfaro Siqueiros creó los grandes murales del edificio de la Rectoría, Diego Rivera el mural inconcluso del Estadio Olímpico Universitario, José Chávez Morado el mural del Auditorio de la Facultad de Ciencias, Francisco Eppens los murales de la Facultad de Odontología y de Medicina y Juan O’Gorman los relieves en los muros bajos y la ornamentación a base de piedra natural de la Biblioteca Central.

La Biblioteca Central de Ciudad Universitaria

La construcción

En 1948, el arquitecto y pintor Juan O’Gorman fue invitado para proyectar junto con los arquitectos Gustavo Saavedra y Juan Martínez de Velasco, el edificio de la Biblioteca Central. El cuerpo de la Biblioteca central se distribuye en dos volúmenes: uno desarrollado en sentido horizontal y el otro, superpuesto, en sentido vertical. El cuerpo horizontal aparece tendido contra el desnivel del terreno, y en sus fachadas alternan las fajas visibles de la estructura de piedra volcánica, para dar lugar a continuación a los espacios ocupados por vidrieras que culminan con grandes superficies de ónix translucido de color ámbar. En algunos lugares los muros son decorados con relieves de material volcánico, inspirados en el diseño del mundo prehispánico. Las fachadas del cubo del cuerpo vertical muestran en la base una franja de vidrieras y muros bajos que corresponden al piso abierto. Sobre esta base se despliegan los diez pisos adornados con el mosaico de las composiciones pictóricas que integran el monumental mural que hacen de este edificio la construcción emblemática de la Ciudad Universitaria, por ser en el que se lograron los mayores y mejores ejemplos de la integración plástica y arquitectónica.



Los colores del Grandioso Mosaico

“Desde el principio –explica O’Gorman-, tuve la idea de hacer mosaicos de piedras de colores en los muros ciegos de los acervos, con la técnica que ya tenía bien experimentada”. Para convencer al arquitecto Carlos Lazo de que le permitiera la creación del mosaico de piedra en la Biblioteca Central, O’Gorman tuvo que hacer un ensayo en la parte baja de uno de los lados de los acervos para ver cómo resultaba visto sobre el edificio, además de aceptar cobrar un precio que no superara por mucho el costo que resultaría de hacer el trabajo con vitrocota u otro tipo de material.

De esta manera, O’Gorman inició la búsqueda por toda la República Mexicana de las piedras de colores necesarias para realizar su mosaico: en Guerrero encontró los amarillos, los rojos y los negros; y en Guerrero y Guanajuato varios colores verdes. De Hidalgo trajo piedras volcánicas de color violeta y calcedonias de color rosa. En la mina llamada Pino Solo en Zacatecas, encontró una calcedonia azul. De una colección de aproximadamente 150 piedras de diferentes colores, O’Gorman seleccionó sólo aquellas que tuvieran la mayor coloración posible: un rojo Venecia, un amarillo Siena, dos rosas de diferente calidad, uno casi color salmón y el otro con tendencia al violeta; el gris oscuro del Pedregal, un color gris violáceo, la obsidiana negra y la calcedonia blanca, el mármol blanco y dos tonos de verde. Para el azul empleo vidrio coloreado en trozos y después triturado como si se tratara de piedra, o bien, hecho en placas para usarlo como se utiliza en los mosaicos de vidrio.

Con esta gama de colores le fue posible crear composiciones pictóricas con la certeza de que mientras las piedras perduraran colocadas en el muro en forma de mosaico, perdurarían también los colores. “Fue necesario recurrir a las piedras de colores naturales –explica O’Gorman- porque no hay en ninguna parte del mundo colores que puedan pintarse y que resistan la intemperie, los rayos solares, las lluvias y los cambios de temperatura”.

El diseño del Mural y la técnica constructiva aprendida en el Anahuacalli de Diego Rivera

La técnica con la que se realizó la ornamentación de los cuatro mil metros cuadrados que forman los muros de la Biblioteca central es de vital importancia, debido a que gracias a ésta, el mosaico se ha conservado intacto sin la necesidad de la más mínima intervención restauradora.

Como responsable del diseño y realización de esta obra, O’Gorman decidió fabricar en una de las bodegas de materiales de la Ciudad Universitaria un gran tablero vertical de madera sobre el cual se harían las plantillas al tamaño natural de los mosaicos. En este tablero se diseñó una cuadrícula de un metro cuadrado sobre la cual se fijaron tiras de papel grueso por medio de clavos, de tal manera que las plantillas tuvieran la medida necesaria exacta. Sobre el papel se dibujó el mosaico comenzando por la parte inferior, de acuerdo al plano en escala de 5 cm. por metro. Sin embargo, sobre el proceso de ejecución se hicieron muchas modificaciones al proyecto original, de acuerdo con cambios que fueron –según el mismo O’Gorman- necesarios para mejorar el diseño y la composición. Mientras se construían las plantillas y los dibujos, en un patio próximo al taller se almacenaban y se partían las piedras de colores que habían sido traídas de todos los rincones de la República.

De manera simultánea, en uno de los pisos de la Biblioteca en obra, se preparó una mesa especial que media todo lo largo del acervo, es decir, 48 metros, donde se harían lozas precoladas de concreto de 1 m² que servirían como plantillas para el mosaico. Sobre cada una de estas plantillas se indicaban los colores de las piedras que tenían que colocarse según el dibujo marcado. Cada plantilla tenía asignada un número y una letra que la situaba exactamente en el diseño general del mural. La pedacería de piedras de colores se colocaba sobre las plantillas y sobre esta pedacería de piedra se hacía un pequeño colado, mezcla un poco dura de cemento y arena con un poco de agua, con el propósito de que no escurriera ni manchara la parte visible del mosaico que llevaba el dibujo de la plantilla, “tal y como aprendimos –explica O’Gorman- en el Anahuacalli de Diego Rivera”.

Este pequeño precolado –continúa O’Gorman- servía simplemente para detener las piedras en su lugar, debajo de este precolado se colocaba una cuadrícula de alambón que le serviría de estructura. El precolado y la estructura metálica eran entonces colados juntos y dejados a fraguar en el piso de la biblioteca, el cual era por entonces un sitio cerrado y sin ventilación, lo que permitía conservar la humedad y hacer que el cemento fraguara con mayor dureza. Al fraguar estos mosaicos se limpiaban las superficies ornamentales de piedra y se

almacenaban hasta su colocación sobre los muros exteriores de tabique de los acervos de la Biblioteca.

Las caras externas de los muros de la Biblioteca tenían ancladas una cuadrícula de varilla de hierro, en la cual se colocarían las placas del mosaico. En el último paso en la construcción del mural, cada placa del mosaico era fijada con cuatro anclas amarradas al fierro de la cuadrícula del muro, para finalmente colar el espacio entre el muro y la placa.

Además de su grandeza arquitectónica, el mural presenta una riqueza artística inigualable. Cada una de sus caras mira hacia uno de los puntos cardinales y cada una de ellas cuenta una parte de la historia de nuestro país y nuestra Universidad. Una pequeña descripción de la obra pictórica contenida en cada uno de los muros se enumera a continuación.

La voz de los murales

Cara Norte: El pasado prehispánico



La cara norte muestra la representación que O’Gorman hizo sobre nuestro pasado prehispánico. Este mosaico es el que contiene la mayor cantidad de motivos ornamentales: próxima a la puerta de acceso de los usuarios, se puede apreciar una monumental fuente de piedra volcánica con una representación estilizada de Tláloc, dios azteca del agua. En el cuerpo del edificio, en los niveles que corresponden al área administrativa y de servicios, se observan tres franjas de murales que alternan con vidrieras. La

primera franja contiene lo que en la iconografía prehispánica se denominan “chalchiuites” o piedras preciosas representadas por caracoles marinos o círculos; la segunda tiene como motivos ornamentales peces y signos calendáricos; mientras que la tercera y de mayor dimensión que las anteriores muestra dos enormes serpientes a los lados de un signo calendárico de fuego y agua. A partir del siguiente nivel se despliega el gran cubo del edificio, donde se resguarda al acervo, y donde Juan O’Gorman liberó sus ímpetus artísticos.

El mural está dividido por un eje vertical central y dos ejes transversales, marcados por corrientes acuáticas de color azul. En estos cauces se observan canoas, peces, caracoles y culebras, elementos todos que hacen referencia al carácter lacustre de la antigua capital mexicana. En los límites de estas corrientes están los jeroglíficos de las principales ciudades que bordeaban el lago de México: Coyoacán, Churubusco, Ixtapalapa, Xochimilco, Azcapotzalco y Tacuba.

La fundación de Tenochtitlán se recrea en la parte central de la composición: se puede observar el islote donde la tribu nómada de los mexicas descubrió a un águila posada sobre un

nopal que les hace entrega de la tierra, simbolizada por una serpiente. Este momento estelar de la tradición mexicana es presenciado por los tlatoanis de México-Tenochtitlán, que aparecen distribuidos simétricamente a los lados, acompañados de sus respectivos jeroglíficos. Un detalle significativo de la escena se refiere a un nopal en un cerro que lleva en su parte anterior el escudo de la guerra y se asienta sobre las fauces estilizadas del Cipactli, el monstruo de la tierra.

Los espacios delimitados por los ejes acuáticos están llenos de figuras inspiradas en los códices nahuas, ordenadas en dos campos, a la izquierda y derecha del eje central, según su orden simbólico. En el lado izquierdo, que se encuentra dominado por el sol Tonatiuh, aparecen deidades y escenas que en la mitología prehispánica tenían relación con los aspectos más luminosos y positivos de la vida; por el contrario, el lado derecho custodiado por la luna, tiene representado deidades y escenas referentes al ámbito de lo negativo y tenebroso, la oscuridad y la muerte.

En la parte más alta de la mitad derecha, junto al sol, aparece el dios Quetzalcóatl, la serpiente emplumada, que lleva en las ondulaciones de su cuerpo las mazorcas de maíz y las vírgulas enlazadas que simbolizan el fuego, factores fundamentales en las culturas de Mesoamérica. Enmarcadas por el cuerpo de la serpiente se observan dos divinidades mesoamericanas: Tláloc, dios de la lluvia, que aparece entre una planta de maíz situada a sus espaldas y un manantial sobre su cabeza, para transformarse en Quetzalcóatl, en su representación humana. En la parte media de esta mitad del muro norte, entre las corrientes acuáticas superior e inferior, se muestra Tlazoltéotl, la diosa del parto y de la agricultura, quien es escoltada por el águila solar y el jaguar de la noche, acompañados de sus respectivos símbolos. A la derecha se tiene a Ehécatl, dios del viento, sentado dentro de un templo, quien sopla a través de un caracol. La franja inferior del mural está ocupada por músicos y danzantes que acompañan a un sacerdote en una ceremonia propiciatoria.

La serpiente del lado derecho tiene su equilibrio con la representación de Quetzalcóatl en forma de serpiente del lado izquierdo. El cuerpo de esta nueva serpiente lleva discos de chalchihuites y secciones de caracol. Aunado a esto se observa una calavera junto al dios Tezcatlipoca, el dios cojo, el sembrador de discordia, el invisible y omnipresente dios del mal. Por atrás de éste se tiene a Chalchiutlicue, diosa del agua y hermana de Tláloc. En la parte central del mural y entre las dos corrientes acuáticas se ve a Tlahuizalpantecuhtli, el lucero de la mañana, Venus, una de las muchas advocaciones de Quetzalcóatl y que muestra su dualidad de vida y muerte. A su espalda, el jeroglífico de un cerro, rodeado por serpientes y fragmentos de cuerpos humanos, alude a diversos rituales mágicos importantes en la cultura de Mesoamérica.

La parte inferior está decorada por un grupo de guerreros cubiertos de pieles de animales y que van armados de macanas y "chimalis" (escudos). El eje central está constituido, de arriba a abajo, por el sol, en cuyos rayos inferiores se sugiere el rostro de Tláloc por medio de unos discos; representando así al calor y lluvia, elementos tan esenciales para la vida de aquellos pueblos prehispánicos. Uno de los rayos solares se posa sobre un enorme cuchillo de sacrificio en el cual aparecen los dieciocho signos de los meses del calendario náhuatl. Dos manos emergen de los extremos del pedernal, la izquierda lleva en la palma una simiente, una mazorca de maíz, mientras que la derecha lleva el chorro de sangre del autosacrificio.

En el extremo inferior derecho del lado norte del gran mural, aparece la firma del artista y la fecha de terminación de los trabajos: Juan O'Gorman 1952.

Cara Sur: El pasado colonial



El muro sur tiene representado nuestro pasado colonial. Este mosaico está marcado por la distribución de figuras a partir de una faja o columna de motivos centrales y de dos grandes discos laterales; proponiendo una visión del mundo europeo en conjunción con el indígena y su fusión para generar el mundo colonial novohispano. Se muestran los fundamentos del pensamiento español de esa época, marcados por la contradicción entre Dios y el Demonio, entre la religiosidad y la mundanidad, como cimiento de su cultura.

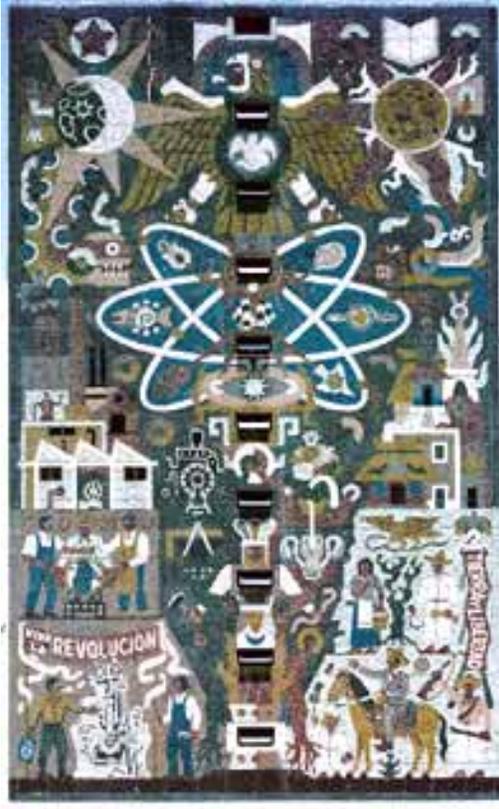
Este conjunto está presidido por un escudo de la casa de Habsburgo, que gobernaba España en la época del descubrimiento y conquista de América. Del escudo emergen dos brazos, uno con una espada y otro con una cruz. Este escudo está rodeado por figuras de entre las que destacan las fechas de inicio y culminación del virreinato de México (1521-1820). Hacia abajo, en la serie vertical de motivos se observa el par de Columnas de Hércules, donde se lee parte del lema de la misma casa reinante (*Non plus ultra*); entre estas columnas se observa un templo griego sobre un templo cristiano colonial del que parecen salir las manos sangrantes de Cristo redentor asociadas a una fortaleza y a un templo. Estos motivos muestran la disposición del mural: del lado derecho las armas y frutos de la guerra; del izquierdo, los frutos de la cultura más o menos constructora.

En los vértices superiores se observan motivos de la luna y el sol, próximos a una serie de figuras que recuerdan al mundo prehispánico y colonial. Las dos grandes circunferencias que resaltan en los campos laterales hacen alusión a la concepción geocéntrica de Ptolomeo (en el campo dominado por la luna) y heliocéntrica de Copérnico (en el campo dominado por el sol), rodeadas respectivamente por los signos de las constelaciones y del Zodíaco. Debajo de estos discos se pueden observar un plano de la antigua Tenochtitlán en la versión del mapa de Nuremberg de 1525 y la imagen del águila que cae, recuerdo de Cuauhtémoc, el último gobernante mexicano.

Hacia los lados y por debajo de los discos de Copérnico y Ptolomeo hay muchas figuras que subrayan el aspecto civil y religioso de la conquista española. Entre estas figuras destacan la de Hernán Cortés y la del primer arzobispo de México, Fray Juan de Zumárraga. También se observa la escena de la quema de los códices mayas realizada por órdenes del obispo de Yucatán, Fray Diego de Landa. En contrapartida a esta escena, en la parte baja del lado derecho está representado el soberano señor español otorgando a los indígenas las Leyes de Indias, teniendo como testigo un estandarte en el que aparece la imagen de la Virgen de Guadalupe.

Dentro de toda esta iconografía, O'Gorman nos ofrece una alusión a la pintura popular mexicana, que le era tan querida, por medio de diferentes encarnaciones de ángeles y alguna del diablo, algunas iglesias, fortalezas, escudos y cañones.

Cara Oriente: El mundo contemporáneo



El mundo contemporáneo está plasmado en el muro oriente. El mural está regido por el átomo como el centro de la nueva cosmovisión, que aparece también como el principio generador de la energía vital de los vegetales, las aves, los peces, los reptiles y el hombre, y de la energía de los minerales que se encuentran dentro de sus orbitas.

En la parte superior del mural aparece el sol y la luna como representación de la eterna dualidad; en particular, la dualidad representada simboliza la vida y la muerte. Sobre esta dualidad se muestran dos símbolos referidos a la realidad histórica del mundo contemporáneo: la estrella roja del socialismo y el libro abierto de la cultura. O'Gorman emplea nuevamente las oposiciones complementarias de la realidad mexicana: del lado izquierdo representa al mundo obrero, industrial, transformador, y a su contraparte del lado derecho: el mundo rural, tradicional, conservador. En este sentido, en el lado izquierdo se representa a las fábricas, la producción industrial y en una bandolera el lema "Viva la revolución"; en el lado derecho se ve la imagen de la casa tradicional del campesino mexicano, los frutos de la tierra y una pareja de indígenas con su vestimenta típica, que sirve de marco a la presencia del caudillo Emiliano

Zapata quien avanza a caballo acompañado de un revolucionario que enarbola una bandera con el lema que identifica la lucha agraria de este caudillo: "Tierra y Libertad".

En la parte superior del átomo reaparece el símbolo de Cuauhtémoc unido a la figura de la paloma de la paz, en una alegoría que integra la representación del átomo y del fuego, creador y destructor. En la parte baja una figura hunde sus raíces en la tierra, uniendo estos dos conceptos de la historia de México.

Cara Poniente: La Universidad y el México actual

El muro poniente tiene en su parte central, por encima del paisaje del Valle de México y dominando la composición, el escudo de la Universidad Nacional Autónoma de México creado en 1921 durante el rectorado de José Vasconcelos. En la parte superior izquierda se observa un libro abierto y en sus páginas las iniciales de la Biblioteca Central, mientras que del lado derecho, en un pergamino, se observan las iniciales de la Hemeroteca Nacional.

Nuevamente, O'Gorman define a partir del escudo de la Universidad un eje central y dos lados simétricos en los que plasma las actividades creativas y recreativas de esta casa de estudios. La sabiduría brota de una enorme fuente la cual es el referente inmediato a Tláloc, omnipresente en todo el mosaico del edificio. El lado izquierdo nos muestra la vestimenta tradicional del pueblo mexicano que es una alusión al origen popular y proletario de profesores, investigadores y estudiantes de la Universidad, así como a la permanencia y vitalidad de nuestra

cultura. Se puede apreciar una pequeña construcción piramidal, reminiscencia de los grandiosos templos prehispánicos.



El mosaico del lado derecho tiene como objetivo el reforzar la presencia de la Universidad en el México contemporáneo, de manera que se representen las diversas áreas en las que participa la Universidad: la ciencia, la técnica y el deporte; ésta última representada por los aros olímpicos y la leyenda de la primera participación de México y los deportistas universitarios en la justa olímpica en la ciudad de París. Además, hay figuras que sugieren dos actitudes universitarias: el estudio y la recreación, la creación del conocimiento y el entretenimiento creativo y positivo.

Por último y como remate del edificio, se tiene la estructura que soporta el mecanismo de los elevadores para los usuarios del edificio. Cada lado está ornamentado con algún motivo del resto del edificio. El lado norte tiene la representación del rostro de Tláloc enmarcado por unas manos. El lado sur representa una mano que sostiene un libro abierto, flanqueado por la cabeza de un guerrero mexicana. En los lados oriente y poniente se muestran representaciones de cabezas de guerreros prehispánicos.

Reseña del Arquitecto Juan O’Gorman



La mejor imagen de Juan O’Gorman es su autorretrato fechado en 1950, quizá la obra más original e imaginativa de la pintura mexicana de la primera mitad del siglo XX.

Juan O’Gorman nació en Coyacán, D. F. el 6 de julio de 1905. Estudió la carrera de arquitectura en la Universidad Nacional Autónoma de México; aprendió pintura con su padre el ingeniero de origen irlandés Cecil O’Gorman. Uno de sus primeros trabajos de pintura mural fue la decoración, en 1925, de tres pulquerías. En 1928 inició la construcción de la casa estudio de Diego Rivera en San Ángel, años después construyó para el mismo artista el Anahuacalli, edificio que resguarda la colección de figuras prehispánicas que Rivera donó al pueblo de México. De 1932 a 1934 trabajó como arquitecto construyendo 35 escuelas primarias y técnicas de inspiración funcionalista para la Secretaría de Educación Pública. También realizó murales en el Museo Nacional de Antropología, los cuales ilustran la historia de la aviación;

murales en el aeropuerto de Ciudad de México, dos de los tres paneles de este mural fueron retirados en 1939 por su carácter anticlerical y antifascista. De 1942 a 1948 hizo pintura de caballete. Entre 1949 y 1951 proyectó y dirigió la construcción de la Biblioteca Central en la Ciudad Universitaria, edificio con un mosaico de 4 mil metros cuadrados de superficie recubierto de piedras naturales. En 1950 expuso en el Palacio de Bellas Artes 100 pinturas de caballete. Su obra como muralista incluye, entre otros, los siguientes trabajos: la Biblioteca Gertrudis Bocanegra de Pátzcuaro, Michoacán; el Retablo de la Independencia en el Museo Nacional de Historia del Castillo de Chapultepec y la Sala de la Revolución del mismo Museo; así como trabajos en Chile y Estados Unidos. En 1972 recibió el Premio Nacional de Arte por su obra pictórica. Juan O’Gorman murió en la Ciudad de México en el año de 1982. Muchos de sus trabajos reflejan la historia de México, de la Revolución Mexicana, de la historia de los mayas y de los aztecas y de diferentes situaciones políticas, tales como separación de la iglesia y del estado. La Academia de Arte hizo las gestiones correspondientes para que se le rindiera homenaje a los restos del arquitecto y pintor Juan O’Gorman, en virtud de que fue el instaurador y principal propulsor de un movimiento arquitectónico, cuyos alcances socioculturales se aprecian notoriamente en la arquitectura del México contemporáneo. Sus restos descansan en la Rotonda de los Hombres Ilustres.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

ESTILOS DE APRENDIZAJE

Margarita Elena Varela Ruiz

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

Domicilio: Heriberto Frías 1450-502, Col del Valle.

Deleg. Benito Juárez. C P 03100. México, D.F.

Teléfonos: oficina 56 23 21 96. Casa 56 04 69 06

Fax: 56 23 23 99

Correo: magavarelar@yahoo.com.mx

Abstract

The purpose of this article is to encourage its readers to reflect about their own learning styles and turn this everyday experience into an opportunity for insight, allowing the identification of their learning strengths and weaknesses, so that setbacks can be taken to advantage and their potential fully realized.

A learning style is the way a person receives, processes, integrates and retrieves information. It is the behavior that shows how the learning is accomplished. A learning style calls on cognitive and emotional areas, character traits, and the particular inclinations we have in receiving and responding to information.

Since the 1970s, when research on learning styles began, there have been a number of approaches and classifications based on the way information is received, processed or integrated. Six of these approaches are described in this article.

1) The VAK model is based on the way information is received, and its classifications are: visual, aural, and kinesthetic. 2) It describes Neil Fleming's VARK model, but adds one more learning style: visual, aural, kinesthetic and read-write. 3) It refers to Kolb's learning model and questionnaire. It is based on the preferred ways of processing and handling information. 4) The Honey-Alonso questionnaire is based on Kolb's 4-fold learning model and labels students as active, reflective, theoretical, and pragmatic. 5) The Newble & Entwistle model classifies students under superficial, deep, or strategic learning. It has been applied in some research on medical

students. 6) *The last approach is based on whether information is processed in the left, right, or both sides of the brain.*

In general, all approaches aim at a better understanding of the learning process, thus realizing the student full potential for optimum learning results.

Keywords: Learning, learning styles, metacognition, medical students.

Introducción

Howard Gardner en su libro *Mentes Extraordinarias* [1] menciona “las personas extraordinarias sobresalen en la medida en que reflexionan -a menudo explícitamente- sobre los acontecimientos de su propia vida, ya sean grandes o pequeños”. El autor descubre que una experiencia común en las personas triunfadoras, en su campo de acción, es el talento que poseen para identificar sus propias cualidades y debilidades. Se refiere a la capacidad de explorar la propia vida y las experiencias cotidianas. Gardner considera que el análisis puede ayudar a descubrir la excepcionalidad en cada uno de nosotros. Parece interesante transportar esta idea a la formación de docentes en el área de la salud. De inmediato, en el enfoque cognitivo de la educación, aparece una idea paralela: la metacognición.

La metacognición se puede entender como el conocimiento de la propia manera de aprender y de pensar. Se define como la cognición de la cognición, el conocimiento sobre cómo se conoce [2]. Esto implica que el individuo identifique las estrategias que utiliza en su manera de aprender, de tal manera que sea capaz de planificar, monitorear y evaluar su propio proceso de aprender en función de un objetivo trazado o exigido para una determinada tarea. La metacognición conlleva trazar un plan de acción con una secuencia de actividades organizadas. El saber lo que se tiene que hacer para aprender y para controlar los resultados del aprendizaje, también se puede expresar como: *aprender a aprender*.

Es frecuente que el aprender se convierta en una actividad mecánica realizada de manera automática, llevando a cabo una serie de acciones de las cuales no se tiene total conciencia. Cuando lo que se hace para aprender deja de ser inconsciente y se convierte en una cuidadosa planeación cuyos resultados se pueden medir, es decir, cuando el aprendizaje se maneja como un proceso activo, reflexivo y controlado, entonces, se está hablando de metacognición [3]. Flavell (citado por Diaz Barriga, 1998) reconoce tres tipos de variables en la metacognición:

- a) La variable de la persona, se refiere a los conocimientos y creencias que cada quien tiene sobre sus propias capacidades y limitaciones para aprender.
- b) La variable de la tarea, es el conocimiento que se tiene sobre las características de la tarea en sí (estudiar para un examen, preparar una conferencia, comprender una definición, buscar datos para sustentar un proyecto, etc.) y lo que dicha tarea o actividad demanda.
- c) La variable de estrategias, implica conocer diversas técnicas para llevar a buen cumplimiento la demanda cognitiva en una tarea.

El estilo de aprendizaje está estrechamente vinculado a la metacognición, y en especial con las variables de la persona; el estilo de aprendizaje se define como la manera en que la persona percibe, procesa, integra y recuerda información. Para Matthews y Hamby (1995) [4] el estilo de aprendizaje es la manera en que aprendemos y nos adaptamos al ambiente. Son las conductas que indican cómo se aprende. El estilo de aprender integra al área cognitiva, afectiva,

rasgos de personalidad y la orientación particular que tenemos al percibir, interpretar y responder ante la información.

Regresando a nuestro punto de partida con Howard Gardner, el propósito de este artículo es invitar a los lectores a reflexionar sobre su propio estilo de aprendizaje y hacer de esta experiencia cotidiana un espacio de introspección que permita identificar las cualidades y debilidades al aprender, de tal manera que se pueda sacar provecho de los reveses y explotar al máximo las cualidades.

Vale la pena aclarar que en todo acto humano hay una combinación del contenido o esencia del acto y la manera, forma o estilo en que se desempeña dicho acto. La esencia del acto es lo que se hace, así como el nivel o grado del valor de la acción, en tanto que el estilo del acto describe la forma o manera como se lleva a cabo dicha acción. Los estilos se presentan con cierta consistencia y regularidad, y hay estilos que predominan en ciertas etapas de la vida y otros que se mantienen a lo largo de toda la vida. En relación a los estilos de aprendizaje se observa que hay una orientación consistente para aprender y estudiar, aunque se puede modificar a través de la experiencia reflexiva.

Desde la década de los 70s, en que se inició la investigación en los estilos de aprendizaje, han surgido diversos enfoques y clasificaciones de los estilos de aprendizaje según se centren en la manera de percibir, de procesar o de integrar la información. En general todas las aproximaciones buscan tener una mejor comprensión del proceso de aprender y con ello maximizar las propias cualidades para lograr mejores resultados en el aprendizaje.

En este artículo se describen algunos de estos modelos.

- El primero de ellos es el modelo VAK, el cual tiene como eje la manera de percibir la información. Su clasificación comprende tres estilos: visual, auditivo y kinestésico.
- En segundo lugar se describe el modelo VARK de Neil Fleming cuya clasificación contiene cuatro estilos: visual, auditivo, leer / escribir y kinestésico. En este modelo, se basa en cómo se recibe e interpreta la información.
- El tercer apartado se refiere al modelo de aprendizaje de Kolb y el cuestionario que él realiza con una clasificación de cuatro tipos de estudiantes: convergente, divergente, acomodador y asimilador. Su eje es la manera preferida para integrar y manejar la información.
- Con el número cuatro se encuentra una explicación del cuestionario de Honey – Alonso. El eje es el modelo de las cuatro fases del aprendizaje de Kolb y clasifica a los estudiantes en: activo, reflexivo, teórico y pragmático.
- En el lugar cinco se presenta el modelo de Newble y Entwistle. Aquí se clasifica a los estudiantes en: aprendizaje superficial, profundo y estratégico. El modelo está muy relacionado con la motivación y con las actitudes frente al aprender.
- Finalmente se revisa la manera en que se procesa la información según se utilice preferentemente el hemisferio cerebral derecho, el izquierdo o ambos.

1. El modelo VAK

Para tener una mejor comprensión del proceso de la comunicación humana, a finales de la década de los 70s se desarrolló una aproximación denominada Programación Neurolingüística; entre sus propósitos estaba el comprender como se recibe e interpreta la información del entorno. Con base en los hallazgos de esta propuesta, Colin Rose fundamenta tres estilos para recibir información. Sostiene que una manera de iniciar el aprendizaje es a través de la percepción de un cierto estímulo. Se ha identificado que en cada persona predomina un estilo de percibir y de conocer la realidad según el sistema de representación que utilice de manera preferente:

- a. visual,
- b. auditivo y
- c. kinestésico.

Generalmente una de estas preferencias se utiliza más, otro se utiliza un poco menos y el otro casi no se utiliza.

1. En el **estilo visual** se tiene un mayor recuerdo de imágenes, el entorno se capta a través de los ojos. Por lo general, las personas visuales se caracterizan por ser ordenadas y cuidadosas. Cuando asisten a clases o conferencias les gusta que se muestren imágenes, esquemas, fotografías y contar con textos escritos. Aprenden leyendo y tienen facilidad para recordar escenas vistas.
2. En el **estilo auditivo**, se aprende más fácilmente al escuchar; el entorno se capta a través del oído. Los estudiantes auditivos por lo general, tienen una amplia vida interna, suelen ser buenos conversadores y sus explicaciones tienden a ser detalladas. Cuando asisten a clases o conferencias tienen facilidad para recordar lo dicho por el ponente. A veces memorizan rítmicamente la información y, cuando se olvidan de una palabra, se rompe la secuencia y pueden olvidar el resto de la información. Aprenden escuchando y tiene facilidad para recordar diálogos.
3. En el **estilo kinestésico** predomina la percepción de sensaciones y emociones, a los individuos de esta categoría les es más fácil aprender haciendo, experimentando y les agrada el trabajo en equipo. Suelen ser impulsivos y demostrar fácilmente las emociones (ira, molestia, alegría). Les gusta cambiar de lugar y de postura cuando están estudiando. No recuerdan todos los detalles, pero sí recuerdan más fácilmente la impresión general y las sensaciones que les causan las lecturas o las personas. En sus notas o cuadernos es frecuente encontrar dibujos que realizan mientras escuchan al profesor. Tienen facilidad para trabajar en grupo.

2. El modelo VARK de Fleming

Con base en la idea de cómo las personas reciben la información e incorporando otros estudios del tema para tener un enfoque con mayor sustento, Neil Fleming (1992) [5] elaboró un cuestionario que proporciona un perfil de las preferencias de cómo las personas les gusta recibir la información y cómo ofrecen las respuestas. El instrumento conformado de 13 preguntas y con cuatro opciones de respuesta se integra, a su vez, en cuatro categorías: Visual, Auditivo, Leer/escribir y Kinestésico y sus combinaciones:

- a) La *preferencia visual* se refiere a adquirir la información a través de imágenes, representaciones gráficas que incluyan cuadros, flechas o símbolos.
- b) En la *preferencia auditiva* predomina la capacidad de “escuchar” y a las estudiantes se les facilita aprender en conferencias y al dialogar con sus compañeros.
- c) En la *preferencia leer/escribir* es cuando se percibe más fácilmente la información mostrada en palabras escritas. Esta modalidad suele ser fuerte en muchos profesores y es característica de la enseñanza occidental.
- d) Al *kinestésico* le favorece el aprendizaje práctico, se le facilita aprender haciendo o experimentando en el mundo.

Fleming encuentra diferencias entre los estudiantes universitarios y los profesores. Los profesores tienden a la preferencia leer/escribir y los estudiantes a la kinestésica. Así mismo, la mayoría de los estudiantes (alrededor del 70%) son multimodales, ya sea por la combinación de dos, tres o las cuatro preferencias. Sin embargo estos resultados se pueden modificar según la disciplina que se esté estudiando, por ejemplo se observó que los estudiantes del área de humanidades son preferentemente del estilo leer/ escribir y los del área de farmacología son

multimodales. El autor sugiere que pueden también existir diferencias entre las diversas culturas.

Fleming argumenta que los profesores que se adaptan a las preferencias de sus estudiantes para recibir información, les facilitan un mejor aprendizaje, con respecto a aquellos profesores que utilizan estrategias de enseñanza basadas en su propio estilo de aprender. Esto significa que el profesor debe identificar su estilo de aprendizaje y conocer la diversidad de estrategias que atienden a diferentes preferencias. En este sentido, Bonwell y Eison (citados por Fleming) [6] realizan una propuesta para un aprendizaje activo, sus recomendaciones encajan con la idea de Fleming de un profesor capaz de aplicar estrategias para distintas maneras de aprender. Para promover un aprendizaje activo, los autores consideran cinco características:

1. Involucrar a los estudiantes en un proceso que no sólo implique escuchar.
2. Hacer menos énfasis en transmitir información y mayor énfasis en desarrollar habilidades del estudiante (por ejemplo, búsqueda y selección de información, sintetizar información, hacer preguntas, organizar información en mapas conceptuales o mapas mentales autoevaluarse, reflexionar y corregir los errores).
3. Involucrar a los estudiantes en procesos mentales superiores (análisis, síntesis y evaluación).
4. Llevar a los estudiantes a realizar actividades (por ejemplo, leer, argumentar, escribir, resolver problemas).
5. Se hace especial énfasis en promover en los estudiantes la exploración de sus propios valores y actitudes.

Estas sugerencias implican que el profesor durante una sesión de enseñanza enriquezca la exposición con pausas para demostraciones, ejercicios, interrogatorios y otras actividades del estudiante. Por ejemplo, que se utilice una instrucción con apoyos visuales, revisar escritos durante las clases, organizar debates, enfrentar a los alumnos a la solución de problemas y llevar a cabo actividades de aprendizaje colaborativo.

El cuestionario VARK es un componente del estilo de aprendizaje que se refiere a la manera de percibir el mundo a través de los sentidos. Permite que los profesores identifiquen su manera de percibir y la de sus estudiantes. Es una alternativa para iniciar el autoconocimiento y la reflexión sobre el estilo de aprender.

3. El modelo de aprendizaje de Kolb

Para David Kolb el aprendizaje es un ciclo con cuatro componentes a saber:

- a) Hacer (activo)
- b) Reflexionar (reflexivo)
- c) Abstraer (teórico)
- d) Decidir (pragmático)

Con base en estos cuatro componentes del aprender, Kolb desarrolla un cuestionario que mide dos polos de su ciclo (Fig. 1). Por un lado, contrasta a los estudiantes que tienen preferencia por aprender a través de experiencias concretas (activo) con aquellos que tienen una preferencia por aprender mediante la abstracción (teórico). Y por otro lado contrasta la preferencia por la observación pasiva (reflexivo) con la preferencia por un aprendizaje a través de la actividad (pragmático). De esta manera el instrumento define cuatro estilos del aprendizaje:

1. Divergente, que se caracteriza por un aprendizaje mediante experiencias concretas.

2. Asimilador, que se refiere al aprender preferentemente a través de la observación reflexiva.
3. Convergente, que explica a quienes para aprender hacen uso de la conceptualización abstracta.
4. Acomodadores, que define al estudiante que aprende principalmente a través de la experimentación activa.

Ciclo de aprendizaje de Kolb



Figura 1. Los cuatro componentes del ciclo de aprendizaje de Kolb.

El éxito académico de los estudiantes de medicina en los primeros años de la carrera esta asociado al estilo convergente, esto es debido a que se caracteriza por el uso de estrategias analíticas y hace énfasis en el método deductivo, los cuales son herramientas fundamentales para el aprendizaje de las ciencias básicas de la medicina.

4. El Cuestionario de Honey y Alonso

El cuestionario de Honey Alonso, sobre los estilos de aprendizaje, se base en el ciclo de aprendizaje de David Kolb y mide la preferencia por uno de los cuatro momentos del aprendizaje: activo, reflexivo, teórico y pragmático [7]. Al aprender se circula por estas cuatro fases, pero puede ocurrir el predominio de una de éstas y determinar un estilo:

1. Hacer o actuar. El estilo activo se caracteriza por la actividad, por ejemplo la búsqueda y selección de información.
2. Reflexionar. El estilo reflexivo se caracteriza por la atención y recapitación de la información.
3. Abstraer. El estilo teórico se caracteriza por introducir la información en marcos teóricos.
4. Decidir o experimentar. El estilo pragmático es el momento en que se aplica la información.-

Los autores aplicaron el cuestionario en 25 escuelas y facultades pertenecientes a la Universidad Complutense y Politécnica de Madrid y entre sus conclusiones están:

- Los estilos de aprendizaje pueden variar de acuerdo a la edad y al sexo.
- Los estilos de los padres se relacionan con los estilos de los hijos.
- Los estudiantes que trabajan tienden al estilo pragmático.
- Los estudiantes de Bachillerato con calificaciones altas en las asignaturas del área de Letras puntúan alto en el estilo activo

- Los estudiantes de Bachillerato con calificaciones altas en Ciencias Básicas puntúan alto en el estilo reflexivo y pragmático.

Cada estilo de aprendizaje tiene ciertas preferencias:

- a) A los estudiantes activos les gustan las tareas nuevas. Siempre se involucran en actividades diferentes. Les atrae trabajar con otras personas tratando de ser el centro de las actividades. No les gusta trabajar en metas a largo plazo ya que prefieren buscar nuevos retos, dejando tareas inconclusas. Se les describe como animadores, entusiastas, improvisadores y arriesgados.
- b) Los estudiantes reflexivos se caracterizan por analizar cuidadosamente todas las situaciones, por lo que buscan datos y diversos puntos de vista antes de tomar una decisión. Piensan antes de actuar, son observadores y tienen capacidad de escucha. Cuando se les apresura se sienten presionados e incómodos. Se les describe como analíticos, observadores, pacientes, previsores e investigadores.
- c) Los estudiantes teóricos piensan paso a paso, integrando la información de manera secuencial y luego en forma lógica. En ellos predomina la racionalidad por lo que rechazan lo subjetivo e intuitivo. Se caracterizan por ser metódicos, estructurados, disciplinados y perfeccionistas.
- d) Los estudiantes pragmáticos aplican las ideas que aprenden. Les aburren las discusiones largas y prefieren poner en práctica de manera inmediata las ideas. Encuentran en forma rápida lo funcional y positivo de las cosas. Se caracterizan por ser directos, eficaces, realistas y buscar la información útil.

Al aplicar este cuestionario a estudiantes de primer año de la carrera de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, se detectó que los estudiantes tienden a ser reflexivos, en segundo lugar teóricos, pero son menos pragmáticos y poco activos [8]. *Activo* es el primer momento en el aprender y es fundamental para buscar información y trabajar con ella, en tanto que *pragmático* significa poder aplicar la información aprendida. Los estudiantes de primer año de medicina trabajan preferentemente con los pasos intermedios y no logran completar el ciclo del aprendizaje. Una manera de favorecer el equilibrio en el estilo de estos alumnos podría ser el estimular el interés por trabajar en nuevas tareas y para trabajar en grupo.

5. El modelo de Newble y Entwistle

Newble y Entwistle (Pintrich, 1998) [9] sostienen que los estudiantes pueden adoptar tres enfoques diferentes al aprender:

1. **El enfoque superficial**, se identifica por el intento de memorizar en forma mecánica o repetitiva. El estudiante se centra en hechos específicos o detalles sin la búsqueda de conexiones. Su intención principal es acreditar el curso y hay cierto temor al fracaso; por ello, el estudiante se limita a estudiar aquellos contenidos que serán evaluados. Generalmente no disfruta el aprendizaje, debido a que suele sentir que el aprendizaje es una imposición externa.
2. **El enfoque profundo** conlleva una búsqueda por comprender, relaciona ideas con conocimientos o experiencias previas. El estudiante investiga argumentos y hay un intento por contemplar los aspectos generales o globales. Generalmente se disfruta el aprendizaje y se acompaña de una actitud crítica y reflexiva. Hay una intención por comprender los conocimientos, lo que lleva a que la nueva información se relacione con los conocimientos previamente adquiridos.

3. **El aprendizaje estratégico** está fundamentalmente dirigido al éxito. El estudiante busca obtener buenas calificaciones, dar una buena impresión a los profesores y asume una actitud de competencia con sus compañeros. La intención es obtener las notas más altas posibles y sobresalir en un grupo.

El modelo está estrechamente vinculado a la orientación intrínseca o extrínseca de la meta que los estudiantes pretenden alcanzar. Cuando hay una motivación extrínseca, los estudiantes se dirigen a las calificaciones, los premios, el reconocimiento y la aprobación de las personas. Cuando la motivación tiene metas intrínsecas los estudiantes actúan fundamentalmente por el reto, la superación, la maestría y la curiosidad.

Quienes tienen metas intrínsecas suelen estar interesados en la adquisición de nuevas habilidades y en mejorar sus conocimientos, por ello, están dispuestos a utilizar estrategias de autorregulación y su aprendizaje es más del estilo profundo. Por otro lado, quienes tienen una orientación hacia metas extrínsecas o de rendimiento tratan de demostrar a los demás sus habilidades y se interesan en obtener valoraciones positivas de su capacidad, pero no tienen predisposición para emplear estrategias de autorregulación y su estilo de aprendizaje es más superficial. En el caso del estilo estratégico, la motivación contiene tanto metas internas como externas, sin embargo hay un predominio de motivación extrínseca.

Se ha encontrado que entre más jóvenes son los estudiantes que inician la carrera de medicina tienden al aprendizaje superficial [10]. Es decir, hay una relación entre la inexperiencia de los jóvenes y el estudio superficial. Esto sugiere que los estudiantes que ingresan a las escuelas de medicina en las menores edades posibles son intrínsecamente distintos de quienes ingresan a medicina con edades mayores por haber realizado previamente otros estudios. Por otro lado, la investigación de Clarke y McKenzie [11], al utilizar un cuestionario que cuantifica esta clasificación de estilos de aprendizaje demuestra, como cabría esperarse, que los estudiantes de medicina que tienen un estilo profundo obtienen mayor rendimiento en los exámenes, aunque los resultados también indican que junto al estilo de aprender hay una serie de factores no definidos que interactúan en el rendimiento del estudiante.

6. Hemisferio derecho y hemisferio izquierdo

Cuando en 1981 Robert Sperry ganó el premio Nobel abrió un campo de investigación sobre el papel de los hemisferios cerebrales en el procesamiento de la información. Los avances científicos y técnicos han permitido corroborar, con bastante precisión, la especialización que presentan los hemisferios (derecho e izquierdo) para hacerse cargo de tareas específicas asignando a cada uno de ellos funciones predominantes.

El hemisferio cerebral izquierdo se ha calificado como analítico, debido a que procesa la información de manera lógica, paso a paso. Le da sentido a la información a través de descomponer o separar sus elementos para encontrar sus características fundamentales. Las funciones del lenguaje, la habilidad verbal, el razonamiento lógico y el pensamiento analítico están relacionadas con este hemisferio. Algunos conceptos que se asocian al hemisferio izquierdo son:

- Análisis
- Comprensión y manejo de símbolos
- Lógica
- Pensamiento lineal (ordenado y paso a paso)
- Razonamiento deductivo
- Matemático

* En la Facultad de Medicina de la UNAM esta edad es de 17 y 18 años.

- Estabilidad
- Minuciosidad
- Preciso y detallista

El hemisferio cerebral derecho es calificado como creativo, porque procesa la información de manera más integral, en estructuras y conjuntos más que en partes y detalles. Es el hemisferio de la intuición, la capacidad creadora y la imaginación. Se especializa en la percepción del espacio, la visualización y la creatividad. Gran parte de las capacidades artísticas corresponden a este hemisferio ya que los ritmos, colores, los sueños y la imaginación se le asocian. Algunos conceptos que se relacionan al hemisferio cerebral derecho son:

- Intuitivo
- Artista
- Síntesis
- Visión global o general
- Emotivo
- Creativo
- Simultáneo (diversidad de actividades e intereses al mismo tiempo)
- Vive al instante
- Contacto humano

En el funcionamiento cerebral de hombre y mujeres se han encontrado diferencias. Anatómicamente en el género masculino, el hemisferio cerebral derecho está más desarrollado que el izquierdo. Es frecuente encontrar en los hombres un buen sentido espacial y sus reacciones, por lo general, son rápidas y muestran con mayor frecuencia agresión.

Las mujeres anatómicamente presentan menos asimetría entre los dos hemisferios, aunque el hemisferio cerebral izquierdo tiene mayor desarrollo que el derecho. Las mujeres por lo general tienen mayor facilidad para el manejo verbal, suelen ser menos agresivas y pueden tener la habilidad de atender a dos situaciones distintas al mismo tiempo. También se ha encontrado que las mujeres cuentan con más habilidad para la previsión, organización y planificación que los hombres.

Sin embargo, estas diferencias genéticas entre hombres y mujeres sufren modificaciones por la plasticidad del cerebro. Esto quiere decir que las tendencias genéticas se modifican por la influencia del entorno familiar, escolar, social y cultural.

Ontoria, Gómez y Molina [12] argumentan que el sistema educativo occidental y la sociedad moderna discriminan al hemisferio cerebral derecho, ya que lo consideran menos importante por no ser verbal ni matemático. Al dominar el modelo científico el énfasis se pone en la lógica, en el pensamiento analítico y en la confirmación empírica, sin embargo, al mismo tiempo cada día se hace más evidente la importancia de la integración de los dos hemisferios en busca de una mayor y mejor capacidad de aprender, al incorporar en el análisis y el razonamiento lógico, la creatividad, intuición e imaginación.

Conclusiones

Los modelos presentados son un asomo a los diversos enfoques que se están desarrollando para comprender el complejo proceso del aprendizaje y sus resultados. Se han revisado como invitación a la reflexión y a la búsqueda del autoconocimiento. El autoconocimiento facilita el conocimiento de los otros y favorece la flexibilidad en las relaciones. Los profesores son modelos y vínculos para favorecer el desempeño de los estudiantes, se

encuentran de manera cotidiana en un intercambio con los estudiantes y pueden observar los estilos de aprendizaje en sus estudiantes y apoyarlos en su autoconocimiento.

Dicho de otra manera, la reflexión sobre la manera en que percibimos, procesamos e integramos la nueva información nos ayuda a conocer nuestro estilo de aprender. Conocer el estilo de aprender mejora la capacidad para aprender porque permite controlar y dirigir el proceso. Así mismo, cuando los profesores identifican su propio estilo se favorece la comprensión y la comunicación con sus estudiantes y con otras personas.

Referencias

1. Gardner H (1998) *Mentes Extraordinarias. Cuatro retratos para descubrir nuestra propia excepcionalidad.* Editorial Kairos. Barcelona. pp. 26 y ss.
2. Mayor J, Suengas A y González Marqués J ((1995) *Estrategias metacognitivas. Aprender a aprender y aprender a pensar.* Editorial Síntesis. Madrid. p. 51.
3. Varela M y, Fortoul T (2003) *El reto de los estudiantes de medicina.* Editorial Médica Panamericana. México. p.22
4. Matthews B.D. and Hamby V.J. (1995). A comparison of the learning styles of high school and college/university students. *The Clearing House.* Vol, 68. pp. 257-261.
5. Fleming N.D. and Mills C (1992) Not another inventory, rather a catalyst for reflection. To improve the academy. Vol, 11 pp. 137 – 149.
6. Fleming, N (2001) *Teaching and learning styles. VARK strategies.* Published by the author. New Zealand. pp. 27 y 28.
7. Alonso MC, Gallegi JD y Money P (1999) *Los estilos de aprendizaje.* Ediciones Mensajero. Bilbao.
8. Fortoul TI (2004). *El desarrollo equilibrado de los estilos de aprendizaje y el uso de las nuevas tecnologías en los estudiantes de primer año de la carrera de médico cirujano en la Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para optar por el grado de Maestra en Comunicación y Tecnología Educativa presentada en el Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa.*
9. Pintrich, P. (1998) "El papel de la motivación en el aprendizaje académico autorregulado" en Sandra Castañeda (comp.) *Evaluación y fomento del desarrollo intelectual en la enseñanza de las ciencias, artes y técnicas. Perspectiva Internacional.* Facultad de Psicología / CONACYT / Miguel Porrúa. México.
10. Aaron S y Skakun E. Correlation of students' characteristics with their learning styles as they begin medical school. *Academic Medicine* Vol, 74 No. 3 pp. 260-262.
11. Clarke DM y Mckenzie P (1994). Learning approaches as a predictor of examination results in preclinical medical students. *Medical Teacher,* Vol, 16 Nos. 2 –3.pp. 221-227.
12. Ontoria, Gómez y Molina (2003) *Potenciar la capacidad de aprender a aprender.* Alfaomega y Narcea Ediciones. México.

ESTILOS DE APRENDIZAJE

Resumen

El propósito de este artículo es invitar a los lectores a reflexionar sobre su propio estilo de aprendizaje y hacer de esta experiencia cotidiana un espacio de introspección que permita identificar cualidades y debilidades al aprender, de tal manera, que se pueda sacar provecho de los reveses y explotar al máximo las cualidades.

El estilo de aprendizaje se define como la manera en que la persona percibe, procesa, integra y recuerda la información. Son las conductas que indican cómo se aprende. El estilo de aprender integra al área cognitiva, afectiva, rasgos de personalidad y la orientación particular que tenemos al percibir, interpretar y responder ante la información.

Desde la década de los 70s, en que se inició la investigación en los estilos de aprendizaje, han surgido diversos enfoques y clasificaciones según se centren en la manera de

percibir, de procesar o de integrar la información. En este artículo se describen seis de estos modelos.

1) El modelo VAK, su eje es la manera de percibir la información y su clasificación comprende tres estilos: visual, auditivo y kinestésico. 2) El modelo VARK de Neil Fleming cuya clasificación es semejante a la anterior, sólo agrega un estilo más: leer / escribir. 3) El modelo de aprendizaje de Kolb y su cuestionario. Su eje es la manera preferida para integrar y manejar información. 4) El modelo de Honey – Alonso tiene como eje el modelo de las cuatro fases del aprendizaje de Kolb y clasifica a los estudiantes en: activo, reflexivo, teórico y pragmático. 5) El modelo de Newble y Entwistle que clasifica a los estudiantes en: aprendizaje superficial, profundo y estratégico, se ha aplicado en diversas investigaciones con estudiantes de medicina. 6) Finalmente el modelo que revisa la manera en que se procesa la información según se utilice preferentemente el hemisferio cerebral derecho, el izquierdo o ambos.

En general todas las aproximaciones buscan tener una mejor comprensión del proceso de aprender y con ello maximizar las propias cualidades para lograr mejores resultados en el aprendizaje.

Palabras clave: Aprendizaje, estilos de aprendizaje, metacognición, estudiantes de medicina.

Semblanza de la Dra. Margarita Varela Ruiz.



Psicóloga de formación egresada de la Facultad de Psicología de la UNAM, pero educadora de corazón. Preocupada por conocer el por qué del fracaso escolar y encontrar las mejores estrategias para el aprendizaje y la enseñanza. Esto la ha llevado a buscar opciones en el constructivismo y en el uso de las nuevas tecnologías, que fue el tema de su maestría en comunicación y tecnología educativa por el ILCE. Ese amor por la sabiduría, también la ha acercado a la Filosofía, con quién tiene pendiente cerrar un compromiso. Autora de varios artículos y coautora en dos libros, “el reto del estudiante de medicina” que ofrece herramientas para la vida universitaria y para cumplir satisfactoriamente con las exigencias académicas y “memoria: definición, función y juego para la enseñanza de la medicina” donde se resume historia, conocimiento, arte y juego de los modelos cognitivos de la memoria. Actualmente labora como personal de carrera en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA INFORMÁTICA EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA Y DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Leonor Fernández Rivera Río

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina U N A M. Apartado Postal 70-159, CP 04510, México D. F. Tel. 5623 2304

[e-mail:leonor.fernandez@hotmail.com](mailto:leonor.fernandez@hotmail.com)

Abstract

Informatics is very important tool for data processing, image generation, and communication. Students, teachers and researchers get information easily by using Internet widely. Biochemistry is a quick growing science with difficult fundamental abstract concepts and informatics is a very good tool for favoring its understanding.

In this work, several Internet sites that favor Biochemistry learning are analyzed.

The Biochemistry and Molecular Biology Department at Facultad de Medicina UNAM, started the development of Computer aided Instruction programs whose aim is to favor Biochemistry learning. Programs so far developed are in the site "Aprende Bioquímica" in the Internet and have free access. These programs cover structure and physical chemistry of biomolecules, metabolic pathways, and virtual laboratory practices. Thanks to CHIME, it has three-dimensional representations of simple and complex molecules. There are other teaching tools at this page that include "Bioquímica y Biología Molecular en Línea", an on line book, the "Mensaje Bioquímico", an annual review publication, and Revista de Educación Bioquímica a quarterly journal about biochemical education. Internet allows access to multiple sites such as

RasMol, Protein Data Bank, that are very important tools for studying protein and nucleic acid structures by displaying three dimensional molecular structures.

Informatics use in teaching biochemistry and other sciences is recognized to be a very efficient method to access up to date information and to facilitate learning abstract and difficult concepts, to minimize distance between teaching institutions and students and to increase idea interchange.

Development of more and better programs to ease learning is an area of scientific and technological research that is modifying the way people do research and communicate.

Keywords: Biochemistry, Computer aided instruction, Biomolecule Structure, Tridimensional models, Distant education.

Introducción

La informática ha llegado a ser una herramienta fundamental en el área de la comunicación, el procesamiento de datos, la generación de imágenes, etc., por lo que su uso en el proceso enseñanza – aprendizaje se hace cada vez más intenso.

Un gran porcentaje de la población mundial usa la Internet cada vez con mayor frecuencia, ya que por medio de los buscadores se consigue la información en segundos y además es posible comunicarse con los autores por medio del correo electrónico. Dentro de esa población, los estudiantes, docentes e investigadores han encontrado una opción válida para la adquisición de información científica.

La Bioquímica es una ciencia abstracta que se basa en la construcción de modelos para la comprensión y la organización de los conocimientos acerca de las estructuras moleculares y de las vías metabólicas, por lo que el uso de herramientas que permiten las representaciones gráficas de modelos moleculares o de mapas que muestren a las vías metabólicas y sus relaciones, tiende a hacer más fácil la comprensión de algunos conceptos.

Las ciencias han avanzado en forma acelerada por la aparición de numerosos desarrollos tecnológicos; en el caso de la Bioquímica y de la Biología Molecular, los avances en diferentes técnicas y disciplinas relacionadas como el PCR y los secuenciadores automáticos, han dado lugar a un aumento explosivo en la producción de datos experimentales que se almacenan y organizan en bases de datos públicas a las que se accede libremente por medio de la Internet y están ahora al alcance de muchas más personas.

La interpretación de los datos es posible por el desarrollo de la Bioinformática que en el caso de la Bioquímica y de la Biología Molecular ha facilitado la organización de los datos experimentales que permite la construcción de modelos moleculares y el análisis de las secuencias de aminoácidos en los polipéptidos y de las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos.

Los profesores de Bioquímica y de Biología Molecular tienen a la mano conocimientos actualizados publicados en la Internet y pueden orientar a los estudiantes en la adquisición de éstos.

El proceso enseñanza – aprendizaje se hace más fácil debido a que los estudiantes pueden hacer pesquisas bibliográficas y búsquedas de datos (archivos .pdb, por ejemplo) acerca

de los temas de los cursos, lo que en teoría, debe aumentar el aprendizaje significativo y favorecer el uso de los conocimientos para solucionar problemas relacionados con la materia.

Objetivo de este trabajo

El objetivo de este trabajo es hacer un resumen acerca de las diferentes técnicas y de los sitios de red en donde se presentan revistas, bases de datos, visualizadores de moléculas, programas tutoriales, simulaciones, etc., para dar a los profesores de Bioquímica y de Biología Molecular un panorama general de las herramientas y recursos que se tienen para favorecer el aprendizaje de estas disciplinas; a continuación se enumeran algunas de las herramientas que están en la red Internet y que pueden ser usadas por profesores y estudiantes para facilitar el aprendizaje de la Bioquímica y la Biología Molecular.

Se inicia la revisión con el análisis de los recursos que se ofrecen en el portal de Internet del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM

<http://bq.unam.mx>

Esta página en español tiene ligas para diferentes páginas con orientación hacia la docencia:

Docencia ***Aprende Bioquímica***

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~leonor/>

Con el fin de promover el aprendizaje independiente y de ayudar a mejorar la enseñanza de Bioquímica en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, se han desarrollado programas de instrucción asistida por computadora.

“Aprende Bioquímica” es un sitio en Internet cuya autora es M. en C. Leonor Fernández Rivera Ríos, que fundó el Laboratorio de Diseño y Evaluación de Programas para la Enseñanza de Bioquímica en 1993. La hipótesis de trabajo que sirvió como marco a este proyecto es que las computadoras, y en general la informática, deberían facilitar la comprensión de los conceptos y el aprendizaje de esta ciencia [1 – 3].

La informática facilita el acceso a la información y permite las representaciones gráficas de modelos, lo que facilita la comprensión de algunos conceptos muy importantes en el estudio de la bioquímica como son las estructuras moleculares, las reacciones bioquímicas y las relaciones que se establecen entre las reacciones que se llevan a cabo en las vías metabólicas.

Los programas de autoría como el Authorware Professional de Macromedia, son una herramienta valiosa en el desarrollo de programas para la enseñanza, porque permiten el intercambio de información y facilitan la interacción entre el usuario y la computadora.

Por medio de los visualizadores de moléculas como RasMol, Chime, Protein Explorer y otros, es posible observar a las moléculas en tercera dimensión y rotarlas por medio del ratón de la computadora; además de que los ácidos nucleicos y las proteínas se pueden visualizar en formas diferentes (cordón, listón, caricatura, etc.) que permiten apreciar en forma fácil sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias; a través de estos programas es posible rotar a las moléculas usando el ratón de la computadora, también se pueden diferenciar las estructuras secundarias (alfa hélice, beta plegada y estructura irrepetible) porque se pintan de colores diferentes según el tipo de estructura; cuando se trata de una proteína polimérica, los péptidos que la forman se pintan de diferente color.

El desarrollo de páginas para la red Internet y la posibilidad de incrustar objetos en ellas, ha permitido que los programas desarrollados se puedan incorporar a los portales de Internet, con lo que la difusión de éstos se hace muy fácil y económica.

El diseño de los programas para la enseñanza asistida por computadora debe cumplir con la función de hacer que la instrucción se adquiriera en forma fácil, divertida y eficiente; para esto los programas deberán ser capaces de atrapar al usuario.

Para que los programas para la enseñanza asistida por computadora cumplan su función, su diseño y desarrollo deben cumplir con los siguientes requerimientos:

- Identificar el perfil del usuario.
- Establecer los conocimientos y habilidades que dichos usuarios deberán tener antes de usar el programa.
- Establecer cuáles son los conocimientos y habilidades que los usuarios van a adquirir al usar el programa.
- Seleccionar los temas que se requieran para lograr los aprendizajes deseados.
- Seleccionar las estrategias de instrucción que se usarán; estas pueden ser tutoriales, heurísticas o de descubrimiento, simulaciones de prácticas o de procedimientos, etc.
- Diseñar la estructura del programa.
- Diseñar la interfase usuario – computadora, que tiene que ser fácil de usar, agradable, amigable y atractiva.
- Elaborar el programa.
- Evaluar la interacción entre los usuarios y la computadora.
- Evaluar los aprendizajes adquiridos por medio del uso del programa.
- Insertar el programa en una página de red.
- Evaluar el uso del programa en la red.

Las estrategias instruccionales se deben adaptar a los temas que se intentan desarrollar. En el caso de la Bioquímica, la estrategia tutorial se seleccionó para los temas relacionados con las características fisicoquímicas de los compuestos; para las vías metabólicas se seleccionó una estrategia heurística que favorece el aprendizaje por medio del descubrimiento. Para la evaluación de los programas se diseñó un examen con diez niveles de dificultad, cada uno

contiene entre cinco y diez preguntas, y en ellos se evalúan las competencias del usuario para resolver problemas relacionados con el tema en estudio.

Los programas desarrollados por este proyecto, son los siguientes:

Programas tutoriales y heurísticos:

“pH” Versión 2000.

Este es un programa de tipo tutorial en donde se describe la reacción de disociación de la molécula de agua, la formación de los iones hidrónio y oxhidrilo, las características más importantes de los logaritmos, cómo se mide el pH, cómo se calcula el pH, etc. El programa tiene una sección de autoevaluación en el cálculo del pH o de la concentración de iones hidronio y también un examen multi - nivel.

“Los aminoácidos” Versión 2001.

Este es un programa de tipo tutorial en donde se describen las características más importantes de los aminoácidos, los diferentes tipos de aminoácidos que hay, el comportamiento de los aminoácidos en diferentes pH; los conceptos de pK_{COOH} , pK_{NH} y pK_R son analizados con base en las constantes de disociación de los diferentes grupos. Este programa tiene un examen, que puede servir para la evaluación de los alumnos o para que los alumnos se autoevalúen.

“Sistemas Amortiguadores” Versión 2002.

Es un programa de tipo tutorial en el que se describen las características más importantes de los sistemas amortiguadores de pH y los conceptos teóricos acerca de las reacciones entre ácidos débiles y base. También se describen los sistemas que usan los mamíferos para mantener el pH y el papel que juegan las concentraciones de CO_2 y la actividad de la enzima anhidrasa carbónica. La información se presenta en forma fácil de entender y se usan animaciones que facilitan la comprensión de las reacciones de disociación de los ácidos débiles.

“Los carbohidratos” Versión 2000.

En este programa de tipo tutorial se describen las características más importantes de los carbohidratos, sus grupos funcionales, su clasificación, la estereo – isomería y la actividad óptica. El usuario se expone a resolver problemas relacionados con el tema y también tiene un examen multi - nivel integrado.

“Los Lípidos” Versión 2001.

Este es un programa de tipo heurístico cuyo objetivo es proveer a los docentes y a los estudiantes con información que les permita repasar los conceptos teóricos acerca de la

estructura de los lípidos en forma fácil y divertida. Este programa tiene un examen multi - nivel que permite la auto - evaluación de los conocimientos y la evaluación de la efectividad del programa.

“Los Nucleótidos” Versión 2004.

Este es un programa de tipo heurístico cuyo objetivo es proveer a los docentes y a los estudiantes con información que les permita repasar fácilmente los conceptos teóricos acerca de la estructura de los nucleótidos y de las coenzimas que participan en algunas de las reacciones metabólicas. Este programa tiene un examen que permite la auto-evaluación de los conocimientos y la evaluación de la efectividad del programa.

“Estructura de las Proteínas” Versión 2004.

En este programa se revisan los conceptos más importantes acerca de la estructura de las proteínas. Se presentan ventanas en donde es posible visualizar a las moléculas de los aminoácidos en tercera dimensión y es posible representarlos en diferentes formas. La estructura de las proteínas se puede analizar gracias al visualizador de moléculas CHIME.

“Digestión y transporte de carbohidratos” Versión 1996.

Este programa es de tipo heurístico y el usuario selecciona en un mapa metabólico cuáles son los tópicos que desea revisar; en el se usa el hipertexto para algunas de las explicaciones. En este programa se estudia la digestión y el transporte de carbohidratos así como el efecto de algunas hormonas sobre el control de la glicemia.

“Glucólisis y glucogenolisis” Versión 2001.

En este programa de tipo heurístico el usuario puede seleccionar la profundidad con la que quiere estudiar cada subtema a partir de un mapa metabólico. Los mapas metabólicos que representan a la glucólisis y a la glucogenolisis, permiten que el usuario acceda al estudio de las reacciones y de las características más importantes de las enzimas que las catalizan, así como de los sustratos y de las coenzimas que intervienen en cada reacción enzimática de la vía. Este programa tiene un examen multi - nivel que sirve para medir la competencia del usuario para la resolución de problemas relacionados con el tema de la glucólisis.

“El ciclo de Krebs” Versión 2001.

En este programa de tipo heurístico, se intenta que el usuario descubra el ciclo de Krebs y su relación con la glucólisis, la síntesis y degradación de los ácidos grasos y de los aminoácidos. Este programa permite al usuario evaluar su aprendizaje porque tiene incluido un examen computarizado de tipo multi - nivel.

“Beta oxidación” Versión 2001.

En este programa el usuario descubre los pasos metabólicos que participan en la oxidación de los ácidos grasos y las relaciones de esta vía con la glucólisis y con la síntesis de los ácidos grasos. El enfoque es heurístico. Este programa permite al usuario evaluar su aprendizaje porque tiene incluido un examen computarizado de tipo multi- nivel.

“Beta reducción” Versión 2001.

En este programa el usuario estudia los pasos metabólicos que participan en la síntesis de los ácidos grasos y las relaciones de esta vía con la glucólisis y la degradación de ácidos grasos. El enfoque es heurístico. Este programa permite al usuario evaluar su aprendizaje porque tiene incluido un examen computarizado de tipo multi-nivel.

“Catabolismo de los Aminoácidos” Versión 2001.

Este programa provee estudiantes y docentes con información que permite el análisis de los aspectos más importantes sobre el catabolismo de los aminoácidos y la gluconeogénesis. El programa tiene un examen multi - nivel que permite la auto evaluación de los logros de aprendizaje del usuario.

“Síntesis de cuerpos cetónicos y del colesterol” Versión 2001.

En este programa presenta los pasos metabólicos que participan en la síntesis del colesterol y de los cuerpos cetónicos y la relación que este proceso tiene con padecimientos como diabetes e hipercolesterolemia. El enfoque es heurístico.

Los programas que simulan a prácticas de laboratorio son:

“El efecto de la Insulina sobre la glicemia de la rata”, Versión 2001.

En este programa se simula una práctica de laboratorio real, que en otras épocas se practicaba en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Esta simulación tiene la virtud de recrear un proceso que tomaba varias horas y que usaba muchas ratas, reactivos y aparatos, en menos de una hora y se puede repetir todas las veces que se considere necesario. El programa tiene un simulador que genera los datos en el momento de la práctica, lo que hace que no haya dos prácticas con resultados iguales y los datos pueden ser sometidos a un análisis estadístico. Para evaluar el rendimiento instruccional del programa, los alumnos tienen que reportar sus resultados y contestar preguntas que tienen que ver con los aspectos teóricos y con la interpretación de los resultados.

“El efecto del tetracloruro de carbono sobre los niveles de las transaminasas en sangre de la rata”. Versión 2001.

Este programa es una práctica virtual, en donde se simula la intoxicación con tetracloruro de carbono. Esta práctica se llevó a cabo originalmente como parte de un curso para Instructores

de Bioquímica y luego se tomaron los datos reales para hacer esta simulación. La práctica dura un total de treinta horas virtuales en las cuales es posible observar el aumento paulatino de los niveles de la enzima alanina amino transferasa, por medio de determinaciones que se llevan a cabo en la sangre de la rata cada seis horas virtuales. El ejercicio en la computadora se puede llevar a cabo en dos horas aproximadamente. Los datos se generan en cada experimento, por lo que no hay dos experimentos idénticos, además de hacer posible el tratamiento estadístico de los mismos. Los alumnos deben reportar los resultados de la práctica y contestar a las preguntas que se les formulan en su guía.

“El efecto del etanol sobre la lipoperoxidación en el hígado de la rata. Versión 2001.

Este programa es la simulación de un experimento que se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Martha Zentella de Piña del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, [4] en la que se muestran los efectos del etanol sobre la producción de radicales libres en el hígado de la rata. En este experimento se recrean todos los pasos experimentales que siguieron los autores de este trabajo y los resultados obtenidos en el mismo. El programa trata también los fundamentos fisicoquímicos de la espectrofotometría y de cómo se usa esta herramienta para determinar las concentraciones de algunas sustancias. La determinación de las concentraciones de proteínas también se revisa y se lleva a cabo. Los alumnos deben de hacer los cálculos y reportar los resultados obtenidos en el experimento; también deben contestar las preguntas de un cuestionario. El experimento virtual se hace en aproximadamente 2 horas, en la vida real, el experimento toma más de 24 horas y el sacrificio de muchas ratas.

Los resultados de las evaluaciones de los programas obtenidos hasta la fecha indican que los alumnos incrementan su capacidad para resolver problemas relacionados con el programa que han consultado además de gastar menos tiempo en resolver las preguntas de las evaluaciones, lo que indica que estos programas son útiles como una herramienta adicional para favorecer el aprendizaje de la Bioquímica [5-6].

La evaluación el uso de los programas en la red se puede consultar en la dirección <http://www.webstats4u.com/s?tab=1&link=1&id=1854505> que desde el 13 de enero del 2003 a la fecha ha sido visitado por más de 85,000 personas. Las consultas se han hecho desde México, España, Uruguay, Perú, Estados Unidos, Colombia, Chile, Argentina, Venezuela, Bolivia y otros.

Bioquímica y Biología Molecular en Línea

Libro “Bioquímica y Biología Molecular en Línea”

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/>

El libro electrónico cuyo autor es el Dr. Edgar Vázquez Contreras que permite repasar en forma fácil los temas más importantes de un curso de Bioquímica y de Biología Molecular básicos. Tiene un índice alfabético que liga cada entrada con el tema que se busca.

Mensaje Bioquímico

<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico/>

Esta liga permite acceder a la publicación anual Mensaje Bioquímico que contiene artículos de revisión de temas de actualidad que son abordados durante el Taller de Actualización en Bioquímica que se lleva a cabo anualmente desde 1978.

Taller de Actualización Bioquímica 2006

<http://laguna.fmedic.unam.mx/comitetab>

Esta liga permite el acceso a la información pertinente acerca de la organización del taller anual cuya función es la actualización de los profesores de Bioquímica y Biología Molecular a nivel nacional e internacional. En este taller se revisan temas de actualidad, desarrollos tecnológicos para facilitar el aprendizaje, sistemas de evaluación, etc.

Calendario del Curso de Bioquímica y Biología Molecular

http://laguna.fmedic.unam.mx/~leonor/calendario/index_Calendario.htm

En este sitio se señalan los temas que se revisan en el Curso de Bioquímica que se imparte durante el primer año de la Carrera de Médico Cirujano en la Facultad de Medicina de la UNAM [7-8]. Cada tema tiene una liga al programa de enseñanza asistida por computadora en el sitio Aprende Bioquímica para que el usuario pueda revisarlos fácilmente.

Presentaciones de Power Point del libro de Bioquímica de Lehninger

<http://laguna.fmedic.unam.mx/lenpres/>

Esta liga permite el acceso a las presentaciones en Power Point del libro de Bioquímica de Lehninger, que son muy útiles para profesores y estudiantes para impartir las clases o para hacer presentaciones de temas correspondientes al curso de Bioquímica.

Revistas

Las dos revistas más importantes que se dedican a publicar trabajos e investigaciones para facilitar el aprendizaje de la Bioquímica:

Biochemistry and Molecular Biology Education

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

Esta revista en inglés, publica artículos que promueven la alta calidad en la enseñanza de la Bioquímica, la Biología Molecular y otras ciencias relacionadas como la Microbiología y la Biología celular; tiene una cobertura mundial y se revisan diversos temas:

- Técnicas y prácticas de enseñanza.
- Métodos de evaluación para verificar la efectividad de las nuevas estrategias de enseñanza.
- Investigación en educación bioquímica y en la educación de la biología molecular.
- Revisiones cortas en áreas clave de conocimientos acerca de la bioquímica, producidas por maestros activos y que están orientadas a ayudar en la preparación de clases, seminarios y de otros trabajos.
- Experimentos simples que han sido probados.

Esta Revista también tiene ligas a las versiones PDF de artículos clásicos de bioquímica.

Revista de Educación Bioquímica (REB)

<http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica/>

Esta revista publica en español y es el órgano de difusión de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C.; que inició su publicación en el año de 1982 como Boletín de Educación Bioquímica, cambiando su nombre a Revista de Educación Bioquímica a partir del Volumen 21 en el año 2002.

La *REB* se publica trimestralmente y ofrece a los docentes y estudiantes de la Bioquímica y disciplinas afines un foro con temas interesantes y relevantes para su actualización constante.

En esta revista se publican artículos relacionados con el proceso enseñanza-aprendizaje, revisiones bibliográficas y artículos de investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Se puede consultar por la Internet y los artículos se pueden obtener en formato PDF. En el Sitio Internet, se encuentran los volúmenes publicados a partir del año 2003 para su consulta como Revista Completa, con la opción de Búsquedas por Fecha, Título de Artículo, Autores, Palabras Clave.

En cada número de la *REB* se mantiene informada a la comunidad académica acerca de los proyectos de investigación desarrollados por destacados investigadores del área y de los eventos más relevantes.

Scientific American

<http://www.sciam.com>

Revista en inglés que publica trabajos de difusión de diferentes disciplinas científicas. Los temas más frecuentemente tratados son astronomía, física, ciencias del medio ambiente, tecnología, nanotecnología, ciencias de la salud, negocios y otros.

Esta revista permite leer los artículos en el sitio de red y ofrece la versión digital que puede ser copiada directamente a la computadora.

Investigación y Ciencia

<http://www.investigacionyciencia.es/>

Revista en español, publicada por Prensa Científica que es una editorial española dedicada a la divulgación del conocimiento científico a través de revistas y publicaciones periódicas entre las que se encuentran: Investigación y Ciencia, que es la versión española de Scientific American. Ofrece a sus lectores la información más actual sobre los avances científicos y técnicos del mundo entero y constituye un vehículo exclusivo para conocer el quehacer del investigador de España y de Iberoamérica.

Mente y Cerebro

<http://www.investigacionyciencia.es/productos.asp?cat=8>

Esta revista tiene una periodicidad bimestral, abarca los desarrollos más sólidos en el dominio emergente de las neurociencias y las ciencias cognitivas, con particular atención a la psicología y psiquiatría. Se trata de un esfuerzo paneuropeo, con diferentes nombres; en Alemania se llama Gehirn & Geist, en Francia se llama Cerveau & Psycho y en Italia se llama Mente & Cervello, esta revista está en colaboración con la revista norteamericana MIND.

Trends in Biochemical Sciences

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09680004>

Esta revista tiene la intención de mantener a sus lectores al día acerca de avances recientes en Bioquímica y Biología Molecular. Además de revisiones de tópicos de interés, se tiene una plataforma para el debate en donde las ideas nuevas se discuten. Otra parte interesante de esta Revista es la columna que se refiere a los motivos estructurales de las proteínas; en ésta se reportan los motivos y las homologías que se han encontrado en secuencias de proteínas y de nucleótidos conocidas. También hay reportan cartas, revisiones de aplicaciones computacionales y técnicas, perspectivas históricas de la investigación en Bioquímica y Biología Molecular y revisiones de libros. Para poder tener acceso, es necesario inscribirse.

Sitios de red interesantes

Existen muchísimos sitios de red en donde aparecen libros electrónicos, de estos, se seleccionan algunos de los que aportan material novedoso para el aprendizaje de la Bioquímica:

Libro en Línea Genes y Enfermedad (Genes and Disease)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=gnd>

Este libro electrónico que puede ser bajado de la red para leerse en una Palm, trata de enfermedades que son el resultado de la mutación de un gene y ayuda a la comprensión los padecimientos que tienen un patrón hereditario complejo, como son la diabetes, el asma, el cáncer y las enfermedades mentales; en todos estos casos no se puede atribuir el padecimiento

a un solo gene defectuoso y lo más probable es que el padecimiento aparezca cuando hay varios genes alterados al mismo tiempo. En el libro se analizan las enfermedades hematológicas y del sistema linfático, algunos casos de cáncer, enfermedades del sistema digestivo, del oído, de la nariz y de la garganta, de los ojos, etc, ligados a alguna alteración genética. Este libro también tiene un mapa de cada uno de los cromosomas y ligas a una descripción de cada enfermedad.

The Medical Biochemistry Page

<http://web.indstate.edu/thcme/mwking/home.html>

Aquí se muestran diferentes tópicos de Bioquímica relacionados con la medicina. La página está en inglés. Se puede tener acceso libremente.

Harvard University Department of Molecular and Cellular Biology

<http://mcb.harvard.edu/BioLinks/EduRes.html>

Presenta ligas a sitios interesantes relacionados con la Bioquímica, la Biología Molecular y la Medicina.

Biochemistry of Metabolism

<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>

Este libro en línea tiene conceptos relacionados con el metabolismo y algunos tutoriales y pertenece a Rensselaer Polytechnic Institute (RPI).

Aula Virtual de Biología

<http://www.um.es/molecula/indice.htm>

Este sitio tiene un libro electrónico con conocimientos básicos de Bioquímica y de Biología Molecular, es publicado por el Departamento de Biología de la Universidad de Murcia, España y los autores son Francisco García Carmona, Álvaro Sánchez Ferrer, José Ibanez Mercader, Francisco José Lavada Molina, Fernando Martínez Pérez y Ángel Morán Piñeira. El libro está bien presentado, organizado y orientado a estudiantes de Biología en el nivel de bachillerato.

Herramientas bioinformáticas que sirven para ordenar, buscar y encontrar secuencias problema para compararlas con las secuencias ya conocidas

Blast

Blast es la herramienta básica local de alineamiento (Basic Local Alignment Search Tool) y es mantenida por el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esta herramienta permite hacer alineamientos locales y prefiere encontrar secuencias que muestran cierta similitud regional en vez de tratar de alinear a las secuencias problemas y a las presentes en la base de datos. Tiene las siguientes modalidades:

BLAST

<http://pubmedexpress.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>

Genera alineamientos que no contienen espacios; la velocidad y el modelo estadístico dependen de esto, si hay interrupciones la exactitud disminuye. BLAST reporta diferentes alineamientos entre el problema y las secuencias de las bases de datos.

BLASTP

http://www.incogen.com/public_documents/vibe/details/blastp.html

Se usa para investigar las secuencias de aminoácidos en las bases de datos de proteínas.

BLASTN

http://www.incogen.com/public_documents/vibe/details/NcbiBlastn.html

Sirve para estudiar las secuencias de nucleótidos en las bases de datos de secuencias de nucleótidos.

TBLASTN

http://www.incogen.com/public_documents/vibe/details/tblastn.html

Busca una secuencia de la proteína de interés y la compara con una base de datos de nucleótidos en seis diferentes marcos de lectura.

BLASTX

http://www.incogen.com/public_documents/vibe/details/NcbiBlastx.html

Busca a una secuencia de nucleótidos en una base de datos de proteínas [9].

Matrices de sustitución

Las matrices de sustitución se usan en el proceso de alinear dos secuencias, debe haber un método para asignar un valor al alineamiento de una secuencia con respecto a otra. Las matrices de sustitución contienen los valores que se usan en este proceso. Las matrices más usadas son PAM, MDM Dayhoff. Margaret Dayhoff [10] <http://www.dayhoff.cc/> fue una pionera

en el terreno de bases de datos y en el análisis y la comparación de secuencias. Ella y sus colaboradores desarrollaron un modelo de evolución de proteínas que dio como resultado el desarrollo de un juego de matrices de sustitución. Estas han sido llamadas Dayhoff, MD, (Mutation Data Matriz) o PAM (Percent Accepted Mutation). Estas matrices se derivan de los alineamientos de las secuencias relacionadas. Las matrices que evolutivamente son distantes se extrapolan de las matrices correspondientes a secuencias menos distantes evolutivamente. Los números con la matriz (PAM40, PAM100), se refieren a la distancia evolutiva entre las dos y entre más grande es el número, mayor es la distancia evolutiva. Además de estas matrices, se han desarrollado otras que abarcan a bases de datos más recientes [11] Henikoff y Henikoff, compararon esas dos versiones más modernas de PAM con las matrices de Dayhoff.

BLOSUM

BLOSUM es una serie de matrices creadas por S. Henikoff y cols., [12]. Estas se derivan de alineamientos locales de secuencias con relación distante. El número asociado a la matriz, por ejemplo, BLOSUM62, se refiere al mínimo porcentaje de identidad de los bloques que se usan para construir la matriz, en este caso entre mayor es el valor de la diferencia, menor es la distancia. Las matrices BLOSUM generalmente son mejores que las matrices PAM para investigaciones locales [11].

Matrices especiales

Claverie [13], desarrolló un juego de matrices de sustitución diseñado explícitamente para la localización de marcos de lectura en las secuencias de proteínas; estas matrices se usan solamente en comparaciones proteína-proteína.

Uso de matrices múltiples. Ya que no hay una matriz que sirva para todos los casos, es útil usar varias matrices; esta noción intuitiva fue desarrollada por Stephen Altschul (14, 15) y probada por Steve Henikoff [11].

Nacional Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Literature/>

Este centro se inició en 1988 como un recurso para manejar la información referente a la Biología Molecular. Las funciones de este centro son la creación de bases de datos, el desarrollo de proyectos de investigación en biología computacional, el desarrollo de programas de software para el análisis los datos derivados del estudio del genoma y la disseminación de información biomédica, todo esto encaminado a mejorar el entendimiento de los factores que afectan a la salud humana.

Bases de datos moleculares

A continuación se presentan las características más importantes de las bases de datos más importantes.

GenBank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

La base de datos de nucleótidos es mantenida por el National Center for Biotechnology Information de los Institutos de Salud de E.U.A. Las bases de datos que contienen secuencias conocidas de nucleótidos son GenBank EMBL Datalibrary y el DNA Databank de Japón, que son nombres diferentes de la misma base de datos; a esto se le llama redundancia.

PIR

http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/pir_psd.shtml

La Base de datos Protein Identification Resource (PIR) fue iniciada por Margaret Dayhoff, tiene tres partes; La PIR 1, no tiene redundancia, mientras que la base de datos PIR1 + PIR2 + PIR3 si tiene muchas redundancias.

PDB

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

Protein Data Bank, es mantenida por Brookland Nacional Laboratory (Long Island, New Cork, EUA), contiene todas las estructuras de las proteínas que se conocen y que han sido publicadas y que es no redundante ya que sólo almacena la mejor determinación de la estructura de una proteína dada; hay que tener en cuenta que pueden haber varias formas estructurales de la misma proteína.

SwissProt

<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>

La Universidad de Ginebra mantiene la base de datos SwissProt, distribuida por European Molecular Biology Laboratory (EMBL); ésta es una base de datos con poca redundancia porque es altamente curada y cuidadosamente referenciada que favorece que haya una entrada por cada producto proteico además de estar referenciada a otras bases de datos. SwissProt también provee otras bases de datos que tienen información acerca de sitios de datos sobre las proteínas (PROSITE) y un banco con información acerca de las enzimas que se pueden proveer cuando se hace una petición. También tiene el recurso de análisis de secuencias de aminoácidos de los péptidos.

Bases de datos de motivos proteicos

Estas bases de datos almacenan secuencias que se repiten en varias proteínas y por esto se les llama motivos proteicos, que son secuencias que se repiten en muchas proteínas relacionadas o no.

Prositate

Prositate es una base de datos de motivos proteicos mantenida por Amos Bairoch en la Universidad de Ginebra [16] <http://ca.expasy.org/prosite/>

Bases de datos que almacenan literatura científica

Con esta página en inglés se puede acceder a PubMed, PubMed Central, libros, el manual NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), <http://www.ncbi.nih.gov/index.html>

El Catalogo NLM que tiene acceso a más de 1.2 millones de revistas, libros, audiovisuales y programas de cómputo por medio del sistema Entrez, que es un buscador de textos que hace pesquisas en PubMed, Journals, OMIM, secuencias de nucleótidos y de proteínas, estructuras de proteínas, Complete Genomes (Genoma completo), Taxonomías y otras bases de datos.

Nacional Human Genome Research Institute

<http://www.genome.gov/>

Este sitio esta desarrollado por el Nacional Institute of Health de Estados Unidos, en él se encuentra las ligas a los recursos informáticos que facilitan el estudio del ADN. En esta página hay herramientas para el estudio de todo lo relacionado con los ácidos nucleicos y abarca los aspectos moleculares, genéticos, éticos y jurídicos. Hay una sección de divulgación muy buena con videos que se pueden exportar a las computadoras personales. El 23 de Abril, es el día del ADN y habrá muchos eventos por Internet.

Visualizadores de Moléculas

Los visualizadores de moléculas permiten la representación de las moléculas en tercera dimensión tomando los parámetros publicados y almacenados en la base de datos Protein Data Bank, a partir de los datos obtenidos por cristalografía de rayos X y de resonancia magnética nuclear. Los datos son almacenados en un archivo *.pdb. Los visualizadores de moléculas surgieron de numerosos esfuerzos para tratar de representar las estructuras de las proteínas y de otras macromoléculas por medio de modelos tridimensionales.

Evolución de la visualización de las estructuras moleculares

Algunos datos interesantes sobre el progreso de la visualización de las macromoléculas se presentan a continuación.

La primera resolución de la estructura de una molécula (mioglobina) [10] permitió que Byron Rubin y Jane Richardson inventaran en 1970, una máquina (Byron Bender) que doblaba alambre siguiendo el esqueleto de una proteína. En 1972 la visualización de moléculas todavía

no podía ser usada por los cristalógrafos. Los modelos al estilo de Kendrew se construían en soportes de alambre a partir de las proyecciones de los mapas de las densidades electrónicas de los isocontornos trazados en placas de vidrio, sin embargo, estos eran difíciles de ser entendidos y los modelos de alambre doblado eran más fáciles de usar y de transportar. La importancia de estas estructuras se hizo patente cuando los modelos de dos proteínas diferentes se presentaron en una reunión científica; David Davies mostró un modelo fabricado con el Byron Bender que correspondía a un fragmento Fab de una inmunoglobulina y Jane y David Richardson traían un modelo también fabricado con el Byron Bender de la superóxido dismutasa. Al comparar a los dos modelos, se pudo apreciar que ambas proteínas tienen un doblado muy similar, a pesar de que sólo tienen 9% de secuencias de aminoácidos similares. Este incidente fue el primer reconocimiento de la existencia de lo que ahora se conoce como el dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas en proteínas que aparentemente no tienen relación entre sí. Este hallazgo se publicó en el trabajo "Similarity of three-dimensional structure between the immunoglobulin domain and the copper, zinc superoxide dismutase subunit" en 1976 (19).

El Byron Bender se usó durante la década de los noventa y Byron Rubin se dedicó a la escultura de moléculas; otros escultores de moléculas son Julian Voss-Andreae, Edgar Meyer que hacen esculturas moleculares en madera. Kenneth Eward tiene una galería de esculturas moleculares virtuales y en fotografías. El escultor Bathsheba Grossman tiene una galería de estructuras y también de ácidos nucleicos y de proteínas esculpidas por medio de rayos láser. Para ver estos trabajos hay que visitar www.crystalprotein.com

En los últimos años de la década de los noventa, se iniciaron dos esfuerzos independientes, uno de Michael Bailey en el San Diego Computer Center y Tim Herman de la Milwaukee School of Engineering para usar las nuevas tecnologías para hacer modelos de las proteínas.

Representaciones de moléculas por medio de las computadoras

Las primeras representaciones de moléculas en computadora se hicieron en 1964 por Cyrus Levinthal y su grupo en el MIT en un osciloscopio en donde se produjeron modelos de los esqueletos de las proteínas. En 1965, Carroll K. Johnson, de Oak Ridge National Laboratory, produjo el programa **ORTEP**

A mediados de la década de los setenta, se logró la visualización por medio de la computadora de la estructura de la superóxido dismutasa, sin necesidad de hacer el modelo físico [20].

Para hacer esto, se usó un programa de computadora capaz de unir las densidades electrónicas, llamado "GRIP" en la Universidad de North Carolina [21].

En los últimos años de la década de los setenta, fue aumentando el número de cristalógrafos que usaron a la computadora como medio para crear representaciones gráficas de las moléculas.

En 1978, Thomas K. Porter desarrolló algoritmos que sombreaban a estas representaciones gráficas [22]. Estos desarrollos revolucionaron la visualización de macromoléculas que sólo podían ser usados por un número reducido de investigadores.

El TAMS (Teaching Aids for Macromolecular Structure), aditamento que se usó para ver a las moléculas en tercera dimensión usando unos lentes de cartón a los que se les ponía la fotografía de pares de diapositivas estereoscópicas; en esta forma se podía apreciar a las

moléculas en tercera dimensión en forma muy económica. La unidad TAMS para educación se publicó en 1980.

Durante los ochentas, el sistema más popular para los cristalógrafos fue el fabricado por Evans & Sutherland. Estas computadoras costaban cerca de los 250,000 dólares y en 1985, mostraban los mapas de densidad electrónica y se permitía que las secuencias de aminoácidos se encajaran en forma manual. El gráfico se mostraba a color y las cadenas de aminoácidos se podían rotar en tiempo real, lo que se lograba por medio de multiplicadores de matrices, una para cada dimensión X, Y y Z. Este software se llamaba FRODO, lo desarrolló T Alwin Jones y colaboradores en 1978 [23, 24] y se usó en computadoras E & S.

Kinemage

Durante los años ochenta, David y Jane Richardson [25] encabezaron las representaciones gráficas por computadora y desarrollaron varios programas, el último de los cuales se llamó CHAOS. En 1992, los Richardson describieron a Kinemage y sus programas de soporte para ser usados en computadoras Macintosh, lo que favoreció el uso de esta herramienta entre los investigadores, educadores y estudiantes. Este visualizador ha avanzado y tiene su propio sitio en Internet. <http://kinemage.biochem.duke.edu/>

RasMol

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>

Este popular programa fue desarrollado por Roger Sayle, quien desde sus años de estudiante de pregrado se interesó por las representaciones computacionales de estructuras tridimensionales sólidas. Su objetivo inicial fue crear un programa capaz de simular sombreado en la pantalla, lo que logró por medio de un algoritmo trazador de rayos que permitía la rotación y el sombreado, pero requería una computadora con procesadores paralelos especializada. En 1990, Roger ingresó como estudiante de posgrado a la Universidad de Edinburgo y continuó desarrollando el programa bajo la tutoría del cristalógrafo Andrew Coulson. En 1993, gracias a mejoras, el programa se pudo usar para la enseñanza y para la publicación de imágenes en trabajos científicos. Roger favoreció el uso de este programa porque hizo una donación generosa y es por esto que aparece como software libre. En 1999, Herbert Bernstein y sus colaboradores produjeron la versión RasMol version 2.7. Debido a que el software es de dominio público y a que se escribió en lenguaje "C", el programa se adaptó a otros tipos de computadoras y sus derivados incluyen al MDL's Chemscape Chime y al Molecular Simulations' WebLab.

RasMol, es usado extensamente en todo el mundo principalmente en los lugares donde no es posible comprar software comercial para producir gráficos de moléculas.

MDL's Chime

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>

Bryan van Vliet y Tim Maffett de MDL Information Systems, Inc., desarrollaron el programa Chime, que es un visualizador en forma de un plug-in para el navegador Netscape; usa una adaptación del programa RasMol, en donde MDL añadió más de 80,000 líneas de código al programa original. La versión de Chime 2.0 de MDL fue completada por Franklin Adler,

Jean Holt y otros y fue publicada en Noviembre de 1998. Este programa permite las mismas funciones que el RasMol y otras más, como el poder mostrar a las moléculas en páginas de red (lenguaje .htm).

Protein Explorer

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>

El Protein Explorer es un software libre para la visualización de estructuras de proteínas, ADN y ARN en tercera dimensión y a través de éste, se pueden estudiar las interacciones que se llevan a cabo entre estas moléculas y sus ligandos como inhibidores y drogas. Este programa es muy amigable, por lo que puede ser usado por estudiantes de secundaria, preparatoria, licenciatura, investigadores y estudiantes posgraduados.

El programa permite ver las relaciones de la estructura molecular en tercera dimensión; se pueden esconder algunas partes de la molécula para poder apreciar alguna de sus partes; también se pueden hacer representaciones del esqueleto de las moléculas de proteínas y de ácidos nucleicos con el fin de apreciar sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, además, es posible ver en colores diferentes a los diferentes tipos de aminoácidos. Este programa es un cascarón que permite la programación para mostrar diferentes características de las moléculas en la Internet. El programa tiene una demostración que instruye en forma interactiva acerca de cada una de las funciones del Protein Explorer y se puede descargar para uso fuera de la Internet.

PyMol

<http://pymol.sourceforge.net/>

El PyMol, es un software incrustado en un intérprete Pitón, que está diseñado para la visualización de moléculas en tiempo real por medio de la generación de gráficas de alta calidad. Es un programa gratuito para educación y también puede editar archivos .pdb.

MOLMOL

http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/wuthrich_group/software

MOLMOL es un programa de visualización producido en el Institute of Molecular Biology & Biophysics de Zurich, Suiza. El programa permite la manipulación de representaciones tridimensionales de moléculas biológicas con especial énfasis en las moléculas que han sido estudiadas por medio de resonancia magnética nuclear (NMR). Las representaciones de las moléculas incluyen las tradicionales (esqueleto, listón, caricatura, etc.) más algunas otras, que permiten la superposición de confórmers.

VMD

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

VMD es un visualizador molecular para mostrar, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares usando gráficas en tercera dimensión. Puede ser usado en Windows, Mac y Unix. VMD puede aplicar una, dos y tres dimensiones a la geometría volumétrica, lo que se puede utilizar para hacer aparentes diferentes tipos de información, incluyendo el contorno de superficies, datos volumétricos, y otras propiedades moleculares. Este programa tiene también tutoriales, manuales, etc. para facilitar su uso.

Programas Tutoriales

Interactive Biochemistry

<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/scriptFrame.html>

Es un sitio de la Internet perteneciente a la University of Virginia in Charlottesville, Virginia. Los autores son Edward K. O'Neil y Charles M. Grisham. En este sitio hay varios programas interactivos de enseñanza.

Tutoriales de Bioquímica desarrollados en la Universidad Massey en Nueva Zelanda.

<http://www.massey.ac.nz/~wwbioch/Prot/tutepage.htm>

Se presentan las estructuras moleculares de las proteínas, usando como apoyo el Protein explorer. Tratan estructura de proteínas principalmente.

Tutoriales en bioquímica, Casos clínicos

http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/biochem/coursenotes/blanchaer_tutorials/

Clinical Case Computer Tutorials in Biochemistry University of Manitoba, Canada que ofrece programas interactivos que presentan casos clínicos con padecimientos relacionados con alteraciones genéticas y/o bioquímicas.

Conclusión

El uso de la informática para la enseñanza de Bioquímica y de otras ciencias, ha demostrado que facilita el acceso a información actualizada, favorece la comprensión de conceptos abstractos y difíciles, acerca a las instituciones docentes con los estudiantes y favorece el intercambio de ideas.

El desarrollo de más programas para favorecer el aprendizaje, es un área científica y tecnológica se debe impulsar, pues en el futuro jugará un papel muy importante en los procesos de educación que tienden a la educación a distancia y que está modificando la manera cómo los humanos aprenden, investigan, se divierten y se comunican, acercando cada vez más a todas personas y favoreciendo el intercambio de ideas.

Referencias

1. Benowitz S. Computers add new twists to medical training (1997) *The Newsp Life Sci Prof* 11:5, 1,4,5.
2. Reinhardt A. New ways to learn. (1995) *BYTE* 20:50-71.
3. Fernández R. R. L. Elaboración de prototipos para el uso creativo de la computadora en la docencia de la bioquímica. (1994). *Bol Educ Bioq (México)* 13(2): 52-57.
4. Martha Zentella de Piña, Yolanda Saldaña, Balmori, Aída Hernández Tobías y Enrique Piña. Nonsteroidal antiinflammatory drugs lowe ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. (1993) *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 17:6 1228-1232.
5. Fernández R. R. L. y Gorenc K. D. Evaluación del paquete de enseñanza asistida por computadora "Los aminoácidos". (1995) *Rev. Fac. Med.* 38(1): 8-21.
6. Fernández R. R. L. y Gorenc K D (1995) Medición de la efectividad del aprendizaje mediante un paquete de *software*. *Extensiones* 2(2): 47-52.
7. Cea B A., Del Arenal P., Fernández R. R. L., y Gutiérrez R. (1993) Manual de objetivos y prácticas de laboratorio del curso de bioquímica. México. Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México.
8. Plan Único de Estudios de la Carrera de Médico Cirujano (1993) *Rev. Fac. Med.* 36(4) Suplemento N° 1, 11-15.
9. S. F. Altschul, Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Meyers y David J. Lipman. Basic Local Alignment Search Tool. (1990) *J Mol Biol*, Vol 215: 403-410.
10. Dayhoff, M. O. y Eck, R. V. eds Atlas of Protein Sequence y Structure (1968) *Natl. Biomed. Res. Found.*, Silver Spring, MD, Vol 3:33.
11. S. Henikoff, J. G. Henikoff. Performance evaluation of amino acid substitution matrices (1993) *Proteins* 17:49-544.
12. Henikoff, S. y Henokoff J. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 89:10915-19.
13. Claverie, J. M. Detecting Frame Shifts by Amino Acid Sequence Comparison (1993) *J. Mol Biol* 234:1140-1157.
14. S. F. Altschul. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective (1990) *J Mol Biol* 219:555- 65.
15. S. F. Altschul. A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances (1993) *J Mol Evol.* 36(3):290-300.
16. Bairoch, A. (1991) PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins (1991) *Nucleic Acids Res.* April 25; 19:224.
17. S Henikoff y J G Henikoff Automated assembly of protein blocks for database searching (1991) *Nucleic Acids Res.* 19(23): 6565-6572.
18. Kendrew, J. C., R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips y V. C. Shore "Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 resolution." (1960) *Nature* 185: 422-427.
19. Richardson, Jane S., y David C. Richardson. "Similarity of three-dimensional structure between the immunoglobulin domain and the copper, zinc superoxide dismutase subunit" (1976) *J. Mol. Biol.* 102:221-235.
20. Beem, K.M., Richardson, D.C y Rajagopalan, K.V. Metal sites of copper-zinc superoxide dismutase (1977). 1930-1936.
21. J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson y D. C. Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase (1982), *J. Mol. Biol.* 160:181-217.
22. Porter, T. K. (1978). "Spherical shading." *Comp. Graphics* 12: 282-285.
23. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, y Kjeldgaard. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors.(1991) : *Acta Crystallogr A.* 47:110-9.
24. Jones, T. A. "A graphics model building and refinement system for macromolecules." *J. Appl. Crystallogr.* 11: 268-272, 1978.
25. Richardson, Jane S., y David C. Richardson, Principles and patterns of protein conformation. In: Prediction of protein structure and the principles of protein conformation, G. D. Fasman, ed., Plenum Press, NY. pp. 1-98, 1989.

LA INFORMÁTICA EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA Y DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Resumen

La informática es una herramienta muy importante en el procesamiento de datos, generación de imágenes y en la comunicación. La Internet se usa cada vez más porque permite encontrar la información fácilmente, por lo que se ha hecho habitual entre estudiantes, maestros e investigadores. La bioquímica es una ciencia con crecimiento acelerado, cuyos fundamentos son conceptos abstractos, lo que hace que la informática se convierta en una herramienta muy útil para facilitar la comprensión de esta materia.

En este trabajo se analizan varios sitios de Internet en los que se muestran materiales que facilitan el aprendizaje de esta ciencia.

*El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM, inició un proyecto para el desarrollo de Programas para la enseñanza de Bioquímica asistida por computadora orientados a promover el aprendizaje independiente; actualmente, los materiales desarrollados se encuentran en la página "Aprende Bioquímica" y están a disposición de estudiantes y maestros interesados. Estos programas abarcan la estructura y las propiedades fisicoquímicas de las biomoléculas, las vías metabólicas y ejercicios de laboratorio virtuales; gracias al programa CHIME es posible ver a las moléculas en tercera dimensión desde Internet facilitándose la comprensión de sus estructuras; en el mismo sitio se ofrecen las estructuras tridimensionales de las biomoléculas. Otras herramientas presentes en la página del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular incluyen el libro "Bioquímica y Biología Molecular en Línea", "El Mensaje Bioquímico" y la Revista de Educación Bioquímica. La red permite el acceso a múltiples sitios entre los que destacan RasMol, en el que hay varios visualizadores de moléculas, el Protein Data Bank, contiene los archivos *.pdb que contienen los parámetros atómicos de múltiples macromoléculas y que sirven para generar las imágenes tridimensionales.*

El uso de la informática para la enseñanza de Bioquímica y de otras ciencias, ha demostrado que facilita el acceso a información actualizada, favorece la comprensión de conceptos abstractos y difíciles, acerca a las instituciones docentes con los estudiantes y favorece el intercambio de ideas.

El desarrollo de más programas para favorecer el aprendizaje, es un área científica y tecnológica que está modificando la manera cómo las personas aprenden, investigan y se comunican.

Palabras clave: Bioquímica, Enseñanza asistida por computadora, Estructura de biomoléculas, Modelos tridimensionales, Educación a distancia.

Semblanza de la M en C. Leonor Fernández Rivera Río.



La M en C. Leonor Fernández Rivera Río es Médico Cirujano por la Facultad de Medicina, UNAM, y Maestra en Ciencias. Fundadora y jefe del Laboratorio de Desarrollo y Evaluación de Programas para la Enseñanza de Bioquímica Asistida por Computadora, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Medicina, UNAM, donde ha desarrollado más de 15 programas para conocer diferentes propiedades de las moléculas biológicas, sus interacciones y su participación en las diversas vías que conforman el metabolismo. Además ha elaborado 6 programas para la visualización tridimensional de estas moléculas. Todos estos programas están destinados a estimular y facilitar el aprendizaje de la Bioquímica.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS POR LAS CINASAS WNK

Paola de los Heros Rios, Tomás Garzón Muvdi y Gerardo Gamba
Unidad de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador
Zubirán, e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 1400, México, D. F.
gamba@biomedicas.unam.mx

Abstract

The electroneutral cation/Cl⁻ cotransporter family (SLC12A) encompasses two branches: the K-Cl cotransporter branch, composed of four members (KCC1, KCC2, KCC3, and KCC4), and the Na-(K)-Cl cotransporter branch, composed of three members (NCC, NKCC1, and NKCC2). K-Cl cotransporters mediate Cl⁻ efflux, are inhibited by phosphorylation, and are activated by dephosphorylation. Na-(K)-Cl cotransporters mediate Cl⁻ influx and are activated by phosphorylation. These cotransporters are mutated in human disease, are targets of diuretics and are collectively involved in the regulation of cell volume, neuronal excitability, and blood pressure. A single kinase/phosphatase pathway is thought to coordinate the activities of these cotransporters; however, the mechanisms involved are as yet unknown. The WNK kinases (WNK, with no lysine = K), a family of four novel serine-threonine kinases, are emerging as key regulatory proteins for the SLC12A family. Mutations in WNK1 and WNK4 cause PHAI1, a Mendelian disease that features hypertension and hyperkalemia. WNK4 has been shown to be a regulator of NCC and NKCC1; some of these effects are kinase-dependent, whereas others are independent of WNK4's catalytic activity. Furthermore, WNK1 modulates the effect of WNK4 on NCC. WNK1 has also been found to activate the protein kinases SPAK or OSR1, which regulate activation of various epithelial ion channels including de SLC12A family. WNK3 is coexpressed in different tissues with several cation/Cl⁻ cotransporters and regulates their activity. These data suggests WNKs are crucial components of the kinase/phosphatase signaling pathway that coordinately regulates the Cl⁻ influx and efflux branches of the SLC12A cotransporter family and so their activities.

Keywords: Electroneutral cation/Cl⁻ cotransporter, WNK kinases, phosphorylation, electrolyte homeostasis, blood pressure, cell volume, neuron excitability.

Abreviaturas

Concentración intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$), Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC), Cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (NKCC1 y NKCC2), Túbulo distal (TD), Cotransportadores electroneutros (CEN), Ácido gama-aminobutírico (GABA), Cinasa WNK (WNKs), Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHA2), Ste-20 cinasa rica en alanina y prolina (SPAK).

Introducción

Una de las grandes interrogantes en los sistemas biológicos es cómo son regulados la función de diversos elementos que componen un sistema, que puede estar integrado por miembros localizados en diversas células y tejidos, para montar una respuesta coordinada y coherente ante diversas perturbaciones fisiológicas. Un ejemplo es el mantenimiento de la homeostasis iónica intra y extracelular, involucrada en funciones que van desde la regulación del volumen celular, en cada célula, funciones de tipo célula o tejido específico (como es la excitabilidad neuronal), y funciones que implican la respuesta coordinada de una variedad de células y órganos como es el caso de la regulación de la presión arterial. Para realizar estos diversos procesos en los que el transporte a través de la membrana plasmática de iones como el sodio (Na^+), el potasio (K^+) y el cloro (Cl^-) es fundamental, las células están equipadas con una serie de proteínas transportadoras de iones u osmolitos, poros, canales y bombas [1], así como proteínas de uniones intercelulares, cuyos mecanismos efectores del transporte han sido en general dilucidados, identificados y estudiados a nivel fisiológico, molecular y genómico. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas proteínas de membrana son reguladas en forma coordinada permanecen sin ser identificados por completo.

A pesar de que las funciones celulares y epiteliales son diversas, los mecanismos a través de los cuales el equilibrio de los electrolitos se alcanza son extremadamente parecidos. El mecanismo predominante por el cual el volumen intracelular se mantiene en la mayor parte de las células, es el aumento o la disminución de la concentración intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) en respuesta a un medio hipertónico o hipotónico respectivamente, minimizando así, el movimiento transmembranal de agua. En nuestro laboratorio el interés está centrado en una familia de proteínas de transporte involucrada en las funciones mencionadas anteriormente, conocida como la familia de cotransportadores electroneutros (CEN) de cationes acoplados a cloro. Esta familia recibe la denominación de SLC12 según la *Human Genome Organization* (HUGO) [2]. Esta compuesta por siete genes claramente identificados que codifican para transportadores de membrana, de los cuales tres utilizan sodio (con o sin potasio), como el catión acoplado al transporte de cloro, mientras que los otros cuatro utilizan potasio como el único catión acoplado al cloro.

En la figura 1 se muestran las dos ramas principales del árbol filogenético de la familia SLC12, así como el grado de identidad entre éstas. De los transportadores acoplados a sodio, un gen codifica para el cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC) [3] mientras que dos genes codifican para cotransportadores de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ sensibles al diurético de asa bumetanida (NKCC1 y NKCC2). El NCC se localiza en el humano en el cromosoma 16 y se expresa únicamente en la membrana apical del túbulo contorneado distal en el riñón (TD). El NKCC1 se localiza en el cromosoma 15 y se expresa en la membrana basolateral de múltiples tipos celulares y tisulares, así como en múltiples células no epiteliales [4]. El NKCC2 se localiza en el cromosoma 5 y se expresa exclusivamente en la membrana apical del asa ascendente de Henle en el riñón [5]. Los miembros de la familia que utilizan potasio son todos cotransportadores de $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$, conocidos como KCC1 a KCC4. En el humano, tres genes se localizan en los cromosomas 16, 15 y 5 y corresponden a las isoformas KCC1, KCC3 y KCC4 respectivamente. Su expresión es ubicua [6, 7]. El cuarto gen se ubica en el cromosoma 20 y codifica para la isoforma KCC2 que se localiza exclusivamente en las neuronas [8].

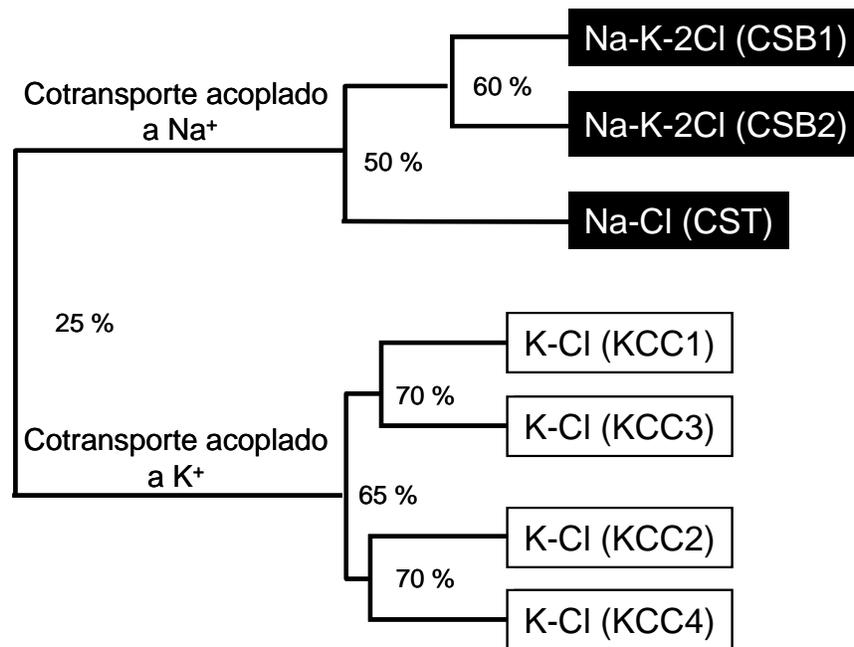


Figura 1. Árbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de cationes cloro. Existen dos subfamilias. Una compuesta por tres genes que codifican para cotransportadores que utilizan sodio como catión para acoplarse al transporte de cloro (NCC, NKCC1 y NKCC2). La otra está compuesta por cuatro genes que codifican para cotransportadores que solo utilizan potasio como catión acoplado al cloro (KCC1 a KCC4). Los números en porcentaje indican el grado de identidad entre los diferentes miembros de la familia.

Los CEN, son transportadores secundarios que no hidrolizan ATP para su función, sino que dependen del gradiente generado por la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ para mover iones. Por lo tanto, NCC, NKCC2 y NKCC1 (los que utilizan sodio) translocan iones desde fuera hacia adentro de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el sodio. Los KCCs (que utilizan potasio), translocan los iones desde adentro hacia afuera de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el potasio. El sodio que entra a la célula a través del NCC, NKCC2 o NKCC1 es expulsado por la bomba de sodio-potasio, mientras que el potasio que sale a través de los KCCs es regresado a la célula por la misma bomba. Por lo tanto, el resultado neto de la función de los CEN es la concentración o dilución del cloro intracelular.

Una de las funciones celulares en las que el movimiento de cloro juega un papel fundamental es en la regulación del volumen celular [1]. Las células mantienen un volumen celular constante a base de mantener el equilibrio osmolar con el medio exterior. En condiciones de homeostasis, la osmolaridad intracelular y la extracelular es la misma (alrededor de 290 mOsm/kg H_2O). Cuando suceden cambios en la osmolaridad de alguno de los compartimentos, se produce un movimiento de agua a favor de su gradiente, con lo que el volumen celular aumenta o disminuye. La disminución de la osmolaridad extracelular se acompaña de un aumento en el volumen celular, mientras que el aumento en la osmolaridad extracelular se acompaña de encogimiento celular. Debido a la intensa actividad de la ATPasa de Na^+ y K^+ , en la mayoría de las células los cambios en la osmolaridad y por ende, en el volumen celular, se asocian con cambios en la concentración de cloro intracelular y es aquí en donde los CEN juegan un papel fundamental. Se ha demostrado claramente que el NCC y los NKCCs se activan

durante el encogimiento celular, con el fin de aumentar la osmolaridad intracelular para recuperar el volumen original [1,2] Por otra parte los KCCs son transportadores que se activan durante el hinchamiento celular, con el objeto de disminuir la osmolaridad intracelular y así, recuperar el volumen original [1,2].

Por su habilidad para cambiar la concentración intracelular de cloro, una de las funciones importantes de tipo célula-tejido específico en la que están involucrados los CEN, es en determinar el tipo de respuesta a ciertos neurotransmisores que se unen a receptores acoplados a canales de cloro [9, 10]. Por ejemplo en el período prenatal, el ácido gama-aminobutírico (GABA) se comporta como un neurotransmisor excitador ya que numerosas neuronas en esta época de la vida poseen la concentración intraneuronal de cloro elevada. Esto es debido a la intensa actividad del cotransportador de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, el NKCC1 y a la casi nula función del cotransportador de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ KCC2, en las neuronas GABAérgicas. Este neurotransmisor actúa al unirse a un receptor acoplado a un canal de cloro. Al abrirse el canal de cloro y debido a que el potencial de este anión es mayor dentro de la neurona, el cloro sale a favor de su gradiente, despolarizando a la neurona y generando un potencial de acción. En cambio, después del nacimiento, el GABA se vuelve inhibidor en numerosas neuronas debido a que la actividad de los cotransportadores se invierte. Es decir, disminuye la actividad del NKCC1, mientras que aumenta la de KCC2, el cual se encarga de sacar cloro de la célula, con lo que convierte el potencial de este ión en negativo. Por lo tanto, al unirse GABA y abrir el canal de cloro, ahora este anión viaja de donde hay más (el intersticio) hacia donde hay menos (la neurona) resultando en hiperpolarización neuronal y por lo tanto, en inhibición del potencial de acción. Este fenómeno ocurre también en diversos grupos neuronales a lo largo de ciclos circadianos. Así, la actividad de los CEN está involucrada también en la excitabilidad neuronal ya que determina el tipo de respuesta a ciertos neurotransmisores.

Finalmente, los CEN están claramente involucrados en el mantenimiento y determinación de la presión arterial, debido a su presencia y capacidad de transportar sal en los epitelios. El NCC es la principal vía de reabsorción de sal en el túbulo contorneado distal, en donde constituye además el receptor de los diuréticos tipo tiazida, recomendados como la primera línea de terapia antihipertensiva [11]. El NKCC2 es la principal vía de reabsorción de sal en el asa ascendente de Henle y es además el receptor de los diuréticos de asa, como el furosemide y la bumetanida. Mutaciones inactivantes de estas proteínas producen los síndromes de Gitelman y de Bartter, respectivamente, que cursan con hipotensión arterial. Por otro lado, los ratones null, genéticamente modificados para no expresar al NCC, NKCC2 o NKCC1 son hipotensos, mientras que los ratones null para el KCC3 son hipertensos [12]. Indicando que estos miembros de la familia SLC12 intervienen en la regulación de la presión arterial (Tabla 1).

En diversos grupos de estudio, incluyendo el nuestro, se han analizado las propiedades funcionales de los diversos miembros de la familia SLC12 cuando son expresados en forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* [13-15]. Este modelo constituye un sistema excelente para la expresión y análisis de la función y regulación de canales iónicos y transportadores. En estos estudios, los KCCs permanecen inactivos en condiciones de isotonicidad, mientras que el NCC y los NKCCs se activan. Cuando los ovocitos inyectados con los diversos transportadores son expuestos a hipotonicidad, sucede lo contrario: los KCCs se activan, mientras que el NCC y los NKCCs se inhiben [16, 17]. Numerosos estudios han sugerido que la actividad de los miembros de la familia SLC12A, se encuentra regulada por procesos de fosforilación y desfosforilación. La desfosforilación activa a los cotransportadores de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ e inhibe a los cotransportadores de $\text{Na}^+\text{(K)}\text{-Cl}^-$, mientras que la fosforilación inactiva a los KCCs y activa al NCC y los NKCCs. Debido a lo anterior, se ha propuesto que los CEN comparten una vía de señalización común, ya que los estímulos que activan a una rama de la familia, inhiben a la otra y viceversa. Por ejemplo, el aumento del volumen celular, las concentraciones intracelulares altas de Cl^- y la presencia de proteínas fosfatasa, estimulan el transporte a través de los KCCs, pero inhiben a los transportadores de $\text{Na}^+\text{(K)}\text{-Cl}^-$. Por el contrario, la disminución del volumen celular, las concentraciones bajas de Cl^- intracelular y la presencia de inhibidores de las

proteínas fosfatasa que promueven la fosforilación, producen el efecto contrario. En esta vía de señalización, se ha propuesto que el aumento del volumen celular y/o los cambios en la concentración de cloro intracelular, regulan la función de una cinasa intracelular que a su vez regula la función de los CEN [18,19]. La identidad de dicha cinasa, queda aún por determinarse. Sin embargo, evidencias recientes de nuestro y otros laboratorios sugieren que una nueva familia de serina/treonina cinasas, denominadas WNK, podrían ser las cinasas que regulan y coordinan la función de los CEN.

Tabla I. Familia SLC12

Proteína/Nombre del Gen en el Humano	Tamaño (aa)	Iones que mueven	Distribución Tisular y expresión celular	Cromosoma en el humano	Patología	Características del ratón Knockout
NKCC2/ SLC12A1	1099	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻	Específica de riñón Membrana apical del asa ascendente de Henle	15q21.1	Síndrome de Bartter tipo I	Hipocalcemia, alcalosis metabólica, hipercalcúria, pérdida de NaCl, depleción de volumen
NKCC1/ SLC12A2	1212	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻	Ubicua Células no epiteliales y membrana basolateral de las células epiteliales	5q23.3	Ninguna	Alteraciones del movimiento y percepción del dolor; sordera; reducción en la producción de saliva. Sin espermatogénesis.
NCC/ SLC12A3	1021	Na ⁺ /Cl ⁻	Específica de riñón Membrana apical del túbulo contorneado distal	16q13	Síndrome de Gitelman	Hipocalcemia e hipomagnesemia
KCC1/ SLC12A4	1085	K ⁺ /Cl ⁻	Ubicua	16q22	¿Hemoglobinopatías?	
KCC2/ SLC12A5	1116	K ⁺ /Cl ⁻	Específica de SNC	20q13	¿Epilepsia?	Déficit locomotor severo y muerte
KCC3/ SLC12A6	1150	K ⁺ /Cl ⁻	Amplia	15q14	Síndrome de Andermann (ACCPN)	Déficit sensorimotor, neuropatías periféricas
KCC4/ SLC12A7	1083	K ⁺ /Cl ⁻	Amplia, con poca expresión en cerebro	5p15	?	Sordera y acidosis tubular renal

Las Cinastas WNK

Las cinastas WNK constituyen un pequeño grupo de serina/treonina cinasas dentro de la superfamilia de las cinasas, identificadas en el año 2000 [20]. Fueron llamadas WNK debido a que en el sitio catalítico del dominio cinasa, presentan la sustitución de un residuo de lisina por una cisteína. Esta lisina coordina la unión del ATP [21]. Es decir no tienen una lisina en el sitio catalítico, conservada en el resto de las serina/treonina cinasas, por lo que se les llamó cinasas "sin lisina" en inglés "With No lysine=K" = WNK. La mayoría de las serina/treonina cinasas conocidas poseen este residuo catalítico en el subdominio II, mientras que en las WNKs este aminoácido se localiza en el subdominio I. Las cinastas WNK están presentes exclusivamente en eucariontes multicelulares. *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* poseen un gen ortólogo: *Arabidopsis thaliana* expresa al menos ocho genes ortólogos y en el humano se han identificado cuatro miembros de esta familia: WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4 [22] con un porcentaje de identidad entre ellos de ~40%.

Estructura genómica y distribución de las WNKs

WNK1

Actualmente WNK1 es la isoforma de la que se tiene más información en cuanto a estructura genómica y distribución tisular se refiere. Fue la primera en ser identificada durante una búsqueda de nuevos miembros de las MAP cinasas [20]. El gen que la codifica consta de aproximadamente 150 kilobases (Kb) y contiene 28 exones, sin embargo, su transcripción es compleja, ya que existen transcritos de diversas longitudes como se ha demostrado mediante análisis de Northern blot en diferentes tejidos [21, 23]. Un segundo promotor dentro del exon 1, produce un transcrito ligeramente más corto. La isoforma más larga se expresa principalmente en el corazón y músculo esquelético, así como en la mayoría de los epitelios de secreción excepto en el riñón. En éste órgano la expresión de WNK1 es particular, ya que el transcrito predominante es una isoforma corta producto de un sitio alternativo de iniciación de la transcripción dentro del exón 4, que da lugar a una proteína que carece del dominio cinasa [24]. En el riñón esta isoforma corta parece tener una función de regulación sobre la isoforma larga, que a su vez afecta la actividad del NCC [25] y del canal de potasio ROMK [26]. Los análisis de inmunolocalización para WNK1 han demostrado una distribución tejido-específica. Por ejemplo, en el riñón y en los epitelios del colon y la vejiga, su localización es citoplásmica, mientras que en los conductos biliares del hígado y en los ductos pancreáticos, se localiza principalmente en la membrana. En el humano WNK1 se localiza en el cromosoma 12 y constituye una proteína de 251 kDA compuesta de 2,382 amino ácidos. El grado de identidad de las isoformas de WNK1 entre el humano, la rata y el ratón es de ~86% [27].

WNK2

WNK2 está compuesta por 2,216 amino ácidos y se localiza en el humano en el cromosoma 9q22.31 [21]. La distribución tisular de ésta isoforma se desconoce.

WNK3

En el humano, WNK3 se localiza en el cromosoma Xp11.22 y está compuesta por 1,800 residuos de amino ácidos. Su estructura genómica se publicó recientemente y consiste de 24 exones en 165 Kb. Su transcripción produce dos variantes por empalme alternativo basadas en los exones 18 y 22. Mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), se demostró que esta isoforma se expresa en todos los tejidos del humano, con transcripción más abundante en cerebro y riñón [28]. Recientemente mediante un análisis de inmunofluorescencia, se demostró que en el riñón la WNK3 se expresa a todo lo largo de la nefrona, localizándose principalmente en las uniones intercelulares; a diferencia de la WNK1 y la WNK4, cuya expresión se limita a la nefrona distal [29]. En el cerebro de ratón los transcritos de la WNK3 son muy abundantes y su expresión se encuentra estrictamente regulada durante el desarrollo embrionario. Los estudios de hibridación *in situ* revelaron gran expresión de esta isoforma en el hipotálamo y el giro dentado, así como en las capas corticales y en los núcleos talámicos e hipotalámicos. Así mismo, en el cerebro la WNK3 se localiza en los cuerpos celulares de neuronas GABAérgicas, pero no así en la glía [30]. Se sabe que este tipo de neuronas expresan a los cotransportadores NKCC1 y KCC2 [10]. En los ductos pancreáticos, conductos biliares y el epidídimo, el análisis de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-WNK3, demostró sitios de co-expresión de esta isoforma con WNK1 y WNK4. En estos tejidos WNK3 se localiza en las uniones intercelulares. Esta isoforma se localizó también en tejidos donde no se expresan WNK1 ni WNK4, por ejemplo en el epitelio del intestino delgado y en las células secretoras de Cl⁻ en el estómago [30].

WNK4

La WNK4 se encuentra codificada por 19 exones a lo largo de 16 Kb. y la proteína consta de 1,243 residuos de amino ácidos [23]. Hasta la fecha no se han descrito variantes por empalme alternativo y a pesar de que los estudios iniciales sugerían que se expresaba únicamente en el riñón [23], con expresión citoplasmática y en las uniones intercelulares en el túbulo distal y túbulo colector; se ha demostrado que su expresión es abundante en diferentes epitelios de secreción además del riñón, por ejemplo en el cerebro, colon, páncreas, ductos biliares y el epidídimo, en donde se localiza generalmente en las uniones intercelulares [31]. Es importante hacer notar, que todos los tejidos que expresan WNK1 y WNK4 están fuertemente involucrados en el transporte de Cl⁻.

El porcentaje de identidad entre las WNKs es de aproximadamente 40%; sin embargo, las cuatro cinasas presentan una topología similar (Fig. 2) que consiste de un dominio cinasa altamente conservado subdividido en 12 dominios, característico de las serina/treonina cinasas y localizado en el extremo amino terminal, un dominio auto inhibitorio conservado y un dominio regulador carboxilo terminal [27, 32]. Generalmente, las cinasas se regulan por auto-inhibición lo cual abate la actividad de cinasa, hasta que una señal de activación apropiada libera al dominio auto-inhibitorio. Las evidencias señalan que existe un control similar en las WNKs y que éste involucra su auto-fosforilación [20, 33]. Se ha demostrado que la isoforma WNK1 auto-fosforila residuos de serina tanto *in vitro* como *in vivo*. Aparentemente los residuos clave en la auto-inhibición de la WNK1 son las serinas en las posiciones 378 y 382 ya que la auto-fosforilación de estos aminoácidos, afecta directamente la actividad de cinasa [33]. Así mismo, la auto-inhibición en la WNK1, es a su vez dependiente de dos residuos de fenilalanina altamente conservados en las posiciones 522 y 524. Estos residuos se localizan fuera del dominio de cinasa, pero dentro de un grupo de amino ácidos conservados. La mutación de estas fenilalaninas por alaninas, disminuye aproximadamente en 90% la actividad auto-inhibitoria de la WNK1 [33]. Recientemente Min y cols., [34], resolvieron la estructura cristalográfica de la conformación de baja actividad del dominio de cinasa de la WNK1 a 1.8 Å de resolución.

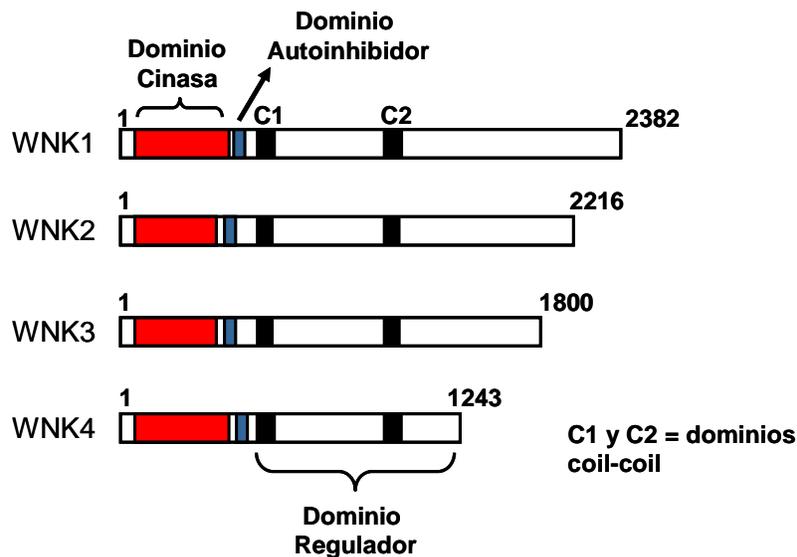


Figura 2. Topología de las cinasas WNK. Existen cuatro isoformas identificadas. En general, las WNKs poseen un dominio cinasa, mostrado en rojo y un dominio auto-inhibidor que se muestra en azul. El resto de la proteína se conoce como el dominio regulador, dentro del cual se encuentran dos dominios tipo giro-giro.

Genómica del pseudohipoaldosteronismo y el papel de las WNK en la génesis de la hipertensión arterial

El interés por el estudio de las WNKs se ha incrementado debido al hecho de que en el humano, se encuentran involucradas en la regulación de la sal por el riñón y por lo tanto en el control de la presión arterial. Mutaciones en las cinasas WNK1 y WNK4 se encontraron asociadas con una forma hereditaria de hipertensión dependiente de sal llamada pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) o síndrome de Gordon [23]. El PHAII es una enfermedad que se hereda en forma autosómica dominante y se caracteriza por la presencia de hipertensión, hipercalemia (niveles séricos de K^+ altos), acidosis metabólica e hipercloremia [35]. Este descubrimiento ha provocado una amplia búsqueda de los mecanismos fisiológicos por los cuales las WNKs regulan la presión arterial, así como la relación entre diferentes mutaciones en las WNKs y otros tipos de hipertensión [36].

Se ha observado que existen al menos cuatro genes involucrados en la producción de PHAII. Existen familias con PHAII que cosegregan con regiones en el cromosoma 1 [37], en el cromosoma 12 [38] y en el cromosoma 17 [37]. Además, hay una familia cuyo análisis de enlace fue negativo a estas tres regiones, lo que indica que debe haber un cuarto gen cuyas mutaciones pueden causar la enfermedad, pero que aún no ha sido mapeado [39]. Wilson y cols., [23] demostraron que los genes causantes de PHAII en los cromosomas 12 y 17 son la WNK1 y la WNK4, respectivamente. En el caso de la WNK1 se trata de deleciones en el intrón 1 que acortan el tamaño del intrón de 42 a 22 kb. La secuencia de la WNK1 no se ve afectada, pero si el nivel de expresión. Como consecuencia de esta deleción los niveles de expresión de la WNK1 aumentan, seguramente al perder algún elemento de regulación negativa localizado en éste intrón. Por lo tanto, el resultado es la sobreexpresión de la WNK1; es decir, ganancia en la función del gen. Este patrón bioquímico correlaciona bien con el hecho de que la enfermedad se hereda en patrón dominante, ya que con que un solo alelo esté afectado, es suficiente para que se exprese la enfermedad debido a la hiperfunción que resulta de la sobreexpresión del gen. La sobreexpresión de la WNK1 en una familia francesa con PHAII ha sido corroborada por Achard y cols., [40].

En el caso de pacientes con PHAII por mutaciones en el gen que codifica para la WNK4, las mutaciones son del tipo puntual. En todos los casos son mutaciones en una región de 10 amino ácidos, en la que todos ellos tienen carga. El cambio de un residuo con carga negativa por uno con carga positiva es causante de la enfermedad [23]. Todavía no queda claro el mecanismo molecular, ya que el PHAII por mutaciones en WNK4 también se hereda en forma autosómica dominante. Como veremos adelante, en algunos casos (en los que se afecta el canal de potasio y las proteínas claudinas) se ha observado que estas mutaciones producen ganancia en la función de WNK4, lo que correlaciona con el tipo de herencia, sin embargo, en otros casos como las mutaciones que afectan al NCC resultan en pérdida de la función. Para explicar una enfermedad dominante con pérdida de la función, el mecanismo tendría que ser el de la haploinsuficiencia o bien, que el producto del alelo mutado interactúe en forma negativa con el producto del alelo normal.

No se ha identificado todavía el gen en el cromosoma 1 causante de PHAII en las familias reportadas por Mansfield y cols., [37].

Regulación de los cotransportadores electroneutros por las cinasas WNK1 y WNK4: Mecanismo del pseudohipoaldosteronismo tipo II

En el riñón, las WNK4 y WNK1 fueron identificadas mediante anticuerpos específicos en el túbulo distal y el túbulo colector. Estos segmentos adyacentes de la nefrona son importantes para la homeostasis del pH, del NaCl y del K^+ . Los descubrimientos de que las mutaciones en los genes *prkwnk1* y *prkwnk4* ocasionan PHAII, junto con el hecho de su localización en la nefrona

distal, parecen indicar que estas cinasas forman parte de una nueva vía de señalización, importante para el control de la presión sanguínea y la homeostasis de los electrolitos. La regulación de estas cinasas, de los efectores y reguladores de la vía, así como los mecanismos causantes de la enfermedad, aún no se conocen totalmente, sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo múltiples estudios en los que se ha analizado el papel fisiológico y fisiopatológico de la WNK4.

Los estudios iniciales para definir las bases genéticas del PHAI se enfocaron en el cotransportador de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC), debido a dos razones principales. La primera es que el fenotipo del PHAI se corrige por completo con el tratamiento con diuréticos tipo tiazidas, los cuales inhiben específicamente la reabsorción de NaCl a través del NCC en el TD [35]. La segunda razón es que el fenotipo del PHAI es la imagen en espejo del síndrome de Gitelman, una enfermedad de herencia autosómica recesiva que se caracteriza por alcalosis metabólica, hipocalcemia e hipotensión arterial, originado por mutaciones de pérdida de función en el NCC [41]. Estas observaciones son consistentes con hiperfunción del NCC como la causa del PHAI, por lo que inicialmente se sugirió que la presencia de mutaciones de ganancia de función en el NCC, podrían ser las causantes del PHAI. Sin embargo, no se encontró evidencia de enlace positivo en familias con PHAI y la región del cromosoma 16 en donde se localiza el gen *slc12a3* que codifica para el NCC [42]. Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que las WNK regulen la función del NCC y que alteraciones en dicha regulación resulten en hiperfunción del NCC. Esta hipótesis se evaluó simultáneamente en nuestro laboratorio y en el de Ellison y col., [43, 44]. En ambos casos se demostró que WNK4 regula la actividad del NCC. Cuando el transportador se co-expresó en ovocitos de *X. laevis* con WNK4, la captación de Na^+ por el NCC disminuyó en más del 70% cuando se comparó con ovocitos inyectados únicamente con el NCC. Los experimentos realizados tanto con la proteína verde fluorescente unida al NCC, como la inmunodetección de la expresión del NCC en la superficie celular, demostraron que el efecto de WNK4 sobre el NCC está mediado en gran parte por la reducción en la llegada del cotransportador a la membrana plasmática del ovocito. Este efecto fue dependiente de la actividad cinasa, ya que al co-inyectar una mutante de WNK4 sin actividad cinasa, no se produjo ninguna reducción en la función del NCC [43]. Cuando se analizó el efecto de las mutaciones de WNK4 que originan PHAI, éstas eliminaron tanto la inhibición de la actividad del NCC por WNK4, como la reducción en la expresión del transportador en la membrana. A estas observaciones le siguieron aquellas realizadas en el canal de potasio ROMK y en las claudinas. Utilizando una estrategia similar en ovocitos de *X. laevis*, Kahle y cols., [45] observaron que WNK4 inhibe la función de ROMK y que las mutaciones de WNK4 producen mayor inhibición del canal. El mecanismo no depende de la actividad cinasa de WNK4 y al parecer resulta de la regulación de la expresión de ROMK en la membrana celular por un mecanismo relacionado con la internalización de vesículas vía clatrina. En el caso de las claudinas 1, 2 3 y 4, consideradas como transportadores paracelulares de cloro, se ha observado que la WNK4 incrementa su función y que las mutaciones de tipo PHAI tienen un efecto positivo, de tipo ganancia en la función [46]. Por lo tanto, la propuesta que se acepta en este momento es que la WNK4 inhibe la función del NCC y estimula la función de ROMK y las claudinas. Las mutaciones de tipo PHAI en la WNK4 resultan en pérdida de la función inhibitoria del NCC. La consecuencia de esto es el aumento en la tasa de reabsorción de sal con el consecuente desarrollo de hipertensión arterial. Por otro lado, las mutaciones de tipo PHAI en WNK4 también producen ganancia en la función sobre la inhibición de ROMK y la estimulación de las claudinas. Esto resulta en disminución de la secreción de potasio en el túbulo colector, con el consecuente desarrollo de la hipercalcemia [27].

A diferencia de WNK4, en la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento, la WNK1 no ha mostrado tener efecto directo sobre el NCC u otros sistemas de transporte de la nefrona distal. Al parecer, la WNK1 tiene efecto indirecto a través de su interacción y regulación de otras cinasas, incluyendo la WNK4. Por ejemplo, en ensayos de expresión heteróloga del NCC en ovocitos de *X. laevis* se ha observado que WNK1 no tiene efecto sobre la actividad del NCC. Sin embargo, WNK1 bloquea el efecto inhibitorio de WNK4 sobre el NCC, es decir, WNK1 inhibe a WNK4 [44, 47]. De hecho, se ha observado que existe interacción entre WNK1 y WNK4

y que la actividad de WNK1 regula la auto-fosforilación de la WNK4 [36, 48]. Así mismo, recientemente se ha observado tanto a nivel bioquímico [49-50] como funcional [51] que la WNK1 regula la actividad de las cinasas SPAK y OSR1. Estas cinasas pertenecen al grupo de las cinasas STE-20 (Ste-20 related proline-alanine-rich kinase) [52] y en los últimos años se ha obtenido evidencia de que interaccionan y regulan la función de algunos miembros de la familia de los CEN [53-54], particularmente la del NKCC1. En otras palabras, evidencias recientes sugieren que la WNK1 regula la actividad de cotransportadores de la familia de los CEN a través de la interacción con SPAK y OSR1. Adicionalmente, existe también evidencia de que WNK1 puede regular la función del canal epitelial de sodio del túbulo colector a través su interacción con otra cinasa conocida como SGK1 (serum-glucocorticoid kinase 1) [55].

En el riñón como se mencionó, se expresa predominantemente una isoforma corta de la WNK1, cuyo inicio de transcripción ocurre en el intron 4 y carece de la mayor parte del dominio cinasa. ¿Cómo entonces el aumento en la expresión de la isoforma larga de la WNK1 produce las consecuencias renales de PHAI como hipertensión arterial e hipercalemia?. La respuesta a esta pregunta parece ser la interacción entre ambas isoformas de la WNK1. Dos trabajos recientes abordan este punto. Subramanya y cols., [25] analizaron el efecto de la interacción entre las isoformas corta y larga de la WNK1 sobre la función del NCC, mientras que Lazrak y cols., [26] hicieron lo mismo sobre el canal de potasio ROMK. La conclusión de ambos estudios fue la misma. La isoforma corta inhibe a la isoforma larga de WNK1. Así, en pacientes con PHAI lo que sucede es que la sobreexpresión de la isoforma larga sobrepasa el efecto regulador negativo de la isoforma corta. Es decir WNK1 inhibe el efecto negativo de WNK4 sobre el NCC y este efecto inhibitorio de WNK1 es a su vez bloqueado por la isoforma corta de WNK1. Por lo tanto, la cadena de eventos es la siguiente: en condiciones normales hay 9 veces más isoformas cortas que largas de WNK1, por lo que WNK1 permanece inhibida. En los pacientes con PHAI, se invierte esta proporción y ahora hay 9 veces más isoforma larga que isoforma corta, por lo que esta última ya no puede inhibir a la isoforma larga de WNK1. Esto tiene como consecuencia que la isoforma larga de WNK1, ahora activa, inhiba en forma exagerada a la WNK4, que a su vez deja de inhibir al NCC y esto trae como consecuencia el aumento en la tasa de reabsorción de sal en el túbulo distal e hipertensión arterial.

Como se mencionó WNK4 además de expresarse en el riñón, se expresa ampliamente en diferentes epitelios involucrados en el manejo de Cl⁻, lo cual sugiere que esta cinasa, podría estar regulando la actividad de un diverso grupo de proteínas involucradas en la regulación del transporte de Cl⁻ en estos epitelios. En 2004, Kahle y cols., [31] demostraron que WNK4 regula la actividad de NKCC1; uno de los principales reguladores del transporte de Cl⁻ en la membrana basolateral de las células epiteliales. La entrada de Cl⁻ a través del NKCC1 es parte integral para la secreción de éste ión en epitelios como los de los conductos pancreáticos, el colon, los conductos sudoríparos, el epidídimo y el tracto respiratorio [56]. El efecto de WNK4 sobre el NKCC1 se analizó en ovocitos de *X. laevis*, en donde al co-expresarlos la cinasa redujo en más de un 95% la actividad del cotransportador. De manera similar al NCC, la inhibición del NKCC1 por WNK4, ocurre por una reducción en la expresión del cotransportador en la membrana. Lo anterior demuestra que WNK4 juega un papel en la regulación y flujo de los electrolitos en diversos epitelios extra-renales.

Regulación de los cotransportadores electroneutros por la cinasa WNK3

Hasta la fecha, se conoce poco sobre la regulación de WNK2 y WNK3. Recientemente, nuestro grupo de investigación llevo a cabo el análisis del efecto de WNK3 sobre la función de los CEN [29, 30, 57].

En estos estudios se empleo la técnica de expresión funcional en ovocitos de *X. laevis*, en los cuales se microinyectó el RNA complementario (RNAc) de diversos cotransportadores (NCC, NKCC, o KCCs) solos o en presencia del RNAc de WNK3. Además de analizar para cada

caso el efecto de la WNK3 silvestre, también se evaluó el papel de una variante de WNK3 denominada WNK3-D294A. Ésta posee una mutación puntual que elimina la actividad de cinasa, lo que permite determinar si el efecto observado en la WNK3 silvestre depende o no de la actividad de cinasa. Tomando en cuenta que en WNK4, algunos de sus efectos dependen de la actividad de cinasa [43, 46], mientras que otros no [45].

En contraste con el efecto inhibitorio reportado de WNK4 sobre el NCC, la co-expresión de WNK3 con éste transportador, produjo un incremento significativo en su actividad; por otro lado, la mutante WNK3-D295A redujo en ~85% la captación de $^{22}\text{Na}^+$ [29] (Fig. 3A). Cuando WNK3 se co-expresó con el NCC unido a la proteína verde fluorescente (NCC-GFP), WNK3 incrementó al triple la expresión de NCC-GFP en la superficie del ovocito, mientras que la cinasa no funcional, produjo el efecto contrario (Fig. 3A). Estos resultados correlacionan con los efectos observados en los ensayos de captación y sugieren que WNK3 regula al NCC y que al menos parte de esta regulación se logra a través de la modificación de la presencia del NCC en la membrana plasmática. De manera similar, la actividad de NKCC2 y de NKCC1 se incrementó al doble cuando se co-inyectaron con la WNK3 silvestre, mientras que la cinasa no funcional inhibió los dos transportadores en ~70% [30] (Fig. 3B y 3C). La activación de NKCC2 y NKCC1 se asoció con un aumento en la fosforilación de dos residuos de treonina en los extremos amino terminales de los transportadores, necesarios para su completa activación. Por otra parte, cuando se co-expresaron con la cinasa mutada, la fosforilación de los transportadores se redujo en forma significativa, lo cual puede correlacionarse con la inhibición de la actividad observada. Lo anterior indica que los efectos de WNK3 sobre NKCC1 y NKCC2 están asociados con la fosforilación de los sitios regulatorios del extremo amino terminal, mientras que el efecto dominante negativo de la cinasa mutada, podría atribuirse a la actividad de fosfatasa sobre los transportadores.

Nuestros datos sugieren que en el riñón, la cinasa WNK3 incrementa de manera importante la entrada apical de NaCl en el túbulo distal y en el asa de Henle a través de estos cotransportadores, a diferencia de WNK1 y WNK4 cuya acción se localiza hacia regiones más distales de la neurona. Es posible que WNK3 también lleve a cabo alguna función en estas mismas regiones. La activación por la WNK3 es específica, ya que puede ser revertida por la sustitución de un amino ácido del dominio de cinasa. Los efectos de la forma inactiva de WNK3 sobre los NCC y NKCC son interesantes y podrían reflejar un efecto *in vivo* normal, el cual podría regularse a través de la auto-fosforilación de la WNK3 [36].

En contraste a la activación del NCC y el NKCC, WNK3 produjo un potente efecto inhibitorio sobre las isoformas del transportador de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$, aún en condiciones hipotónicas bajo las cuales los cotransportadores de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ se encuentran activos. Cuando los experimentos se llevaron a cabo en presencia de la mutante WNK3-D294A, bajo condiciones isotónicas en las cuales los KCCs son normalmente inactivos, se observó un incremento significativo en su función (Fig. 4A y 4B).

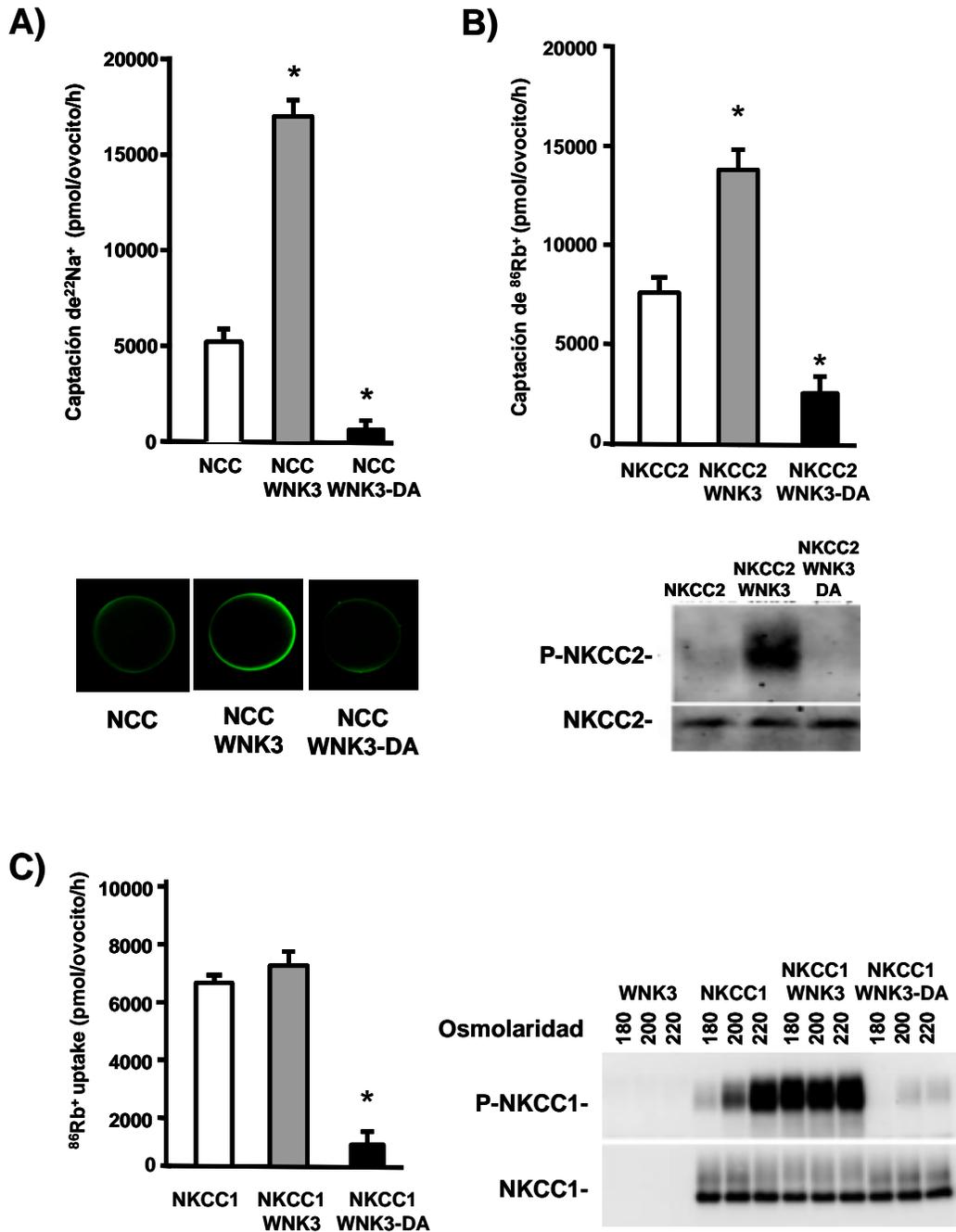


Figura 3. A) Ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con los RNAs del NCC solo, en combinación con WNK3 silvestre o con la WNK3 catalíticamente inactiva. En el panel inferior se muestra la regulación de la expresión del NCC en la membrana. Los ovocitos se inyectaron con RNAc del NCC marcado con EGFP o en combinación con WNK3 silvestre o mutante. La expresión en la superficie del NCC se cuantificó por microscopía confocal. B) Ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con los RNAs del NKCC2, en combinación con WNK3 silvestre o con la WNK3 catalíticamente inactiva. En el panel inferior se muestra que WNK3 regula la fosforilación del NKCC2. Western Blot empleando el anticuerpo antifosfo- NKCC2 o anti-NKCC2 C) Ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con los RNAs del NKCC1, en combinación con WNK3 silvestre o con la WNK3 catalíticamente inactiva. Western Blot empleando el anticuerpo antifosfo- NKCC1 o anti-NKCC1. Todos los ensayos de captación de iones radiactivos se llevaron a cabo en condiciones de isotonicidad.

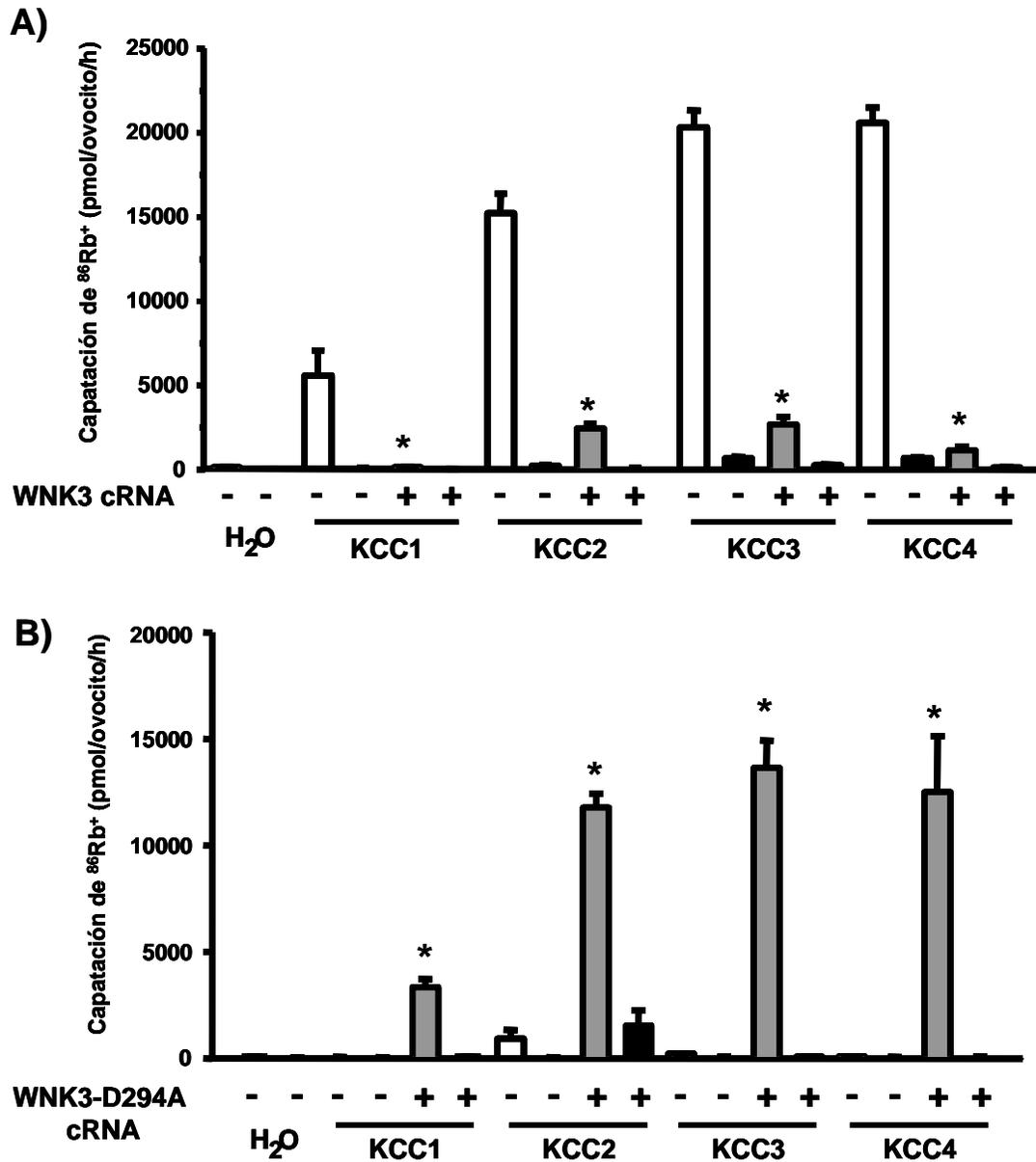


Figura 4. A) Efecto de WNK3 silvestre en el cotransporte de K^+Cl^- inducido por aumento del volumen celular bajo condiciones hipotónicas. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con agua ó 0.2 $\mu g/\mu l$ de RNAc de cada KCC o junto con el RNAc de WNK3 silvestre. B) Efecto de WNK3-D294A catalíticamente inactiva sobre el cotransporte de K^+Cl^- en condiciones isotónicas. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con agua ó 0.2 $\mu g/\mu l$ de RNAc de cada KCC o junto con el RNAc de WNK3-D294A. La captación de $^{86}Rb^+$ se evaluó 4 días después en condiciones hipotónicas en presencia (barras blancas) o ausencia de Cl^- (barras negras) en el medio de captación. Cada barra representa el promedio \pm ES de 15 ovocitos por cada grupo *, $p < 0.01$ vs. control.

En resumen, hemos observado que WNK3 activa a los transportadores que inducen la entrada de cloro a la célula (NCC, NKCC2 y NKCC1) e inactiva a los KCCs encargados de sacar éste ión de la célula. Sorprendentemente, la mutante WNK3-D294A tiene el efecto contrario: inhibe a los NCC, NKCC2 y NKCC1, pero activa a los KCCs. Los efectos de la mutante WNK3-D294A son independientes de lo que suceda con el volumen celular. Por un lado, en condiciones hipotónicas, WNK3 bloquea la activación de los KCCs, mientras que en condiciones de isotonicidad, en las que permanecen inactivos los KCCs, la mutante WNK3-D294A induce la activación de estos cotransportadores. Esto indica que la presencia de WNK3 y la mutante WNK3-D294A tiene efectos similares a los que se obtienen para la modificación del volumen celular. Dado que los CEN participan de manera importante en la regulación del volumen celular, proponemos que WNK3 puede ser la cinasa o una de las cinasas que responden a Cl⁻ y que regulan el volumen celular en respuesta a cambios osmóticos y/o cambios en la [Cl⁻]. Estos eventos pueden tener implicaciones importantes en múltiples fenómenos fisiológicos en los que los CEN están involucrados, como la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la regulación de la presión arterial.

Referencias

1. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E y Haussinger D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247-306.
2. Gamba G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-493.
3. Gamba G, Saltzberg S N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger M A, Brenner B M y Hebert S C. (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2749-2753.
4. Xu J-C, Lytle C, Zhu T T, Payne J A, Benz Jr.E y Forbush III B. (1994). Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2201-2205.
5. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA y Hebert SC. (1994). Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722.
6. Gillen C M, Brill S, Payne J A and Forbush III B. (1996). Molecular cloning y functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244.
7. Mount D B, Mercado A, Song L, Xu J, George Jr.A L, Delpire E y Gamba G. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362.
8. Payne J A, Stevenson T J y Donaldson L F. (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271: 16245-16252.
9. Mercado A, Mount DB y Gamba G. (2004). Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29: 17-25.
10. Delpire E. (2000). Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15: 309-312.
11. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr. y Roccella EJ. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 289: 2560-2571.
12. Delpire E y Mount DB. (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64: 803-843.
13. Monroy A, Plata C, Hebert SC y Gamba G. (2000). Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161-F169.
14. Moreno E, Tovar-Palacio C, De Los HP, Guzman B, Bobadilla NA, Vazquez N, Riccardi D, Poch E y Gamba G. (2004). A single nucleotide polymorphism alters the activity of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter and reveals a role for transmembrane segment 4 in chloride and thiazide affinity. *J Biol Chem* 279: 16553-16560.

15. Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC y Gamba G. (2002). Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem* 277: 11004-11012.
16. Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB y Gamba G. (2000). Functional Comparison of the K⁺-Cl⁻ Cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 275: 30326-30334.
17. Song L, Mercado A, Vazquez N, Xie Q, Desai R, George AL, Gamba G y Mount DB. (2002). Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103: 91-105.
18. Flatman PW. (2002). Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1566: 140-151.
19. Lytle C. (1998). A volume sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 274: C1002-C1010.
20. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ y Cobb MH. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275: 16795-16801.
21. Verissimo F y Jordan P. (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20: 5562-5569.
22. Kahle KT, Wilson FH y Lifton RP. (2005). Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends Endocrinol Metab* 16: 98-103.
23. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X y Lifton RP. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112.
24. Cope G, Golbang A y O'Shaughnessy KM. (2005). WNK kinases and the control of blood pressure. *Pharmacol Ther* 106: 221-231.
25. Subramanya AR, Yang CL, Zhu X y Ellison DH. (2006). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F619-F624.
26. Lazrak A, Liu Z y Huang CL. (2006). Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1615-1620.
27. Gamba G. (2005). Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F245-F252.
28. Holden S, Cox J y Raymond FL. (2004). Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* 335: 109-119.
29. Rinehart J, Kahle KT, de los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G y Lifton RP. (2005). WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16777-16782.
30. Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I y Lifton RP. (2005). WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16783-16788.
31. Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, Aronson PS y Lifton RP. (2004). WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2064-2069.
32. Wang Z, Yang CL y Ellison DH. (2004). Comparison of WNK4 and WNK1 kinase and inhibiting activities. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 939-944.
33. Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ y Cobb MH. (2002). Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J Biol Chem* 277: 48456-48462.
34. Min X, Lee BH, Cobb MH y Goldsmith EJ. (2004). Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase that Causes a Hereditary Form of Hypertension. *Structure (Camb)* 12: 1303-1311.
35. Gordon RD. (1986). Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension* 8: 93-102.
36. Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, Goldsmith EJ y Cobb MH. (2005). Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 280: 26653-26658.
37. Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N y Lifton RP. (1997). Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet* 16: 202-205.
38. Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, Corvol P y Jeunemaitre X. (2000). A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am J Hum Genet* 67: 302-310.

39. Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM, Stern N, Delahousse M, Potier J, Ader JL y Jeunemaitre X. (2001). Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. *J Hypertens* 19: 1957-1964.
40. Achard JM, Warnock DG, Disse-Nicodeme S, Fiquet-Kempf B, Corvol P, Fournier A y Jeunemaitre X. (2003). Familial hyperkalaemic hypertension: phenotypic analysis in a large family with the WNK1 deletion mutation. *Am J Med* 114: 495-498.
41. Simon D B, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet F E, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner H M, Koolen M, Gainza F J, Gitelman H J y Lifton R P. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 12: 24-30.
42. Simon DB, Farfel Z, Ellison D, Bia M, Tucci J, y Lifton RP. (1995). Examination of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a candidate gene in Gordon's syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 6: 632.
43. Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G y Lifton RP. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 680-684.
44. Yang CL, Angell J, Mitchell R y Ellison DH. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111: 1039-1045.
45. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC y Lifton RP. (2003). WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nat Genet* 35: 372-376.
46. Kahle KT, MacGregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, Ardito T, Kashgarian M, Giebisch G, Hebert SC, Boulpaep EL y Lifton RP. (2004). Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: Insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14877-14882.
47. Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR and Ellison DH. (2005). Mechanisms of WNK1 y WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest* 115: 1379-1387.
48. Yang CL y Ellison DH. (2003). WNK1 interacts physically with WNK4. *J Am Soc Nephrol* 14: 77A.
49. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K y Shibuya H. (2005). WNK1 Regulates Phosphorylation of Cation-Chloride-coupled Cotransporters via the STE20-related Kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 280: 42685-42693.
50. Vitari AC, Deak M, Morrice NA y Alessi DR. (2005). The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391: 17-24.
51. Gagnon KB, England R y Delpire E. (2006). Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C134-C142.
52. Strange K, Denton J y Nehrke K. (2006). Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology (Bethesda)* 21: 61-68.
53. Piechotta K, Lu J y Delpire E. (2002). Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277: 50812-50819.
54. Dowd BF y Forbush B. (2003). PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem* 278: 27347-27353.
55. Xu BE, Stippec S, Chu PY, Lazrak A, Li XJ, Lee BH, English JM, Ortega B, Huang CL y Cobb MH. (2005). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10315-10320.
56. Haas M y Forbush B, III. (2000). The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol* 62: 515-534.
57. de los Heros P, Kahle KT, Rinehart J, Bobadilla NA, Vazquez N, San Cristobal P, Mount DB, Lifton RP, Hebert SC y Gamba G. (2006). WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1976-1981.

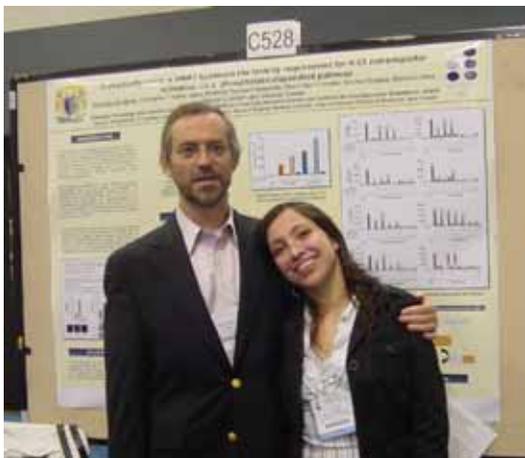
REGULACIÓN DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS POR LAS CINASAS WNK

Resumen

La familia de cotransportadores electroneutros de cationes-Cl⁻ (SLC12A) esta conformada por 2 ramas principales: la de los cotransportadores de K⁺-Cl⁻, compuesta por cuatro miembros (KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4) y la de los cotransportadores de Na⁺-(K⁺)-Cl⁻, compuesta por tres miembros (NCC, NKCC1 y NKCC2). Los cotransportadores de K⁺-Cl⁻ regulan el eflujo de Cl⁻, son inhibidos por fosforilación y se activan por desfosforilación. Los cotransportadores de Na⁺-(K⁺)-Cl⁻ regulan el influjo de Cl⁻ y se activan por fosforilación. Las mutaciones en algunos de los miembros de esta familia se encuentran relacionadas con enfermedades en el humano, otros constituyen el blanco de diversos diuréticos y en general se encuentran involucrados en la regulación del volumen celular, la excitabilidad neuronal y la presión sanguínea. Se ha propuesto una vía de cinasas y fosfatasas que coordina las actividades de estos cotransportadores, sin embargo, los mecanismos involucrados aún se desconocen. Estudios recientes indican que las cinasas WNK, una familia recientemente descrita de cuatro serina treonina cinasas, regulan a la familia SLC12A. Las mutaciones en WNK1 y WNK4 dan origen al síndrome de Gordon, una forma hereditaria de hipertensión que se caracteriza por la presencia de hipercalemia (alta concentración de potasio en sangre) y acidosis metabólica. Se ha demostrado que WNK4 regula a NCC y a NKCC1. Algunos de estos efectos son dependientes de la actividad de cinasa, mientras que otros son independientes de su actividad catalítica. Así mismo, WNK1 modula el efecto de WNK4 sobre el cotrasportador NCC. Se ha observado que WNK1 activa también a la proteína cinasa SPAK, la cual regula la activación de diversos canales iónicos epiteliales, que incluyen a la familia SLC12A. WNK3 se co-expresa con varios cotransportadores catión/Cl⁻ en diversos tejidos regulando su actividad. Estos datos sugieren que las WNKs, son componentes cruciales de la vía de señalización de cinasas y fosfatasas que regulan de forma coordinada el eflujo e influjo de Cl⁻ a través de los cotransportadores electroneutros.

Palabras clave: Cotransportador electroneutro catión/Cl⁻, cinasas WNK, fosforilación, electrolitos, presión sanguínea, volumen celular, excitabilidad neuronal.

Semblanza del Dr. Gerardo Gamba.



Gerardo Gamba nació en 1961. Es Médico Cirujano por la Facultad de Medicina de la UNAM (1984). Especialista en Medicina Interna y de Nefrología por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (1985 a 1990). En ambas especialidades recibió certificación por parte de los consejos correspondientes. En su preparación como investigador científico recibió con mención honorífica los grados de Maestro (1990) y Doctor (1994) en Ciencias Médicas por parte de la Facultad de Medicina de la UNAM. Realizó una estancia post-doctoral de 3 años en la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard. Fue becario de instituciones nacionales como CONACYT, la SEP y la Fundación México en Harvard, e

internacionales como *Fogarty International Center* y la *American Heart Association*.

Actualmente es jefe de la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, localizada en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Es investigador titular C/PRIDE D y miembro del Sistema Nacional de Investigadores, en el nivel III. Ha publicado 74 artículos en revistas internacionales, muchos de ellos en revistas con alto factor de impacto, por los que ha recibido por esto más de 3000 citas. Ha dirigido 13 tesis (7 de licenciatura, 2 de maestría y 4 de doctorado). Recibió en 1999 el Premio Miguel Alemán Valdés en el área de la Salud y la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos en el área de Ciencias Naturales. Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias (1999) y de la Academia Nacional de Medicina (2003).

La principal actividad del Dr. Gamba es la investigación científica. Sin embargo, dedica parte de su tiempo a la clínica, a la docencia, y al trabajo editorial. Cuatro meses del año es revisor en pisos de hospitalización en medicina interna o nefrología en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Es profesor titular de la materia de fisiología humana en la Facultad de Medicina de la UNAM y en la Facultad Mexicana de Medicina de la Universidad La Salle. Es editor en jefe de la Revista de Investigación Clínica, la cual es una de las revistas mexicanas indizadas en todos los índices internacionales. En esta ha publicado 45 manuscritos en español, 19 de los cuales son de investigación clínica original y el resto de revisión o editoriales.

Semblanza de maestra Paola de los Heros

Paola de los Heros es Bióloga por la Facultad de Ciencias y Maestra en Ciencias Bioquímicas por la Facultad de Química de la UNAM. Actualmente está realizando su tesis doctoral. Las tres tesis la realizó bajo la tutela del Dr. Gerardo Gamba. Su productividad es poco usual en un estudiante de doctorado. Es autora en siete manuscritos. Tres publicados en la revista *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, tres en el *American Journal of Physiology* y uno en el *Journal of Biological Chemistry*.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES DE ALERGENOS DE HULE Y DE SU INTERACCIÓN CON ANTICUERPOS

Adela Rodríguez Romero, Martha Pedraza Escalona y César Augusto Reyes López

Instituto de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Circuito exterior, Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510, México, D. F.

adela@servidor.unam.mx

Abstract

Ig-E mediated allergies are considered a serious health-problem in the industrialized world, due to the capacity of some normally innocuous proteins (allergens) to induce allergic reactions in sensitized patients. Different research groups are focusing their efforts to perform immunological and molecular studies to determine the basis of the allergenic potential and the cross-reactivity of allergens, which could be related to their intrinsic physicochemical and structural characteristics. Latex allergy has received worldwide attention during the last decade; therefore, there have been many attempts to explain the increase in the incidence of allergy caused by latex proteins. Recently, substantial progress has been made in the expression, purification and molecular characterization of several rubber latex allergens; nevertheless, information on their tertiary structure is limited. While cross-reactivity is, to a large extent, predictable from primary sequence comparisons, the IgE-inducing capacity is mostly determined by factors other than the primary sequence. The knowledge of the three-dimensional structure, from experimental methods, will simplify the identification and enhance the possibility to modify conformational epitopes, thus making them important tools in diagnosis of latex allergy as well as potential immunotherapy agents.

Keywords: Plant allergens, antibody interaction, X-ray structure.

Introducción

Las enfermedades alérgicas o reacciones de hipersensibilidad representan un grave problema de salud pública, principalmente en los países industrializados, por lo que se les considera como las epidemias del siglo XXI. Enfermedades tales como la rinitis, el asma, la dermatitis atópica y la conjuntivitis están asociadas a factores ambientales y a la predisposición genética de cada individuo, manifestándose como una respuesta exagerada a sustancias normalmente inocuas llamadas alérgenos. Los alérgenos proteicos son una clase especial de antígenos, los cuales están agrupados de acuerdo a la fuente de donde provienen y el orden en el cual fueron descubiertos, y se consideran como muy importantes si al menos un 50% de los pacientes sensibilizados reaccionan a ellos. Estas proteínas desencadenan respuestas agudas de los linfocitos T tipo 2 (Th2), culminando en la producción de inmunoglobulinas de tipo E (IgE).

Las reacciones alérgicas consisten de una serie de eventos que inician con el reconocimiento de la estructura del alérgeno nativo por las células presentadoras del antígeno, tales como las células dendríticas y finalizan con la producción de los anticuerpos IgE y la sensibilización de los mastocitos. Dependiendo del mecanismo de acción que provoca daño al organismo, se han descrito cuatro tipos de hipersensibilidad (I-IV). En el caso de la hipersensibilidad de tipo I o inmediata, los alérgenos son capaces de inducir una respuesta inmune al interactuar con las IgEs. Estas últimas están acopladas a receptores de alta afinidad ($Fc\epsilon RI$) localizados en la membrana de las células cebadas o mastocitos y basófilos. La activación de estos receptores provoca la liberación de mediadores de la inflamación, tales como la histamina, seguida de la síntesis y liberación de leucotrienos y prostaglandinas, desencadenando las reacciones alérgicas (Fig. 1) [1,2].

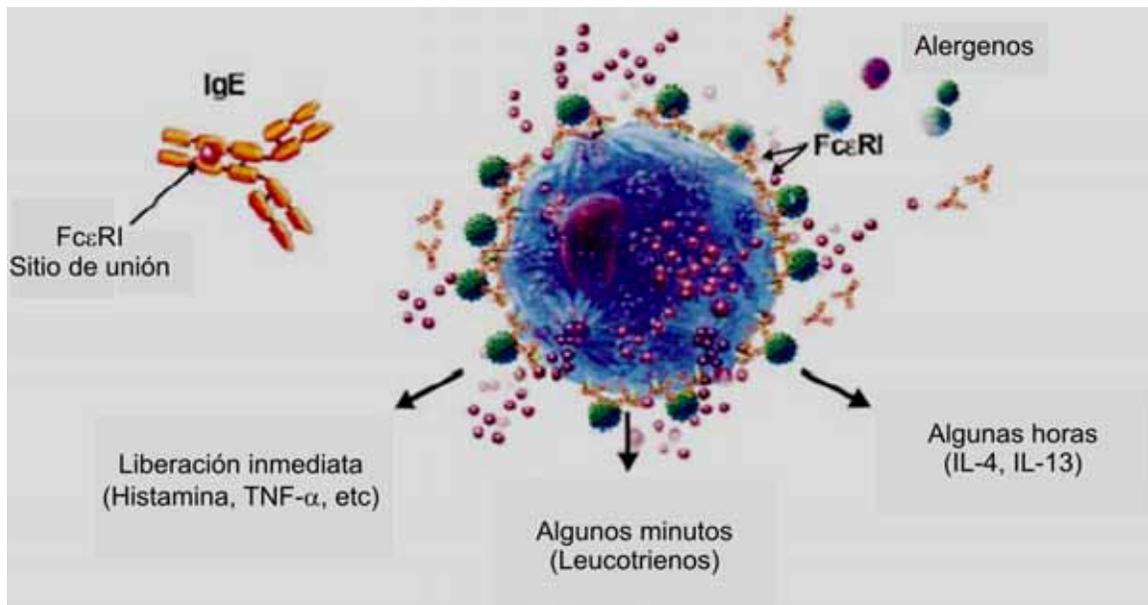


Figura 1. Esquema de la cascada de eventos que ocurren en la hipersensibilidad de tipo I durante la activación de los mastocitos. Estas células liberan una gran variedad de mediadores químicos y citocinas que producen la respuesta e inflamación alérgica.

Se ha estimado que alrededor del 25 % de la población mundial padece o ha padecido reacciones de hipersensibilidad del tipo I en alguna etapa de su vida. Este padecimiento inicia

con una sensibilización previa en los primeros años de vida o durante periodos de exposición prolongados con las diversas fuentes de alergenos proteicos como son algunas plantas, insectos o animales.

Alergenos proteicos de origen vegetal

Las proteínas alergénicas cumplen funciones biológicas específicas en los organismos que las originan, pero en el hombre y en algunos animales inducen la producción elevada de IgEs [3]. Por ejemplo, algunas de ellas son producidas por las plantas en respuesta al ataque de los insectos, o bien por infecciones causadas por hongos, virus o bacterias. Varias proteínas de este tipo son comunes, por lo que se les ha clasificado en 17 familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (RP). Muchas están presentes en forma constitutiva en los tejidos florales y un número importante de proteínas RP, presentes en el polen, frutos y vegetales son las que provocan las reacciones alérgicas en el hombre. En general, este tipo de alergenos son proteínas que unen carbohidratos, entre las que se encuentran glicohidrolasas, como las quitinasas y las β -1,3-glucanasas, y lectinas que unen oligosacáridos de N-acetil glucosamina, como la aglutinina del germen de trigo. También se ha demostrado que una familia de proteínas de transferencia de lípidos, asociadas a los mecanismos de defensa de las plantas, pueden producir reacciones alérgicas en el hombre [3]. Existen otros ejemplos de alergenos clínicamente relevantes cuya actividad biológica es conocida, como el caso de algunas proteasas, lisozimas, algunas proteínas con funciones estructurales como la profilina del polen de árboles y pastos y también algunas proteínas de reserva [4]. Sin embargo, a la fecha no existen evidencias que relacionen la actividad biológica con la capacidad que tienen ciertas proteínas para inducir la producción elevada de IgEs en los pacientes alérgicos. Es decir, no existe una respuesta a la pregunta fundamental de cómo hace un alergeno para que el sistema inmune responda de esa manera.

La comprensión que se tiene de las alergias ha tomado mucho tiempo y gracias a las técnicas modernas de biología molecular ha sido posible postular mecanismos celulares y moleculares que expliquen este tipo de enfermedades. Por otra parte, varios grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos a la identificación y la caracterización bioquímica, fisicoquímica y estructural de las proteínas alergénicas, conduciendo a avances muy importante en esta materia. Con el fin de encontrar características moleculares que pudieran dar información acerca del por qué algunas proteínas producen reacciones de hipersensibilidad, se han determinado las estructuras tridimensionales de varios alergenos de las plantas, ya sea utilizando técnicas experimentales como la difracción de rayos X y la resonancia magnética nuclear, o bien mediante modelos teóricos obtenidos *in silico*. Basados en estos resultados, algunos grupos han clasificado a los alergenos con base al plegamiento y contenido de estructura secundaria, proponiendo una subdivisión en cuatro familias estructurales definidas: alergenos ricos en hebras beta, ricos en hélices alfa o bien aquellos con hojas beta asociadas a hélices alfa [4,5]. No obstante, al comparar a estas proteínas y sus estructuras, es evidente que la alergenicidad no puede ser racionalizada con base a los patrones de plegamiento o la función biológica, ya que cualquier proteína podría considerarse como un alergeno potencial. La hipótesis entonces es que debe existir un patrón molecular de reconocimiento superficial.

Estructura de alergenos de plantas y de los complejos Fragmento de unión al antígeno (Fab)-alergeno.

La importancia de la caracterización molecular de los alergenos proteicos se ha hecho evidente en la búsqueda de alternativas profilácticas que combatan, de forma eficaz, a las alergias que cada día afectan a más personas en todo el mundo. Asimismo, es importante en el desarrollo de pruebas diagnósticas integrales para poder así ofrecer alternativas a los pacientes que presentan hipersensibilidad a algunas proteínas. No obstante, el debate de “qué hace a una

proteína un alérgeno” es todavía motivo de discusión. Se ha llegado a la conclusión de que los alérgenos proteicos poseen características que les permiten estimular a las células inmunes y a los mastocitos, y que esto depende de cómo son presentados al sistema inmune.

En la estructura molecular de las proteínas alérgicas existen regiones inmunodominantes, denominadas epítomos, las cuales interactúan con los fragmentos de unión al antígeno (Fab) de las inmunoglobulinas IgE. El uso de péptidos derivados de la secuencia lineal de algunos alérgenos ha permitido establecer la presencia de epítomos lineales o secuenciales reconocidos por las IgE de sueros de pacientes. Cuando la proteína está plegada, algunos de estos residuos de aminoácidos se encuentran cercanos entre sí y expuestos al disolvente, formando lo que se conoce como epítomos discontinuos o conformacionales. La información actual sobre este tipo de epítomos conformacionales es aún escasa, debido principalmente al limitado número de estructuras tridimensionales de alérgenos que están reportadas a la fecha. En la base de datos SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins), la cual proporciona información acerca de la secuencia, estructura y epítomos secuenciales (IgE) de alérgenos, se muestra que únicamente existen reportes de la estructura terciaria del 10 % de las moléculas. Además, también se indica la carencia de discriminadores fisicoquímicos, tales como volumen e hidrofobicidad de los residuos involucrados en un epítomo, que definan a las proteínas alérgicas (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>) [6,7].

Por lo tanto, los estudios estructurales, tanto de los anticuerpos y complejos alérgeno-anticuerpo, así como los de los receptores de alta afinidad son fundamentales en la comprensión de esta cascada de eventos tan complicada. A la fecha existen escasos reportes de este tipo de complejos. En el 2000 Mirza, O. y cols. reportaron la estructura tridimensional del complejo entre el alérgeno Bet v1, que es la profilina del polen del abedul (*Betula verrucosa*) y un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal murino (BV16) dirigido contra ese alérgeno. En dicho estudio se seleccionó al anticuerpo BV16 como modelo de interacción, debido a que las IgE humanas específicas para los alérgenos son policlonales y difíciles de obtener. El uso de IgG en lugar de IgE se justifica ya que facilita el proceso de cristalización para los estudios por difracción de rayos X, debido a que se requieren cantidades apreciables de las proteínas, así como un alto grado de homogeneidad [8].

En la Figura 2 se muestra un diagrama de listón del complejo Bet v1-BV16, donde el alérgeno se muestra en la parte superior en color amarillo-rojo y el Fab en color lila-azul (hojas beta y hélices, respectivamente). Cabe mencionar que este complejo anticuerpo-alérgeno es el único reportado a la fecha en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Las conclusiones principales de dicho trabajo son que las interacciones observadas para este complejo son similares a las descritas para otros complejos antígeno-anticuerpo. Para este tipo de interacciones se ha establecido que entre 15 a 22 residuos de aminoácidos son los que están involucrados. De éstos, sólo de 3 a 5 residuos (hot spots, puntos clave) del alérgeno contribuyen a la energía de unión a través de interacciones de tipo electrostático, de van der Waals e hidrofóbicas, las cuales generan constantes de asociación con valores que fluctúan entre 10^5 y 10^8 M^{-1} . El epítomo tiene dimensiones que están dentro de los límites observados para otros alérgenos ~ 930 Å^2 (Fig. 3) y está formado por los residuos de aminoácidos que están conservados en las principales proteínas alérgicas de las especies relacionadas de la familia *Fagales*. Lo que es relevante es que aún cuando la existencia de epítomos conformacionales dominantes de unión a IgE es todavía controversial, el concepto está soportado por el hecho de una exposición de las regiones superficiales conservadas entre homólogos estructurales e isoalérgenos.



Figura 2. Estructura cristalográfica del complejo entre el alergeno Bet v 1 del polen del abedul (*Betula verrucosa*) y el anticuerpo monoclonal murino BV16, a 2.9 Å de resolución. La característica estructural principal del alergeno es una hoja antiparalela de siete hebras que rodea a una hélice alfa anfipática de 25 residuos. Todas las regiones hipervariables y de unión al antígeno CDRs del anticuerpo BV16 están involucradas en interacciones con el alergeno, participando en 8 puentes de hidrógeno, excepto L2. Nota: En los dominios variables de las Ig existen 3 regiones que son especialmente variables de unas Ig a otras y se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones de hipervariabilidad de la cadena ligera (L1,L2,L3) y la pesada (H1,H2,H3). Con el plegamiento espacial, las regiones CDR se proyectan hacia el exterior y forman la superficie de interacción con el Ag.

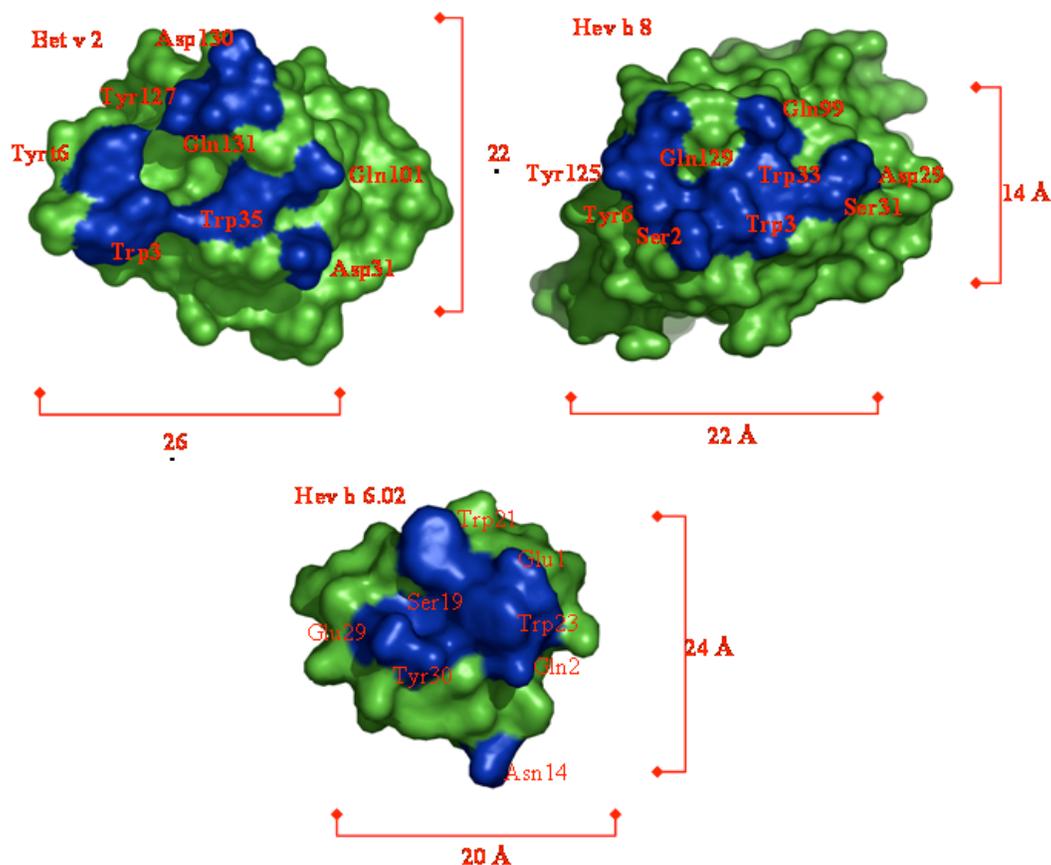


Figura 3 Epitopos conformacionales para tres alergenos cuya estructura está reportada en el PDB (Bet v2, Hev b 6.02 y Hev 8).

Estructura del complejo IgE-receptor

Otra aportación de gran relevancia en este campo ha sido la determinación de la estructura tridimensional del complejo entre el receptor de alta afinidad FC ϵ RI y el dominio Fc (fragmento cristalizante) de una inmunoglobulina IgE, particularmente en el análisis de los dominios interactivos que permitió buscar e identificar moléculas que pudieran competir en dicha interacción. La estructura cristalográfica del complejo a 3.5 Å de resolución reveló un arreglo novedoso entre cada una de las dos cadenas del dímero Fc de la IgE y el FC ϵ RI α . La interacción de un receptor con el Fc-IgE bloquea la unión de un segundo receptor [9] (Fig. 4). Esta estructura permitió esclarecer las interacciones atómicas que regulan la especificidad y la estequiometría del complejo involucrado en la reacción alérgica. Además, en uno de los sitios de interacción se encontró una molécula de detergente (CHAPS), utilizado en el proceso de cristalización, que sirvió de guía para el diseño de inhibidores específicos para el tratamiento de la alergia, la anafilaxia y el asma. Es claro entonces que el estudio de la interacción entre los alergenos, las IgE específicas y el receptor FC ϵ RI es clave en la comprensión de los mecanismos de hipersensibilidad y atopia y puede llevar al desarrollo de nuevos medicamentos que ataquen a las alergias desde su origen. Cabe señalar que prácticamente todos los medicamentos que existen en la actualidad únicamente tratan los síntomas una vez que se ha establecido la respuesta alérgica.



Figura 4. Vista lateral de la estructura cristalográfica del complejo entre el IgE-Fc y el receptor de alta afinidad $Fc\epsilon RI\alpha$. La estructura revela que un receptor (en amarillo y rojo) une a una molécula dimérica del IgE-Fc (lila y azul) de forma asimétrica a través de interacciones en dos sitios. La membrana celular se encontraría abajo del receptor. La interacción de un receptor con el IgE-Fc bloquea la unión con un segundo receptor.

Proteínas alergénicas del látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*)

Una fuente importante de proteínas alergénicas proviene del látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) [10]. Debajo de la corteza, pero exterior al floema de este árbol existe una red de células especializadas, denominadas laticíferas, cuyo citoplasma contiene hule natural (poliisopreno), agua y otros orgánulos citoplasmáticos. La composición del látex se muestra en la Tabla I, en donde se aprecia un bajo contenido proteico (1-2%), el que depende de la clona, el clima, el tipo de suelo y la fertilización. Es importante distinguir el hule natural de los elastómeros sintéticos, como: el hule butílico (derivado de petróleo), los polímeros de 2-clorobutadieno (neopreno®) y copolímeros de butadieno y acrilonitrilo. Los productos de hule sintético no representan un riesgo para personas sensibilizadas a las proteínas de hule natural.

Tabla I. Principales componentes del hule natural y manufacturado (látex de *H. brasiliensis*)

Componentes	Látex natural	Látex manufacturado
	(%)	(%)
Agua	55 - 65	
cis-1,4 poliisopreno	25 - 45	93.5
Proteínas	1 - 2	2 - 3
Lípidos	0.9 - 1.7	3.3
Carbohidratos	1 - 2	0.4

A diferencia de otras alergias mediadas por IgE, las cuales son inducidas por uno o unos cuantos alérgenos, en el hule natural existen cientos de proteínas que pueden variar en su potencial alergénico y algunas de ellas se encuentran presentes en los productos manufacturados con este material [11-13]. La alergia a este tipo de alérgenos se ha convertido en un problema importante de salud para los grupos de riesgo como los médicos, las enfermeras, los odontólogos y los pacientes que han sufrido intervenciones quirúrgicas múltiples. La prevalencia de la sensibilización al látex en la población en general puede alcanzar hasta el 1%; sin embargo, en algunos grupos como los trabajadores de la salud, puede fluctuar entre el 12 y el 18% o bien de un 50% en pacientes pediátricos sometidos a cirugías múltiples.

Cabe señalar que "*alergia al látex*" se define como cualquier reacción al hule natural (*H. brasiliensis*) o a sus productos, mediada por mecanismos inmunológicos que se acompaña de manifestaciones clínicas. Las reacciones inmunológicas a las proteínas (Hev b) del látex pueden ser de hipersensibilidad Tipo I o Tipo IV y reacciones de contacto [14].

Reacciones irritantes de contacto: son las más frecuentes, se desarrollan en periodos cortos (minutos) o largos (horas) después de la exposición a guantes, productos químicos o al látex en su forma natural. Usualmente son benignas, con hiperemia, prurito y ardor en el sitio de contacto

Dermatitis de contacto alérgica o reacción Tipo IV de hipersensibilidad mediada por células: es una reacción de hipersensibilidad retardada como resultado de la generación de linfocitos T sensibilizados a los aditivos del látex.

Reacción de hipersensibilidad Tipo I, mediada por IgE: esta es la reacción más grave y la que produce mayor morbilidad y mortalidad. Durante la exposición inicial se produce la sensibilización del individuo, con la generación de IgE específica contra las proteínas del látex. Estas actúan como antígenos, activan los linfocitos B, CD3, CD4 y Th2 que producen la IgE específica anti-Hev b, la cual se liga a los receptores en la superficie de los mastocitos tisulares y los basófilos circulantes. Cuando se produce una segunda exposición, las proteínas Hev b entrecruzan la IgE ligada en la superficie de las células e inducen la degranulación de los mastocitos y basófilos sensibilizados (Figs. 1 y 3) [15].

La historia de la explotación comercial de hule surgió en 1839, cuando Charles Goodyear descubrió el proceso de vulcanización. El hule vulcanizado es elástico y más resistente que la materia prima, ya que el azufre entrecruza las cadenas poliméricas del isopreno, el cual le da las características únicas de flexibilidad, durabilidad y barrera de protección contra virus y microorganismos. El producto de hule que más frecuentemente se asocia con problemas de sensibilización y alergia es el guante para uso médico, cuya utilización se incrementó en respuesta a las recomendaciones emitidas por el CDC (*Center for Disease Control*, Centro para el Control de las Enfermedades) en 1987 y 1989 [16]. El uso de guantes de látex en otras actividades como la manipulación de alimentos se incrementó también a partir de 1987. Es importante señalar que, a la fecha, se han reportado más de 40,000 productos de consumo general que pueden contener hule natural, lo que ha ocasionado la aparición de otros grupos de riesgo.

Proteínas alergénicas presentes en el hule natural

En el látex del árbol del hule se han identificado cincuenta y seis proteínas alergénicas distintas que son reconocidos por las IgE de las personas alérgicas a este material. De éstas, trece son las principales responsables de la sensibilización de individuos susceptibles y se les ha asignado una nomenclatura oficial por parte del Subcomité de Nomenclatura de Alergenos de la Unión internacional de Sociedades de Inmunología [17]. En la Tabla II se describen algunas características de estos alergenos, entre los que se encuentran proteínas relacionadas con la biosíntesis del poliisopreno, así como de la coagulación y elongación del hule. También están presentes varias proteínas relacionadas con la patogénesis (RP), como la β 1,3-glucanasa y la quitinasa, además de proteínas estructurales como la profilina y el complejo de microhélice, y proteínas pequeñas como la proheveína y la patatina. Más recientemente se han clasificado a una proteína de transferencia de lípidos y una esterasa. Además para algunas de estas proteínas se han reportado una o varias isoformas [18].

Entre los alergenos más relevantes se encuentran el Hev b 1 (factor de elongación del hule), Hev b 2 (glucanasa), Hev b 4 (homólogo de la lecitinasa), Hev b 5 (proteína ácida) y Hev b 6 (proheveína), la cual se rompe naturalmente en dos cadenas polipeptídicas, el dominio C-terminal (Hev b 6.03) y la heveína (Hev b 6.02). Este último es una lectina de 43 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 4.7 kDa, que pertenece al grupo de las proteínas relacionadas con la patogénesis y cuya estructura tridimensional hemos reportado a alta resolución (1.5 Å) (19). En negritas se muestran algunas proteínas estudiadas por nuestro grupo de trabajo.

Tabla II. Principales alérgenos del látex de *H. brasiliensis* clasificados de acuerdo a la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología

Alergeno	Masa (kDa)	Nombre de la proteína o función biológica	Capacidad como alérgeno	Reacción cruzada
Hev b 1	14.6	Factor de elongación del hule	Alta (EB)	No observada
Hev b 2	34-36	β-1,3-glucanasa	Media	Media
Hev b 3	24-27	Proteína asociada al hule	Alta (EB)	No observada
Hev b 4	50-57	β -glucosidasa	No determinada	No observada
Hev b 5	16-24	Proteína estructural	Alta	No observada
Hev b 6.01	20	Proheveína	Alta	Alta (Plátano, Kiwi y Aguacate)
Hev b 6.02	4.7	Heveína	Alta	Alta (Plátano, Kiwi y Aguacate)
Hev b 6.03	14	Dominio C de proheveína	Alta	Alta
Hev b 7.01	42	Esterasa del Suero B	Baja-Media	No determinada
Hev b 7.02	44	Esterasa del Suero C	Media (EB)	No determinada
Hev b 8	14	Profilina	Baja	Media
Hev b 9	51	Enolasa	Baja	Media
Hev b 10	26	Mn-superoxido dismutasa	Baja	Media
Hev b 11	32	Quitinasa de Clase I	Baja	Alta (alérgenos de frutas y dominios tipo heveína)
Hev b 12	9	Transporte de lípidos	Baja	Reacción cruzada con frutas
Hev b 13		Esterasa	Alta	No determinada

Hev b 6.02 es uno de los alérgenos de *H. brasiliensis* que más se ha estudiado en los últimos años, en relación a la identificación de epítomos conformacionales (IgE). Recientemente, Karisola, P. y col. [20,21] describieron dos sitios de reconocimiento a IgE utilizando quimeras y algunas mutantes de Hev b 6.02, así como estudios moleculares *in silico*. Con base a sus resultados, este grupo sugiere que las regiones N-terminal y C-terminal (Arg⁵, Lys¹⁰, Glu²⁹, Tyr³⁰, His³⁵ y Gln³⁸) son las que esencialmente determinan la unión a IgE. Sin embargo, en estos reportes no se demuestra que el plegamiento de las proteínas mutadas haya sido el adecuado. Estos resultados discrepan con reportes previos, que de manera independiente mostraron la presencia de los dos triptofanos presentes en el alérgeno (Trp²¹ y Trp²³) en los epítomos lineales [22,23].

Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha propuesto a residuos críticos tales como Trp²¹, Trp²³, Glu²⁹ y Asn¹⁴ como un epítomo conformacional dominante, utilizando modificación química de los triptofanos y estudios cristalográficos e inmunológicos de este alérgeno y de una de sus isoformas (Hev b 6.0202) (Figs. 5 y 6). Además, un análisis de las secuencias de sesenta proteínas alérgicas o potencialmente alérgicas que presentan dominios tipo heveína [19] corroboró la relevancia de los residuos críticos mencionados. Esto sugiere su participación en epítomos superficiales discontinuos en la superficie de alérgenos tales como Hev b 6.02, algunas de sus isoformas, así como en Hev b 11. Es importante señalar también que dichos residuos forman parte del sitio de unión a oligosacáridos de N-acetilglucosamina.

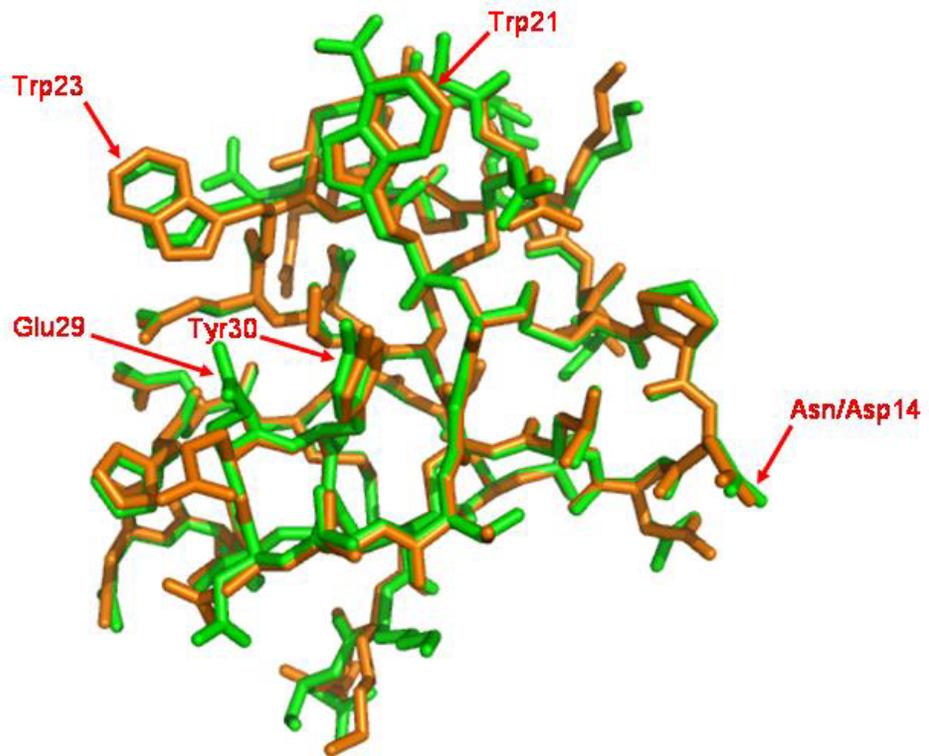


Figura 5. Superposición de las estructuras cristalográficas del Hev b 6.02 (verde) y una de sus isoformas (Hev b 6.0202) (naranja), resueltas a 1.5 y 1.7 Å de resolución, respectivamente (r.m.s. 0.2). Los residuos aromáticos Trp²¹, Trp²³, Tyr³⁰, así como Asn¹⁴ y Glu²⁹ están formando parte de un epítipo conformacional dominante.

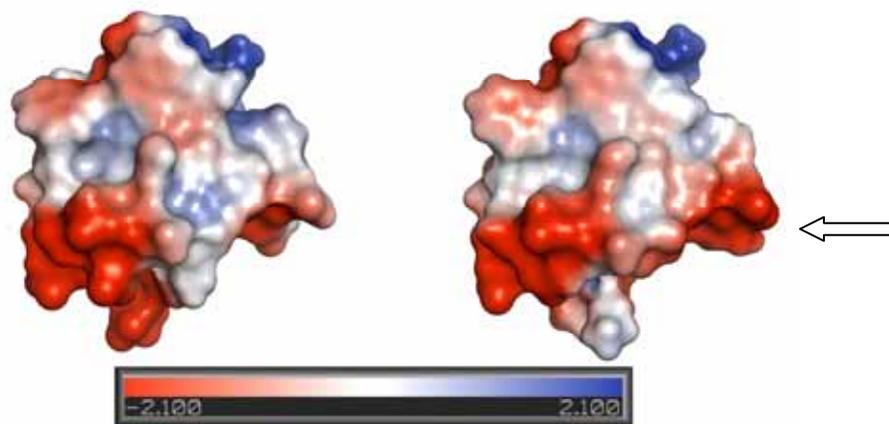


Figura 6. Comparación de los potenciales electrostáticos del Hev b 6.02 (izquierda) y su isoforma (derecha). En rojo se muestra el potencial negativo y en azul el positivo. En el extremo derecho de la isoforma (flecha) se aprecia una región más negativa (Asp¹⁴ en la isoforma y Asn en el Hev b 6.02) [24].

Además, para los estudios inmunológicos de la interacción entre Hev b 6.02 e IgE se han preparado anticuerpos monoclonales murinos (6D6 y 6E7), así como fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de origen humano, utilizando un sistema de despliegue de fagos. Asimismo, se han obtenidos IgE's de pacientes pediátricos y adultos alérgicos a las proteínas del hule. Los estudios de inhibición entre los anticuerpos modelo producidos *in vitro* y las IgE's de sueros de pacientes revelaron que compiten entre ellos al interactuar con Hev b 6.02, obteniéndose hasta un 50% de inhibición con el anticuerpo murino Ab 6D6. Al analizar la interacción anticuerpo 6E7-Hev b 6.02, se encontró que los residuos Trp²¹ y Trp²³ son críticos en el reconocimiento por IgE de sueros de pacientes, ya que al modificarlos químicamente la interacción se inhibió en un 80%. Finalmente, mediante estudios *in silico* de la asociación entre scFv8 y Hev b 6.02, se observó que los CDR's del dominio variable del fragmento de unión al antígeno, presentes en una ranura, interactúan con residuos polares tales como la Arg⁵, la Lys¹⁰ y el Asn¹⁴. Estos resultados permiten especular que los scFv reconocen un epítipo conformacional en Hev b 6.02 diferente al que reconocen los anticuerpos murinos y las IgE de sueros de pacientes.

Reactividad cruzada

Aproximadamente del 30 al 50% de los individuos que son alérgicos al hule natural muestran una hipersensibilidad asociada con algunas frutas, conocida como el síndrome de alergia al látex-frutas [25,26]. Cabe mencionar que Hev b 6.02 está presente como un dominio estructural en varias proteínas de plantas tales como las quitinasas de clase I y algunas lectinas multidominio [27], por lo que ha sido asociado con la reactividad cruzada con alimentos. Asimismo, se han demostrado reacciones cruzadas entre proteínas del látex de árboles como *Ficus benjamina*, *Ficus carica* y *Ficus elastica*, [28]. Igualmente, se han encontrado epítipos comunes en alergenitos de frutas como el kiwi, el aguacate, la papaya, las castañas y con algunos aeroalergenitos de los polen [29].

En un intento por tratar de encontrar homologías estructurales entre los alergenitos que presentan reactividad cruzada con el látex, se realizó una búsqueda en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) de las proteínas alérgicas cuya estructura tridimensional estuviera reportada y de los cuales se conocieran sus epítipos lineales. Al analizar los resultados se observó la presencia de parches específicos en la superficie, que consisten de una inusual proporción de residuos aromáticos cercanos entre sí y expuestos al disolvente, en concordancia con lo observado para el Hev b 6.02. En la Figura 3 se muestra una comparación de las superficies de los alergenitos Bet v2 (profilina del polen del abedul *Betula verrucosa*), el Hev b b 6.02 y el Hev b 8 (profilina del hule). En Bet v2 y Hev b 6.02, varios residuos aromáticos y polares presentes en los epítipos lineales, se encuentran cercanos en la superficie. Es importante mencionar que, en este tipo de moléculas, dichos residuos también forman parte del sitio de unión a los carbohidratos o la actina, los cuales pudieran conformar un epítipo discontinuo. Cabe señalar que cinco proteínas del hule natural (Hev b 2, Hev b 6.02, Hev b 7, Hev b 8 y Hev b 11) y varias quitinasas de clase I derivadas de plantas han sido asociados con el síndrome de látex-frutas-polen. La reactividad cruzada parece deberse a los anticuerpos IgE que reconocen epítipos similares que representan estructuras conservadas en proteínas filogenéticamente relacionadas. Los parches que han sido identificados pueden representar patrones moleculares reconocibles por los receptores de las células del sistema inmune.

Estos resultados concuerdan con reportes recientes que indican que el sistema inmune pudo haber evolucionado para detectar regiones hidrofóbicas de proteínas inmunogénicas, las cuales consisten principalmente de parches ricos en residuos aromáticos, más que de la secuencia de aminoácidos. Estos residuos normalmente se encuentran ocultos, pero pueden exponerse por la pérdida de un ligando específico que esté integrado a su estructura tridimensional [30]; sin embargo, también pueden encontrarse expuestos al disolvente [19].

Perspectivas

Los descubrimientos recientes acerca de la estructura molecular de los alérgenos, los complejos alérgeno-anticuerpo –generalmente el Fab- y anticuerpo IgE-Fc-receptor, proporcionan imágenes tridimensionales de cómo y donde interaccionan estas moléculas. A pesar de la gran cantidad de estudios reportados a nivel inmunológico y bioquímico y los escasos a nivel fisicoquímico y estructural, no se tiene una idea clara del por qué algunas proteínas son alérgicas o cuales son las características fisicoquímicas de los epítopos conformacionales reconocidos por las IgE's. Esto contrasta con el conocimiento actual sobre el mecanismo por el cual se inicia y se desarrolla una respuesta inflamatoria de tipo alérgica. Esto es, se conoce como se lleva a cabo la activación de los mastocitos y se sabe cuales son los principales mediadores liberados y su acción en el organismo; también se conoce, en gran medida, el mecanismo de señalización a partir de la unión del alérgeno al complejo IgE-Fc ϵ RI, e incluso se han logrado avances importantes en el estudio de cómo reconocen las células presentadoras de antígenos a los alérgenos, mediante un receptor Fc ϵ R2, que parece promueve la proliferación de TH2. Es evidente que a pesar de todos estos avances aun falta mucho para poder conocer a todos los protagonistas de esta cascada de eventos tan importante.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la Dra. Socorro Orozco, del Instituto Nacional de Pediatría, para llevar a cabo los protocolos de alergia con pacientes pediátricos y adultos de alto riesgo y el apoyo económico a la DGAPA-UNAM (Proyecto IN209506).

Referencias

1. Ring, J., Kramer, U., Schafer, T. y Behrendt, H. . (2001) Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol*, **13**: 701-708.
2. Garman, S.C; Wurzburg, B. A; Tarchevskaya, S.S; Kinet, J.P. y Jardetzky, T.S.. (2000) Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc ϵ RI α . (2000) *Nature* **406**: 259-266.
3. Shakib, F; y Furmonaviciene, R. (2000) The significance of enzymatic and other biological activities of proteins in relation to their capacity to serve as allergens. *Clin. Exp. Allergy* **30**: 1056-1057.
4. Breiteneder, H. y Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant derived food allergens. *J. Allergy Clin Immunol.* **117**: 215-219
5. Aalberse C.R. Structural biology of allergens (2000) *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 228-238.
6. Ovidiu, I; Catherine, H; Schein; y Werner, B. (2003) SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**: 359–362.
7. Gajhede, M; Osmark, P; Poulsen, F.M; Ipsen, H; Larsen, J.N; Joost van Neerven, R.J; .Schou, C; Lowenstein, H. y Spangfort MD. (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 1040-1045.
8. Mirza, O; Henriksen, A; Ipsen, H; Larsen, J.N; Wissenbach, M; Spangfort, M.D. y Gajhede, M. (2000) Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol***165**: 331-8.
9. Garman, S.C; Wurzburg, B.A; Tarchevskaya, S.S; Kinet, J.P. y Jardetzky TS. (2000) Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc ϵ RI. *Nature* **406**: 259-66.
10. Yeang, H.Y., Arija, M.S; Faridah, Y. A. y Sunderasan, E. (2002) Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* **27**: 32-45.
11. Fuchs T. (1994) Latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **93**: 951-952.
12. Baur, X; Chen, Z; Raulf-Heimsoth, M. y Degens, P. . (1997) Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy* **52**: 661-664.
13. Alenius H., Turjanmaa K. y Palosuo T. (2002) Natural rubber latex allergy. *Occup. Environ. Med.* **59**: 419-424.
14. Rajan, T.V. (2003) The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol* **7**:376-379

15. Sánchez A. (2001) Alergia al látex. Diagnóstico y aspectos terapéuticos. *Allergol. et Immunopathol* **29**: 212-221.
16. Centers for Disease Control and Prevention. (1989) Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public safety workers. *MMWR* **38**: 1-37.
17. Breiteneder, H. y Scheiner, O (1998). Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**:83-92).
18. Sowka, S., Hafner, C., Radauer, C., Focke, M., Brehler, R., Astwood, J.D., Arif, S.A., Kanani, A., Sussman, G.L., Scheiner, O., Beezhold, D.H. y Breiteneder, H. (1999) Molecular and immunologic characterization of new isoforms of the *Hevea brasiliensis* latex allergen Hev b 7: evidence of no cross-reactivity between Hev b 7 isoforms and potato patatin and proteins from avocado and banana. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**: 1302-1310.
19. Reyes-López, C.A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A. y Rodríguez-Romero, A. (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 123-130.
20. Karisola, P., Alenius, H., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Helin, J., Pentikainen, O.T., Repo, S., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M.S., Palosuo, T. and Kulomaa, M.S.J. (2002) The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy. *J. Biol. Chem.* **277**: 22656-22661.
21. Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Airene, K.J., Laitinen, O.H., Repo, S., Pentikainen, O.T., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M.S., Palosuo, T., Kulomaa, M.S. y Alenius, H. (2004) Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *J. Immunol.* **172**: 2621-2628.
22. Beezhold, D.H., Kostyal, D.A. y Sussman, G.L. (1997) IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen. *Clin. Exp. Immunol.* **108**: 114-121.
23. Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K.J., Fink, J.N., Sussman, G.L. y Kurup, V.P. (1997) IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *J. Immunol.* **159**: 5724-5732.
24. Reyes-López, C. A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Santoyo, A. y Rodríguez-Romero, A. (2006) A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Letters* **580**: 2483-2487.
25. Blanco, C; Diaz-Perales, A; Collado, C, Sánchez-Monge, R; Aragoncillo, C, Castillo, R; Ortega, N; Alvarez, M; Carrillo, T. y Salcedo G. (1999) Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* **103**: 507-513.
26. Lavaud, F; Prevost, A; Cossart, C; Guerin, L; Bernard, J. y Kochman, S. (1995) Allergy to latex, avocado pear, and banana: Evidence for 30 kDa antigen in immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol*; **95**: 557-564.
27. Collinge, D.B; Kragh, K.M; Mikkelsen, J.D; Nielsen, K.K; Rasmussen, U. y Vad, K. (1993) Plant chitinases. *Plant J*; **3**:31-40.
28. Chen, Z., Duser, M., Flagge, A., Maryska, S., Sander, I., Raulf-Heimsoth, M. (2000) Identification and characterization of cross-reactive natural rubber latex and *Ficus benjamina* allergens. *Int Arch of Allergy and Immunol.* **123**:291-298.
29. Ferreira, M. y Carlos A. G. (1999) Latex: a complex allergy. *Allerg. Immunol* **31**: 18-21.
30. Seong, S.Y. y Matzinger, P. (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 469-478.

ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES DE ALERGENOS DE HULE Y DE SU INTERACCIÓN CON ANTICUERPOS

Resumen

*Las alergias mediadas por inmunoglobulinas de tipo E (IgE) son consideradas un problema de salud pública importante en el mundo industrializado, debido a la capacidad que poseen algunas proteínas, normalmente inocuas (alergenos), para inducir reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados. Diferentes grupos de investigación están enfocando sus esfuerzos en realizar estudios inmunológicos y moleculares de alergenoproteicos que permitan esclarecer las bases del potencial alergénico y de la reactividad cruzada, las cuales pudieran estar relacionadas con las características fisicoquímicas y estructurales de los mismos. La alergia al látex del árbol de *Hevea brasiliensis* ha sido muy estudiada en las últimas décadas y, por lo tanto, se han realizado numerosos intentos para explicar el incremento en la incidencia de esta enfermedad. Recientemente se han logrado avances muy importantes en la expresión, purificación y caracterización molecular de varios alergenoproteicos del hule natural; no obstante, la información estructural es aún muy limitada. La reactividad cruzada puede predecirse mediante análisis comparativos de la estructura primaria; sin embargo, la capacidad para inducir IgE está determinada por otro tipo de factores. El conocimiento de la estructura tridimensional, utilizando técnicas experimentales, facilita la identificación e incrementa la posibilidad de modificar epítopos conformacionales, que podrán ser herramientas poderosas en el diagnóstico de la alergia al hule natural, así como agentes potenciales para inmunoterapias.*

Palabras clave: Alergenos de plantas, interacción con anticuerpos, estructura de rayos-X.

Semblanza de la Dra. Adela Rodríguez Romero.



Es Ingeniera Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y maestra y doctora en Ciencias Químicas (cristalografía de proteínas) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Recibió el premio Iberoamericano de Cristalografía en 1989 y el premio a la Mejor Tesis Doctoral, otorgado por la Facultad de Química y el Instituto de Química de la UNAM, en 1992. Realizó una estancia de un año como investigadora invitada en el Center for Advanced Research in Biotechnology que pertenece al National Institute of Standards and Technology; y estancias con duración menor a seis meses en el mismo centro y en la Universidad Estatal de Nueva York, EU. Ingresó como Investigadora Asociada al Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM en 1984. Actualmente se desempeña como Investigadora Titular "C" de Tiempo Completo y sus campos de especialidad abarcan diversos aspectos de la bioquímica estructural y la fisicoquímica de proteínas. Sus investigaciones sobre aspectos estructurales de alergenoproteicos y enzimas son pioneros en nuestro país. Recientemente fue promovida al Nivel III en el SNI y a nivel D en el PRIDE: Ha dirigido 11 tesis de licenciaturas, dos de maestría y tres de doctorado, y actualmente dirige otras 3 de posgrado. Asimismo, imparte cursos en varios posgrados de la UNAM.

En lo referente a su producción científica, ha publicado 51 trabajos de investigación publicados en revistas con arbitraje internacional, incluidas en el "Science Citation Index"; cuatro artículos en

revistas de divulgación y cuatro capítulos en libros. También, ha impartido varias conferencias en eventos nacionales e internacionales y ha colaborado en la organización de dos cursos-taller internacionales. Su obra cuenta con más de 400 citas. La Dra. Rodríguez-Romero ha ocupado diversos cargos en el Instituto, entre los que destacan los de Secretaria Académica (2000-2002), Jefa del Departamento de Bioquímica (2003-a la fecha), y ha sido Responsable del Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas desde 1998 a la fecha. Además fue responsable del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, en el Instituto de Química, desde su adecuación en 1997 hasta el 2002 y fue la Coordinadora de la Sección de Química de la Academia Mexicana de Ciencias por el periodo 2004-2006.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

VIDA Y OBRA DEL MONÓMERO Y EL DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA MITOCONDRIAL Y DE SUS SUCURSALES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

José J. García Trejo

Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de cardiología

Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, 14080, Tlalpan, México, D. F.

jigarcia_trejo@yahoo.com

Abstract

The F_1F_0 -ATP synthase is the most efficient molecular motor designed by nature to synthesize ATP from ADP and Pi. In mitochondria, its functioning is controlled by a regulatory subunit (IF_1) that hinders rotation of the central stalk of the enzyme and the catalytic conformational changes of the β subunits when the proton gradient decreases as it does during ischaemia. Besides this major role, the F_1F_0 complex contributes to give shape to the mitochondrial inner cristae by dimerizing and polymerizing and therefore increasing the membrane surface that is available to carry out the oxidative phosphorylation. The dimerization of the enzyme is induced by F_0 subunits such as e and g. On the other hand, IF_1 and probably other F_1 or second stalk subunits contribute to stabilize the ATP synthase dimer by connecting the F_1 portions. This stability is the target of the most severe mutations that produce mitochondrial myopathies that map on the ATP6 gene of the F_0 subunit 6. The ATP6 mutations decrease the stability of the monomer and the dimer of the enzyme and hinder the proton flow through the F_0 channel; this produces mitochondrial hyperpolarization and chronic mitochondrial oxidative damage, thus explaining the severity of these mutations for the human physiology. This knowledge opens a new trend to assay novel gene therapy strategies for the treatment of these illnesses at the molecular level. Finally, some of the subunits of the enzyme are exported to the surface of various cell types and work as receptors to different ligands that regulate angiogenesis and cholesterol homeostasis, among other processes. Some subunits such as IF_1 and β localize at the cell surface but not forming a stoichiometric complex as that found in mitochondria. It remains to be resolved which other subunits of F_1 and F_0 are found in the plasma membrane of several cell types, and how is the biogenesis that bring these F_1 subunits to the plasma

membrane, as well as the signal transduction mechanisms by which the ATP synthase subunits work at the cell surface.

Keywords: F₁F₀-ATP synthase, dimer, inhibitor IF₁, crestas, ATP6, plasma membrane.

Introducción

La F₁F₀-ATP sintasa como el motor molecular más eficiente de la naturaleza

La F₁F₀-ATP sintasa es una de las enzimas más estudiadas debido a las siguientes razones: 1) Es una enzima ubicua presente en las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos que provee aproximadamente el 90% del ATP necesario para la mayoría de las funciones vitales de las células y 2) Es el motor molecular más pequeño de la naturaleza que funciona con un mecanismo rotacional cuya eficiencia de acoplamiento energético es cercano al 100%. Este acoplamiento ocurre entre su parte catalítica extra-membranal o F₁, donde se encuentran los tres sitios catalíticos que se alternan para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi), y el canal de protones o F₀ que se encarga de transportar protones a través de la membrana. Estas dos razones han hecho de este factor de acoplamiento, un modelo experimental fascinante y clave en el desarrollo de la investigación bioquímica y molecular que ha llevado a grandes hallazgos. La importancia biológica de la enzima se hace evidente por ejemplo, al saber que el ser humano necesita sintetizar diariamente el equivalente a su propio peso en forma de moléculas de ATP para poder sostener todas sus funciones vitales. Esto se ha verificado por ejemplo, en pacientes que contienen mutaciones en un gen mitocondrial que codifica para una de las subunidades de la porción F₀ (el canal de protones) de esta enzima. En las células de estos pacientes, una reducción de aproximadamente 50% en la velocidad de la actividad de la F₁F₀-ATP sintasa debida a estas mutaciones, conlleva al desarrollo de síndromes metabólicos mortales en los primeros años de vida (tal es el caso del síndrome de Leigh, ver más adelante). Esto implica que el umbral de actividad de la enzima debajo del cual la vida humana es insostenible es aproximadamente el 50% de la velocidad normal de síntesis de ATP. En muchos otros organismos, tanto eucariontes como procariontes, aunque este umbral puede ser diferente, se ha demostrado que al eliminar por completo la actividad de la enzima por mutaciones llamadas knock-out, donde se bloquea la expresión de uno o varios de los genes de la enzima, la viabilidad se pierde por completo. Es decir, la enzima es completamente esencial para la vida desde sus formas más simples como en los organismos bacterianos, como en los seres fotosintéticos incluyendo a las bacterias fotosintéticas, las algas y las plantas, hasta los organismos mitocondriados desde los más simples como las levaduras, hasta los más complejos como los mamíferos, incluyendo a la especie humana.

Para realizar de manera eficiente la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, dado que ésta es una reacción termodinámicamente desfavorable o endergónica, la ATP sintasa de todos los organismos ha adquirido rasgos estructurales únicos que permiten aprovechar la energía electroquímica de los gradientes transmembranales de protones en las bacterias, los cloroplastos y las mitocondrias para impulsar la síntesis del ATP. Esto involucra por supuesto al canal de protones F₀ (el cual transporta iones sodio en lugar de protones en algunas bacterias halofílicas), que funciona como una leva de protones pues cuando éstos atraviesan la membrana a través del canal F₀, hacen girar a un barril formado por 10-12 copias de una subunidad protonable (denominada subunidad c en las bacterias, III en los cloroplastos y 9 en las mitocondrias). Este barril de 10-12 subunidades protonables está unido a un cuello central giratorio que induce los cambios conformacionales alternantes de los sitios catalíticos en la porción F₁ que impulsan la liberación del ATP recién sintetizado de la enzima (Fig. 1). Resumir este mecanismo es ahora sencillo, pero todo este conocimiento se debe a más de 40 años de estudios en muchos laboratorios alrededor del mundo. Uno de los pioneros en el campo fue el grupo de Efraim Racker, quien fue el primero en demostrar que la parte F₁ se puede separar físicamente del canal F₀ en partículas submitocondriales que perdían su capacidad fosforilante.

La F_1 soluble así aislada conservó la actividad de F_1 -ATPasa, y al reconstituirla en membranas invertidas se recuperó la fosforilación oxidativa. Posteriormente, una serie de grupos encontró que la F_1 contiene 3 sitios catalíticos y tres regulatorios que unen nucleótidos, y que la cinética de la catálisis muestra cooperatividad cinética positiva, pero cooperatividad negativa en la unión de los nucleótidos. Este mecanismo cinético tan complejo llevado a cabo por tres sitios catalíticos, tardó varios años en comprenderse. Fue hasta que el ahora premio Nobel Paul D. Boyer demostró, por medio de experimentos cinéticos de recambio isotópico de los intermediarios de la catálisis de la enzima, que los tres sitios catalíticos tenían que alternarse en tres conformeros de diferentes afinidades por los sustratos y los productos para explicar todos los hallazgos cinéticos que se habían descrito con la F_1 -ATPasa.

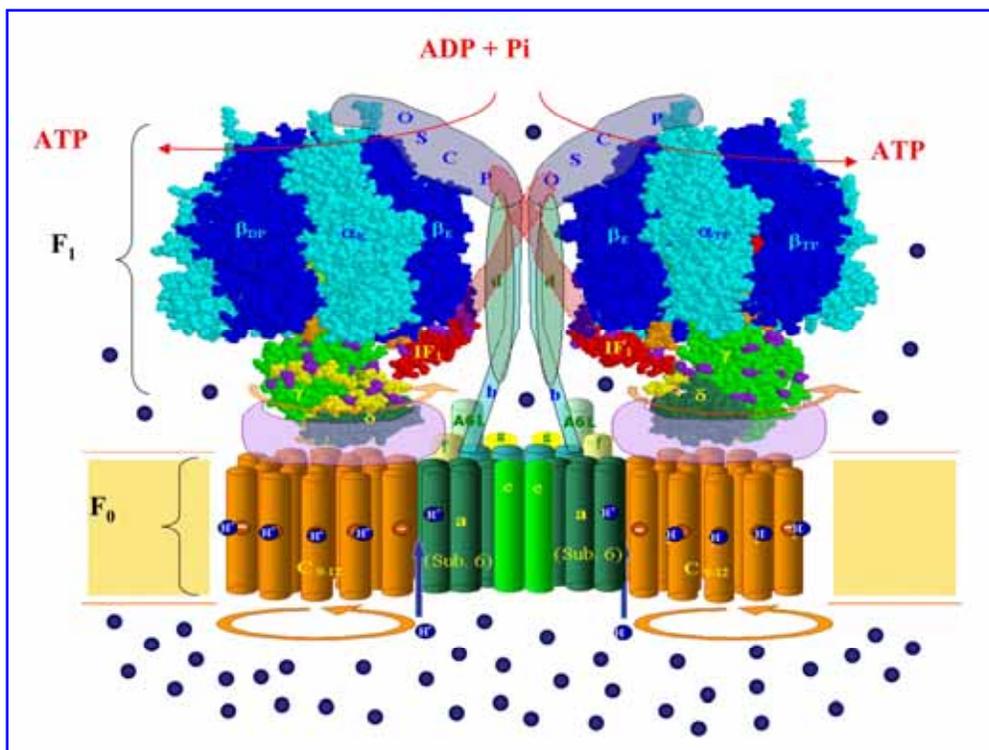


Figura 1. Mecanismo rotacional de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino en un modelo del dímero de la enzima. Los protones se transportan de acuerdo a su gradiente electroquímico por la interfase a/c_{10-12} y hacen girar al rotor (c_{10-12}) en el sentido indicado para impulsar la liberación del ATP sintetizado de los tres sitios catalíticos que se van alternando en la catálisis conforme gira el cuello central. Un cuello lateral ($a/b/d/OSCP$) funciona como estator y ancla al hexámero $\alpha_3\beta_3$ a la membrana, así el rotor puede girar e inducir la alternancia de los sitios catalíticos. La proteína inhibidora (IF_1) se une entre el rotor y el estator por su extremo N-terminal e impide la rotación y los cambios conformacionales catalíticos, es posible que su extremo C-terminal forme un puente entre las partes F_1 catalíticas como se indica en la interfase del dímero. Otras subunidades de las partes F_0 como e y g forman la interfase de dimerización que confiere mayor estabilidad al dímero. Ver texto para más detalles.

Asimismo, Boyer [1] propuso que la manera más sencilla de explicar tal alternancia era suponer que había una rotación de las subunidades no catalíticas, es decir las subunidades

unicopia γ , δ y/o ε , respecto a las tres copias de heterodímeros α/β que comprenden la parte simétrica de la porción F_1 (ver Fig. 1). Esta rotación produciría cambios conformacionales alternantes en los tres sitios catalíticos de acuerdo al sentido del giro de una o varias de estas subunidades que confieren asimetría a la porción F_1 . Boyer mismo, encontró que una de las maneras de comprobar esto sería entrecruzar covalentemente a las subunidades entre sí, y aquellos entrecruzamientos que inhibieran la actividad de la enzima de manera proporcional al rendimiento del entrecruzado, serían muy probablemente aquellos que impidan el movimiento giratorio de una subunidad respecto a la otra. Esta aproximación inicial efectivamente corroboró que al entrecruzar a las subunidades de la F_1 -ATPasa de *Escherichia coli*, con ditiobis-succinimidil propionato o DSP, la actividad de ATPasa disminuyó, pero se formaron varios entrecruzamientos entre las subunidades α/β , δ y ε , de tal manera que no se logró discernir cuáles de estos entrecruzados eran los responsables de inhibir la actividad de F_1 -ATPasa. Este trabajo sentó un precedente con el cual posteriormente se formaron entrecruzamientos diseñados por ingeniería de proteínas y biología molecular para formar puentes disulfuro únicos y específicos entre dos subunidades tanto de la F_1 -ATPasa como a lo largo de todo el complejo F_1F_0 . La hipótesis detrás de estos experimentos era que la rotación intrínseca, y por lo tanto la actividad de ATPasa de la enzima se bloquearían con aquellos puentes que conectaran covalentemente a dos subunidades que rotaran o cambiaran de posición una respecto a la otra durante la catálisis, y que estos efectos serían reversibles en condiciones reductoras. En varios laboratorios, y principalmente en el de Roderick A. Capaldi, se demostró que cuando se generaban puentes disulfuro entre las subunidades $\gamma\varepsilon$, o c con las subunidades α o β de la F_1 , se bloqueaba la actividad de F_1 -ATPasa o F_1F_0 -ATPasa, mientras que cuando se generaban puentes disulfuro entre α o β con δ , o α con b, o entre las mismas subunidades $\gamma\varepsilon$ y c, no se bloqueaba la actividad. Esto implicó que las subunidades centrales ($\gamma\varepsilon$ y c) se mueven simultáneamente como un rotor en el cuello central de la enzima, respecto a las subunidades α/β de la porción F_1 y que éstas forman otro complejo estático (o estator) con las subunidades δ (OSCP), b y a; esta última subunidad ancla a la enzima en la membrana y conecta las porciones F_0 y F_1 por medio de un segundo cuello periférico formado por las subunidades b y δ (OSCP) (Fig. 1). Por lo tanto, con estos datos se predijo que además del cuello central que años atrás se había observado por microscopía electrónica conectando la porción F_1 con F_0 , debía existir otro cuello lateral formando parte del estator de la enzima. La función de este cuello lateral es la de sostener al hexámero α/β para que el rotor pueda girar respecto al estator y de esta manera inducir los cambios conformacionales alternados de los sitios catalíticos sin que estos últimos se arrastren con la inercia del giro del rotor. La evidencia estructural que demostró la presencia de este segundo cuello provino de experimentos de microscopía electrónica de alta resolución que pudieron resolver la presencia de este segundo cuello lateral que conecta a la porción F_1 por medio de la subunidad δ de *E. coli* o también llamada OSCP en la enzima de bovino. Una de las evidencias más poderosas a favor del mecanismo rotacional de la enzima provino del análisis de difracción de rayos X de la estructura de la F_1 -ATPasa. Varios estudios previos habían demostrado que la F_1 contiene a sus subunidades α/β anternándose entre sí como una naranja de 6 gajos [2] y que en medio de esta estructura se colocaban las subunidades pequeñas de la enzima de *E. coli* (γ y ε). Finalmente, la resolución de 2.4 Å de la enzima de corazón de bovino por el grupo de John E. Walker resolvió inicialmente parte de la estructura de la subunidad γ la cual se extendía como un eje central entre el hexámero α/β y recientemente la estructura de la enzima con su proteína inhibidora asociada [3] (Fig. 1). Esto no sólo apoyó la hipótesis rotacional del mecanismo de la enzima, sino que además dio mucha información estructural para el diseño de mutantes y de puentes disulfuro en las enzimas bacterianas cuyas estructuras se resolvieron posteriormente de manera similar, encontrándose la misma geometría de rotor/estator en la F_1 -ATPasa. La combinación del diseño de puentes disulfuro inhibitorios, junto con el marcaje específico de cisteínas introducidas en la subunidad γ con sondas fluorescentes, así como el recambio de diferentes subunidades β entre los puentes disulfuro β - γ de manera inducida por la hidrólisis de ATP, demostraron que efectivamente la subunidad γ gira respecto a las subunidades α/β de la porción F_1 (Revisado en [4]). Sin embargo, la evidencia más contundente del mecanismo rotacional provino de la observación directa de esta rotación por

medio del marcaje de la subunidad γ con un filamento fluorescente de actina susceptible de observarse en un microscopio de fluorescencia de alta resolución que permite observar a moléculas individuales. Este fascinante experimento se realizó inicialmente con la F_1 -ATPasa de la bacteria termofílica PS3 la cual se inmovilizó por medio de extensiones de histidinas en los extremos N-terminales de las subunidades α o β . Esto permitió que la F_1 quedara inmovilizada “de cabeza”, y con un filamento fluorescente de actina unido a una cisteína introducida en la subunidad γ . El resultado fue espectacular: se observó un giro inducido por Mg-ATP que ocurre siempre en el sentido opuesto a las manecillas del reloj, y que se detuvo al consumirse el ATP o al bloquear a la enzima con inhibidores específicos de la F_1 [5]. Después de estos experimentos pioneros, han surgido muchos otros que han completado el cuadro y que demuestran que las subunidades que giran son las del cuello central (γ , ϵ y c en la enzima bacteriana), y que las subunidades del cuello lateral (b y δ en las bacterias) conectan a la porción F_1 con la F_0 por el cuello lateral estático. No sólo eso, sino que se ha demostrado que el giro del rotor lo impulsa la unión de los nucleótidos a los sitios catalíticos, y no así la ruptura del enlace fosfo-diéster del fostato γ del ATP [6]. Además, este giro ocurre en etapas de 120° las cuales a su vez se subdividen en dos movimientos angulares de 90° y 30° asociados a la unión del nucleótido y a la liberación del P_i respectivamente, durante la actividad de ATPasa [4, 5]. Por otro lado, también se ha demostrado que este mecanismo rotacional funciona con una eficiencia cercana al 100%, pues casi toda la energía proveniente de la unión de los nucleótidos se transforma en energía mecánica que impulsa a la rotación del cuello central de la enzima. Durante la rotación en el sentido opuesto (de acuerdo a las manecillas del reloj visto desde F_0 hacia F_1) la enzima es capaz de sintetizar ATP impulsada por el flujo de los protones por la F_0 y por la energía de unión del ADP y del P_i [4]. En este sentido, es clave el movimiento rotacional del anillo de subunidades c , el cual forma una interfase con la subunidad a por la cual se transportan los protones. Aunque todavía falta por resolver el mecanismo detallado de translocación de protones por F_0 , el modelo más aproximado es como sigue. Cada protón entra por un hemi-canal de la subunidad a que protona a un carboxilo esencial de una subunidad c (R^+ , Fig. 1). Este residuo protonado realiza un giro de casi 360° conforme el flujo de protones impulsa al anillo de subunidades c , hasta salir por otro hemi-canal de la subunidad a hacia el otro lado de la membrana (Fig. 1). En pocas palabras, la F_1F_0 -ATP sintasa es el motor molecular más pequeño y más eficiente que se ha descrito hasta ahora. Su mecanismo rotacional está bien establecido y conforma uno de los factores de acoplamiento mejor diseñados en toda la naturaleza.

Regulación de la rotación intrínseca de enzima para prevenir la actividad de F_1F_0 -ATPasa *in vivo*

Como todo motor molecular, el complejo F_1F_0 es reversible, es decir, funciona tanto en el sentido de la síntesis como en el de la hidrólisis de ATP. Como se explicó, cuando existe un gradiente de protones significativo además de altas concentraciones de ADP y P_i , se favorece que el rotor de la enzima gire en el sentido que cataliza la síntesis del ATP. Esto es lo que normalmente ocurre en las mitocondrias y los cloroplastos que están respirando y fotosintetizando de manera constitutiva, así como en las bacterias que crecen en medios ricos de substratos oxidables. Sin embargo, si alguno o varios de los substratos para la síntesis de ATP disminuyen a niveles muy bajos, entonces el rotor central del complejo F_1F_0 comienza a girar en el sentido de la hidrólisis del ATP y eso consume al ATP de la célula. Fisiológicamente, en los organismos respiratorios esto puede ocurrir por algún daño mitocondrial asociado por ejemplo a periodos prolongados de isquemia, esto detiene al aporte de oxígeno a la mitocondria y por lo tanto decae el gradiente de protones. Esto mismo ocurre en las plantas, las algas y las bacterias fotosintéticas durante los periodos de oscuridad, cuando se detiene el flujo de electrones fotosintético, y por lo tanto se colapsa el potencial trans-membranal de los cloroplastos o de la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas. Por esto, la naturaleza ha diseñado o modificado a algunas subunidades de la enzima para poder inhibir la actividad de F_1F_0 -ATPasa sin bloquear la de F_1F_0 -ATP sintasa. En general, estos mecanismos de regulación responden a la caída del gradiente de protones en las bacterias y las mitocondrias o al potencial redox en los

cloroplastos y las bacterias fotosintéticas. En ambos casos, al caer los gradientes electroquímicos, algunas subunidades o dominios inhibitorios se estructuran de tal manera dentro del rotor de la enzima que impiden el giro del cuello central impulsado por la unión del ATP (revisado en [7]). En las bacterias, esta función inhibitoria la lleva a cabo la subunidad ϵ que funciona como un trinquete, es decir, una estructura que favorece el giro del cuello central de la porción F_1 en el sentido de la síntesis, pero lo inhibe en el de la hidrólisis. Se ha demostrado que esta subunidad ϵ es capaz de extender y enredar dos de sus α -hélices alrededor de la subunidad γ del cuello central y eso favorece la rotación en el sentido de la síntesis de ATP. Por lo contrario, cuando estas dos hélices se contraen cerca del dominio mayor de esta misma subunidad, este conformero interfiere con el giro del rotor y la actividad de ATPasa se inhibe. Esta última conformación se favorece cuando el gradiente de protones disminuye. Por otro lado, en los cloroplastos de las plantas se ha demostrado que existe un puente disulfuro en la subunidad γ que no se presenta en la enzima bacteriana o mitocondrial, en un dominio adicional que se encuentra localizado en el cuello central giratorio que conecta a la F_1 con la F_0 . Se ha demostrado que la formación de este puente disulfuro en condiciones oxidantes inhibe la rotación de γ , mientras que la reducción del mismo puente incrementa la velocidad de rotación del cuello central de la F_1 (revisado en [7]). Este esquema concuerda con el funcionamiento *in vivo* de la enzima de los cloroplastos; en condiciones de oscuridad se pierde el gradiente de protones lo que induce condiciones oxidantes que favorecen la formación del puente disulfuro en γ impidiendo que la F_1F_0 consuma al ATP sintetizado en condiciones de iluminación. Por el contrario, en condiciones de iluminación, se induce la formación del gradiente electroquímico de protones en la membrana de los tilacoides, lo cual favorece la reducción de una proteína llamada tioredoxina. Esta proteína se encarga de reducir al puente disulfuro de la subunidad γ lo que permite el giro del cuello central, con lo cual se favorece la actividad de F_1F_0 -ATP sintasa en el cloroplasto.

Por otro lado, haremos énfasis en la regulación de la enzima mitocondrial dado que es la que se encuentra presente en todos los eucariontes, desde levaduras hasta la especie humana. En mitocondrias existe una proteína inhibidora que es legendaria, dado que se aisló por primera vez dos años después de la primera purificación de la F_1 -ATPasa mitocondrial por el grupo de Racker. Desde entonces, se demostró que esta proteína inhibía la actividad de F_1 -ATPasa, es decir, que se describió como el inhibidor fisiológico de la enzima mitocondrial, y por ello se le denominó "IF₁" abreviando su carácter de inhibitorio de la F_1 -ATPasa. Desde entonces se han realizado una cantidad enorme de estudios para entender el mecanismo inhibitorio de esta proteína. Por un lado, se han realizado estudios con la IF₁ unida a la F_1 o a la enzima completa (complejo F_1F_0 -I) para analizar el mecanismo cinético de inhibición y su sitio de unión en la enzima. Por otro lado, se han estudiado las características estructurales de la IF₁ aislada que dan pauta a su función como inhibidor de la F_1F_0 -ATPasa. En los primeros estudios realizados, se encontró que esta IF₁ es una proteína pequeña, de 10 kDa, que se une a la F_1 con una estequiometría de 1:1 de manera no-competitiva con el ATP. La unión de la IF₁ depende de que la F_1 realice algunos ciclos de hidrólisis, pues al parecer ésta se asocia a un intermediario de la catálisis que contiene ADP unido en un sitio catalítico. También se demostró que esta IF₁ inhibe a la enzima preferentemente en condiciones ácidas (pH 6.5-6.8), mientras que a pH alcalino (7.8-8.5) pierde su capacidad inhibitoria. Esto concuerda con el hecho de que la parte F_1 se localiza en la matriz mitocondrial, la cual mantiene un pH alcalino en presencia del gradiente electroquímico de protones, indicando que la enzima puede sintetizar ATP en presencia de la IF₁ en la mitocondria funcional. Sin embargo, en cuanto disminuye el gradiente de protones por alguna disfunción mitocondrial, la IF₁ puede ejercer su función inhibitoria con la mayor eficiencia para prevenir la hidrólisis del ATP por el complejo F_1F_0 en estas condiciones. Por otro lado, se encontró que la IF₁ es capaz de entrecruzar covalentemente con el dominio C-terminal de la subunidad β de la F_1 , esto sugirió que el mecanismo de acción de esta proteína era el de bloquear los cambios conformacionales de la subunidad β que son necesarios para la catálisis, sin unirse directamente a uno de los sitios catalíticos de la enzima [8]. Posteriormente, se trató de discernir la región inhibitoria de la IF₁ que se une a la subunidad β por medio de la síntesis o

expresión de fragmentos de diferentes regiones de la IF₁, así como el análisis de los péptidos y las mutantes dirigidas de la IF₁ para determinar que aminoácidos son clave para la inhibición. Todos estos trabajos demostraron que la región importante para la inhibición es un dominio localizado del lado N-terminal de los residuos 17-47 (de un total de 84 que contiene la IF₁ de bovino por ejemplo). En los extremos de este dominio inhibitorio se localizaron también algunos residuos de histidina importantes para la regulación del efecto inhibitorio por el pH. Las mutaciones que cambiaron estas histidinas, hicieron que la IF₁ perdiera la regulación por pH de tal modo que algunas de ellas dejaron de inhibir a pH ácido, mientras que otras que mantuvieron una carga positiva en estas posiciones, se volvieron inhibidores permanentes, de tal modo que a cualquier valor de pH ejercieron su efecto inhibitorio [9, 10]. En resumen, la IF₁ se divide en dos dominios funcionales, uno de inhibición (17-47), y el otro de regulación que comprende a las histidinas regulatorias. Para resolver mejor la localización de la IF₁ en la estructura cuaternaria de la F₁-ATPasa y de la F₁F₀-ATP sintasa completa, en nuestro grupo nos dedicamos a entrecruzar covalentemente a la IF₁ con subunidades adyacentes por medio del entrecruzador reversible DSP, el mismo que inicialmente utilizó Paul D. Boyer para tratar de inhibir la rotación intrínseca de la F₁. Sorprendentemente, además de confirmar que la IF₁ entrecruzó con la subunidad β de la F₁, encontramos que también puede entrecruzar con las subunidades del rotor, es decir con γ y ε tanto en la F₁ soluble como en la F₁F₀-ATP sintasa completa. Este resultado implicó que el dominio inhibitorio de la IF₁ se une entre el rotor y el estator de la enzima, lo cual conformó la primera evidencia de que la IF₁ podría interferir no sólo con los cambios conformacionales de las subunidades β, sino también con el giro del rotor o cuello central de la enzima [11]. Posteriormente, el grupo del premio Nobel John E. Walker, confirmó este resultado al resolver la estructura del complejo F₁-I dimérico reconstituido con IF₁ recombinante. En esta estructura se encontró que el dominio N-terminal de la IF₁ se une directamente con el dominio N-terminal de la subunidad γ, en el corazón de la F₁-ATPasa, a través de una interfase α/β [3]. Este resultado confirmó que el mecanismo de la IF₁ es el de inhibir tanto los cambios conformacionales de la subunidad β, como el giro de la subunidad γ. Esto implica también, que tanto en las bacterias como en las mitocondrias y los cloroplastos, la regulación de la actividad de la enzima se concentra en el cuello central giratorio y que, al bloquear la rotación del mismo por diferentes mecanismos, se favorece la síntesis de ATP mientras que la actividad de F₁F₀-ATPasa se bloquea. A este respecto, una pregunta que permanece abierta, es ¿cómo se mueve la proteína inhibidora en condiciones de síntesis de ATP, es decir, en presencia de un gradiente de protones, ADP y Pi, para permitir el giro del cuello central? Algunos grupos sostienen que la IF₁ se disocia de la ATP sintasa en condiciones de síntesis de ATP; sin embargo, otros grupos han mostrado que la IF₁ se mantiene unida a la F₁F₀-ATP sintasa en una posición no inhibitoria en presencia del gradiente de protones (revisado en [7]). En algunos experimentos no publicados aún, nosotros mismos hemos retomado esta pregunta, y hemos encontrado que la IF₁ se mueve dentro de la enzima en una posición que podría permitir el giro del rotor, sin disociarse de la parte F₁ de la enzima.

Probablemente se estarán preguntando, cuál es la función del resto de la IF₁, ¿es simplemente estructural? O ¿tiene algún otro papel? Se sabe que el dominio C-terminal no es esencial para la inhibición, e incluso algunos fragmentos que carecen de este dominio muestran una mayor afinidad por la F₁ que la proteína silvestre. Sin embargo, el papel del dominio C-terminal no quedó claro sino hasta que se demostró que este extremo de la IF₁ induce la formación de homodímeros de la IF₁ pues contiene dominios de dimerización que forman trenzas de α-hélices antiparalelas. Desde años anteriores, se sabía que la IF₁ podía formar homomultímeros incluyendo dímeros y tetrámeros. Además de esto, se encontró que la forma de mayor afinidad inhibitoria por la F₁-ATPasa es la forma dimérica de la IF₁ [12]. A raíz de estos resultados, y tal vez no tan sorprendente para entonces, también se demostró que la IF₁ no sólo es capaz de formar homodímeros, sino también de inducir la dimerización de la F₁-ATPasa soluble. Estos resultados abrieron la pauta para investigar si la dimerización observada en el complejo F₁-I (F₁-ATPasa conteniendo a su IF₁ asociada), se extendía o no a la ATP sintasa completa, es decir si existía una especie dimérica de la F₁F₀-ATP sintasa y si ésta se formaba en respuesta a la asociación de la IF₁.

La F_1F_0 -ATP sintasa se homo-dimeriza en la mitocondria y esto contribuye a la formación de las crestas de la membrana interna mitocondrial

Dado que la preparación de F_1I requiere separar a la F_1 de F_0 y extraerla de la membrana interna mitocondrial, era importante demostrar que la dimerización de la F_1 inducida por la IF_1 no era un artificio de la preparación, con lo cual la dimerización de la enzima podría cobrar una relevancia fisiológica. En paralelo, otros grupos como el de Hermann Schagger había estado estudiando el proceso de agregación homóloga y heteróloga de varios complejos mitocondriales, incluyendo a los complejos respiratorios I, III y IV además del complejo V que corresponde a la ATP sintasa. Este grupo demostró que al extraer a los diferentes complejos respiratorios de la membrana interna mitocondrial con diferentes detergentes suaves, como lo son la digitonina, el tritón-X100, o el lauril-maltósido, encontraba varios super-complejos, es decir, agregados de complejos respiratorios, que podía resolver por medio de electroforesis en geles nativos azules [13]. Entre estos super-complejos, encontró dímeros y polímeros de mayor peso molecular de la F_1F_0 -ATP sintasa, los cuales se enriquecían a concentraciones relativamente bajas de detergente. La suposición detrás de estos experimentos es que estos super-complejos, incluyendo al dímero de la enzima, existen *in vivo* en la mitocondria, y al usar concentraciones bajas de estos detergentes, se pueden extraer sin disociarlos. Por otro lado, cuando se usan concentraciones altas de estos detergentes, las asociaciones entre estos complejos se pierden y se enriquecen las especies monoméricas. Sin embargo, quedaba la duda de si estos super-complejos podran ser un artificio del proceso de extracción con los detergentes, de manera similar al dímero del complejo F_1I aislado de mitocondrias de res.

Por lo tanto era necesario demostrar que la formación de estos dímeros de la ATPasa fueran dependientes de la presencia de genes o proteínas esenciales en la mitocondria, incluyendo a la IF_1 , de tal manera que esto comprobara que la oligomerización de la ATP sintasa ocurre *in vivo* y no es un artificio de los procesos de extracción. Para ello, varios grupos se dieron a la tarea de remover a la IF_1 , o de interrumpir el gen de la IF_1 junto con otros genes de F_0 para ver el efecto de estas remociones en la dimerización de la enzima. La hipótesis detrás de estos experimentos, era que si la IF_1 o los otros genes son factores dimerizantes de la enzima *in vivo*, su remoción debera de prevenir la dimerización de la F_1F_0 extraída con detergentes. Sorprendentemente, se encontró que a pesar de que se haya removido a la IF_1 física o genéticamente en mitocondrias de bovino o de levadura, respectivamente, la enzima era capaz de dimerizarse. Sin embargo, la remoción de las subunidades de F_0 denominadas e y g, eliminaron casi por completo la dimerización de la enzima [14] [15]. Estos resultados tiene una triple conclusión: 1) que el dímero de la enzima se forma en la mitocondria por un proceso dependiente de algunas de sus subunidades; 2) que la IF_1 no es esencial para la dimerización del complejo F_1F_0 completo pero sí para la dimerización de la F_1 soluble; 3) que otras subunidades de la enzima localizadas en el canal F_0 como e y g, son las más importantes para formar o estabilizar al dímero de la ATP sintasa. En pocas palabras, parece ser que el dímero de la enzima completa se forma primordialmente a través de interacciones entre los canales F_0 de protones.

De manera sorprendente y simultánea, también se observó en estos estudios que en las mutantes de levadura carentes de las subunidades e y g, además de ser incapaces de dimerizar a la ATP sintasa, perdían por completo la forma normal de las mitocondrias de tal manera que éstas perdieron las crestas las cuales se arreglaron como círculos concéntricos dentro de unas mitocondrias hinchadas [16]. Esto se reprodujo con varias mutantes que están alteradas en la dimerización o incluso en la oligomerización de especies más grandes de la ATP sintasa, incluyendo al tetrámero de la enzima [17]. La gran conclusión a este respecto, es que la polimerización de la enzima a partir de sus dímeros, controla e induce la formación de las crestas mitocondriales. Es decir, que la ATP sintasa no sólo cataliza la reacción de síntesis de ATP a partir de ADP y Pi de la manera más eficiente y espectacular con su mecanismo rotacional, sino que al polimerizarse, este proceso le da forma a las crestas mitocondriales y con ello se aumenta la superficie disponible para la fosforilación oxidativa mitocondrial.

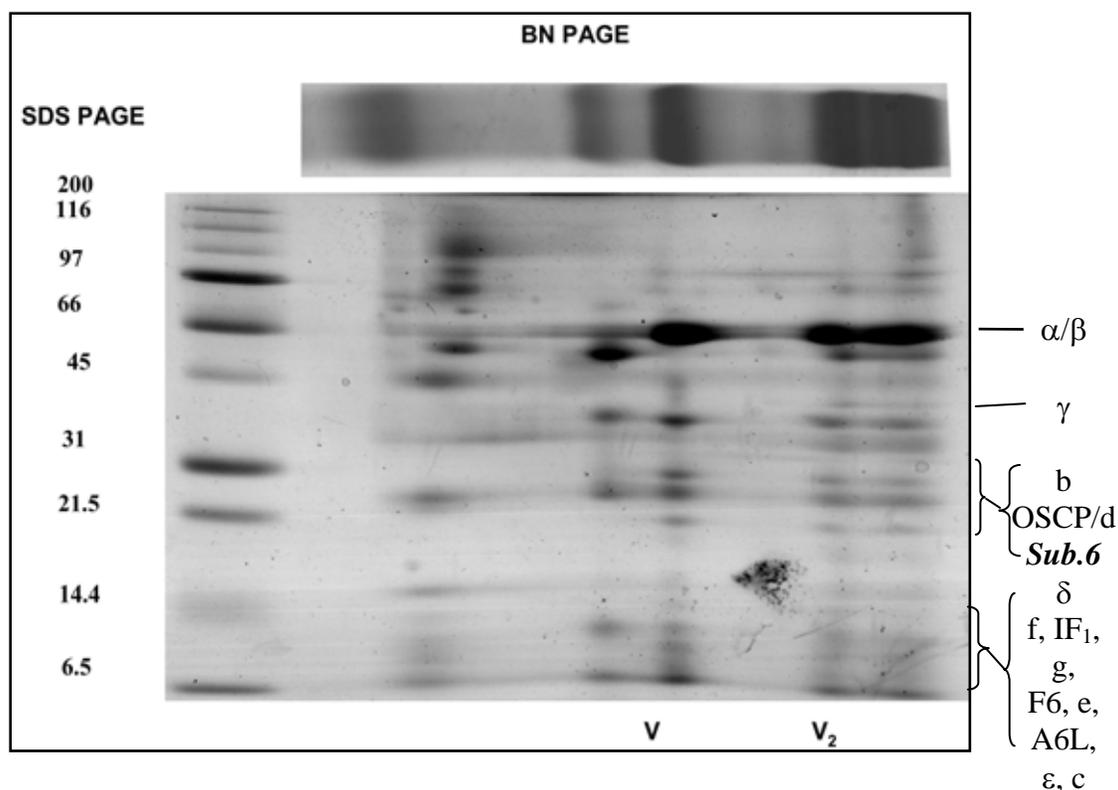


Figura 2. Resolución de los supercomplejos mitocondriales aislados con digitonina y sus subunidades por electroforesis en dos dimensiones nativa-desnaturalizante. El carril horizontal superior corresponde a una electroforesis azul nativa (BN-PAGE) de un extracto mitocondrial obtenido con digitonina. Un carril idéntico, se colocó sobre un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) como se indica y se realizó la electroforesis en dos dimensiones. Se indican las posiciones del dímero (V_2) y del monómero (V) del complejo V o ATP sintasa mitocondrial. También se resuelven otros complejos como el III dimérico, y el complejo I, pero no se indican. A la izquierda se muestran los estándares de peso molecular y a la derecha la identidad de las subunidades de la F_1F_0 -ATP sintasa.

Una pregunta que sigue abierta, es si la dimerización de la enzima favorece alguna de las propiedades funcionales o estructurales del complejo F_1F_0 . Una de las hipótesis más favorecidas es que muy probablemente esta dimerización le confiere mayor estabilidad estructural a la enzima, de tal manera que se hace más resistente a condiciones de estrés como lo es la generación constante de radicales libres, por ejemplo. Por otro lado, es muy probable que al polimerizarse, el complejo F_1F_0 haga más eficiente su mecanismo rotacional, dado que la hom-asociación debe ayudar a resistir la inercia rotacional del cuello central giratorio. Dado que esta asociación debe ocurrir entre subunidades del estator de la enzima, para permitir el giro ininterrumpido del rotor, los polímeros de la ATP sintasa deben de darle una mayor inmovilización a los estatores de tal manera que el giro del rotor no se traduzca en el giro de la enzima completa. Sin embargo, falta evidencia funcional que corrobore estas posibles ventajas funcionales y estructurales para la enzima en la mitocondria. Un dato interesante a este respecto, es que la IF_1 es capaz de conferirle estabilidad funcional y estructural tanto a la F_1 -soluble, como al complejo F_1F_0 asociado a la membrana interna mitocondrial cuando se estudia la disociación de las subunidades de la enzima por medio de su exposición a altas presiones [18]. Este dato además de corroborar el papel de la IF_1 en la dimerización de la enzima, también sugiere que la IF_1 podría tener un papel estabilizador del dímero de la enzima completa, aunque

los antecedentes anteriores demuestran que la IF_1 no es esencial para la dimerización de F_1F_0 . Para estudiar esta posibilidad, nuestro laboratorio se dio a la tarea de buscar condiciones de sobre-expresión de la IF_1 en mitocondrias de rata, además de estudiar el efecto de la reconstitución de cantidades saturantes de la IF_1 en el complejo F_1F_0 aislado al cual se le ha removido físicamente su IF_1 endógena. La suposición era que si la IF_1 controla o regula la dimerización de la enzima *in vivo*, entonces su sobre-expresión o reconstitución a concentraciones saturantes, deberían de incrementar la relación Dímero/Monómero (D/M) del complejo F_1F_0 extraído con digitonina. De acuerdo con esta hipótesis, encontramos que efectivamente, la sobre-expresión o reconstitución de la IF_1 incrementó la relación D/M de la F_1F_0 -ATP sintasa completa (García y cols., enviado). Esto implica que la IF_1 aunque no es una proteína esencial para la dimerización, debe localizarse en la interfase del dímero de F_1F_0 , y estabilizar a éste por medio de interacciones a nivel de las porciones F_1 - F_1 . Esto nos hizo proponer inicialmente un modelo en el cual el dominio C-terminal dimerizante de la IF_1 podría atravesar la interfase del dímero para estabilizarlo, mientras que el dominio N-terminal debería de localizarse en su sitio inhibitorio entre el rotor y el estator bloqueando la rotación de γ y los cambios conformacionales de las subunidades β catalíticas (Ver Fig. 1). En este primer modelo, se colocaron a las subunidades e y g, entre otras de F_0 , en la interfase del dímero a nivel de la membrana, de acuerdo a los estudios que demuestran que estas dos subunidades son esenciales para la dimerización. En esta orientación, los dos cuellos centrales quedan localizados en la interfase de la enzima, y esto permite que el giro del rotor se lleve a cabo sin impedimentos estéricos. Por supuesto, este modelo inicial ha sido sujeto a estudios estructurales, los cuales han comenzado con la resolución de la estructura de la enzima por medio de análisis de microscopía electrónica, y los hallazgos han sido sorprendentes y concuerdan con el papel del dímero en la formación de las crestas mitocondriales.

Estructura del dímero de la ATP sintasa: la base estructural que le da forma a las crestas mitocondriales

La primera estructura del dímero de la ATP sintasa, se logró resolver en nuestro grupo gracias a una preparación enriquecida de la ATP sintasa dimérica. Gracias a esta preparación, y en colaboración con el Dr. Stephan Wilkens, logramos obtener una gran cantidad de imágenes de microscopía electrónica del dímero de la enzima para poder alinearlas y promediarlas; .Gracias a este análisis, pudimos generar un modelo en dos dimensiones del posible arreglo de esta estructura. Este análisis dio como resultado una estructura que mostró tanto la geometría general del dímero, como algunos rasgos totalmente novedosos que son de suma importancia. En primer término, los dos monómeros se acomodan en la estructura dimérica como se esperaba de los resultados bioquímicos, de tal manera que las dos porciones F_0 están en contacto muy cercano una de la otra.

Se puede decir que un canal F_0 prácticamente se encima en el otro, haciendo probablemente los contactos más fuertes de la interfase del dímero. En el otro extremo las porciones F_1 se separan al menos unos 10 Å, de tal manera que los dos ejes más largos que atraviesan longitudinalmente a cada monómero, se inclinan 40° entre sí y convergen del lado de la interfase F_0 - F_0 . Esto da como resultado una geometría cónica con la parte más angosta del lado de la membrana, y la parte más abierta del lado de las porciones F_1 (Fig. 3). ¿Qué implicaciones tiene esto? La gran implicación es que el dímero impone una curvatura a la bicapa de los lípidos de la membrana que se acomodan rodeando al dímero de acuerdo a esta geometría. Si uno se imagina que este dímero se polimeriza formado multímeros de la enzima en la membrana, esto implica que de acuerdo a la geometría del polímero de la ATP sintasa se inducirá una curvatura en la membrana acorde con el arreglo angular de este homopolímero. En otras palabras, el dímero cónico de la ATP sintasa es la base estructural a partir de la cual se genera la curvatura de membrana interna mitocondrial en las crestas. Esta hipótesis había sido propuesta en realidad por el grupo de Allen hace varios años después de que observó polímeros de las ATPasas asociados a la membrana interna de las mitocondrias de *Paramecium* [20], y se

había reforzado recientemente por otros grupos que estudian el efecto de la remoción del dímero de la enzima en las mitocondrias de levadura [16, 17]. La hipótesis de Allen implica a un dímero cónico de la ATPasa que conforme polimeriza induce la curvatura en la membrana y la formación de protuberancias en la superficie de la bicapa. Conforme se extiende la asociación de la ATPasa, se forma una doble hélice en espiral que al polimerizarse extiende las protuberancias iniciales de la membrana, enredándolas dentro de su eje mayor para darles forma de crestas tubulares (Ver Fig. 4). Esta hipótesis se reforzó con los estudios de Velours y cols. [16] y de Devenish y cols. [17] en los cuales han encontrado que las mutantes de la ATPasa afectadas únicamente en la dimerización pierden las crestas mitocondriales, esto puede explicarse con dos interfases entre las partes F_0 , y una forma cónica del dímero que se va extendiendo a lo largo de las crestas mitocondriales.

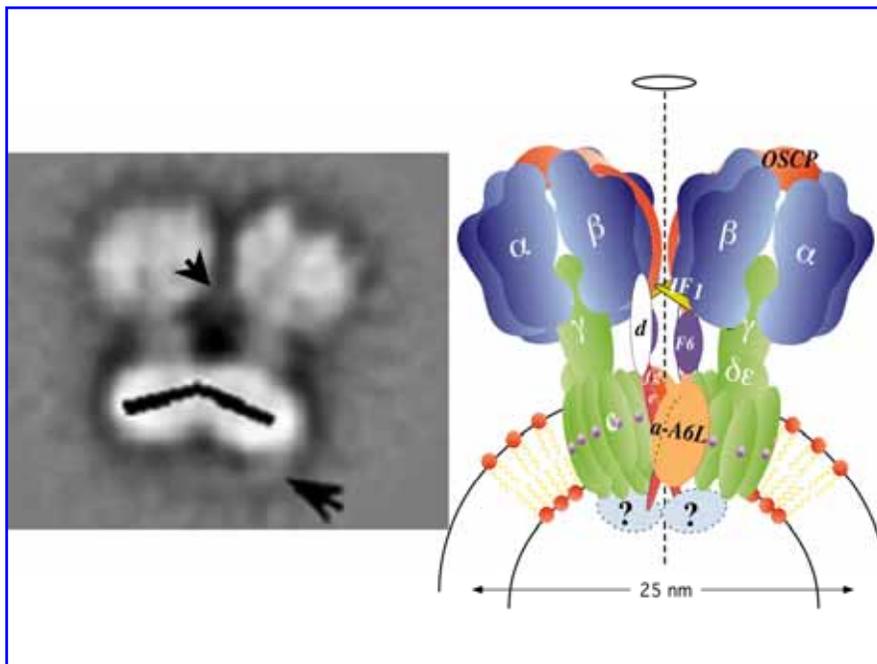


Figura 3. Estructura cónica del dímero de la ATP sintasa dimérica de corazón de bovino. Las flechas del lado izquierdo indican los puentes F_1 - F_1 y F_0 - F_0 que estabilizan al dímero. Ambos monómeros se inclinan 40° como se muestra en las líneas negras sobre las porciones F_0 . El modelo de la izquierda es similar a la Fig. 1 pero tomando en cuenta la estructura cónica y enfatiza la curvatura de la membrana que impone esta estructura cónica. Modificado de la referencia [19].

En conclusión, la estructura cónica del dímero de la ATP sintasa aislada de las mitocondrias de corazón de bovino, concuerda perfectamente con estos modelos de polimerización de dímeros cónicos que le dan la forma a las crestas mitocondriales. Para poder entender la geometría de los polímeros de la ATP sintasa que le dan forma a las crestas, faltan más estudios estructurales que permitan resolver la geometría de los tetrámeros y polímeros mayores de la ATP sintasa. Sin embargo, esto abre una nueva brecha de estudio para entender la biogénesis de las mitocondrias y cómo están arreglados los demás súper complejos mitocondriales entre las crestas que forma la ATP sintasa dimérica.

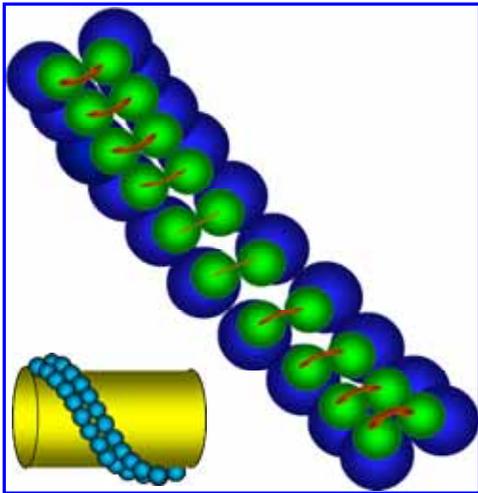


Fig. 4. Modelo del polímero de la ATP sintasa que le da forma a las crestas mitocondriales. Se muestra una vista desde el interior de una cresta, donde primero se observan las partes F_0 (verde) con sus respectivos puentes (naranja) y en azul las partes F_1 . La vista desde afuera de la cresta se muestra en amarillo en la parte inferior izquierda.

Mutaciones humanas en los genes de la ATP sintasa que producen miopatías mitocondriales letales

Como toda enzima esencial, las mutaciones que impiden por completo el ensamblaje o la función de la ATP sintasa humana son letales. La mayoría de estas mutaciones no se conocen puesto que impiden por completo el desarrollo de la vida humana y generan la muerte prenatal o post-natal inmediata. Sin embargo, en nuestras sociedades actuales, se han expresado y localizado algunas mutaciones puntuales en el gen ATP6 de la subunidad a de F_0 que no impiden por completo el funcionamiento de la enzima, sino que se expresan en pacientes que desarrollan síndromes mitocondriales severos pero que permiten el desarrollo de una vida humana a edades tempranas o incluso a edad adulta. La mayoría de estas mutaciones se han localizado en uno de los dos genes de la enzima, en particular del canal F_0 , codificados en el ADN mitocondrial. Dado que este ADN tiene menos sistemas de reparación, se replica más frecuentemente y está menos empacado que el ADN nuclear, es blanco de mutaciones frecuentes que se acumulan sobre todo en edad adulta y la vejez. Las mutaciones más frecuentes que se han localizado en los pacientes con deficiencias en la ATP sintasa, se han localizado en el gen ATP6 que codifica para la subunidad 6 del canal de protones F_0 (subunidad a en *E. coli*). Esta subunidad es esencial para el transporte de los protones dado que forma una interfase con el anillo de las subunidades c que gira respecto a la subunidad a conforme transporta los protones. Esta subunidad 6 contiene un residuo de arginina esencial (en la posición 159 en la enzima humana, o 8993 en el ADNmt) que está conservado en todas las especies descritas y que forma un puente salino transitorio y esencial con el carboxilo esencial y protonable de la subunidad c. Las mutaciones más frecuentes en ATP6 que producen las miopatías mitocondriales se localizan en regiones muy cercanas a esta arginina esencial. La mayoría de estas mutaciones producen las mismas enfermedades, es decir NARP (Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa, Ataxia Neurogénica Y Retinitis Pigmentosa) o MILS (Maternally Inherited Leigh Syndrome, Síndrome de Leigh de Herencia Materna). MILS es un síndrome mucho más severo que frecuentemente produce muerte por daño cerebral o cardíaco en los primeros dos años de vida. Por otro lado, NARP es menos severo pues permite un desarrollo a edades incluso adultas aunque también llega a provocar la muerte por las mismas causas. Se preguntarán cómo es que una misma mutación o dos mutaciones en la misma subunidad pueden producir ambas enfermedades. La gravedad de estas enfermedades se debe tanto al tipo de mutación como a la proporción de las copias del ADNmt mutado en relación al normal o silvestre. Por un lado, en estas posiciones (L156, L217 y L220) en los pacientes se acumulan dos tipos de mutaciones, unas que cambian la leucina normal por prolina, y otras que la cambian por arginina. La introducción de una arginina en una hélice trans-membranal es en general

termodinámicamente desestabilizante pues se integra una carga positiva en un ambiente apolar; y además de esto, esta carga positiva de la arginina se localiza relativamente cerca de la arginina esencial (159) dentro de la topografía de las 5 hélices transmembranales de la subunidad 6. En pocas palabras, la introducción de una arginina en esta posición es doblemente dañina, por un lado puede alterar la estructura de la subunidad 6, y por otro lado puede interferir severamente con el flujo de protones en la interface 6/c₁₀₋₁₂. En cambio, la introducción de una prolina en esta posición dobla a las α -hélices de la membrana en un ángulo discreto, pero no introduce carga dentro de la membrana. De acuerdo a estos efectos, se ha demostrado que los pacientes que contienen arginina en estas posiciones tienen en general la enfermedad más severa (MILS), y además la síntesis de ATP de sus mitocondrias se inhibe en gran proporción (50-85%), mientras que los pacientes que tienen las mutaciones que cambian las leucinas por prolinas, en general manifiestan la enfermedad menos severa (NARP). Sin embargo, otro factor igualmente importante es la cantidad de ADNmt mutado respecto al normal. Dado que existen de 3000 a 10000 copias de ADNmt por célula, tanto el ADNmt mutado como el silvestre co-existen en las células de los pacientes. Esto se denomina una condición de heteroplasmia, mientras que cuando en las células solamente se encuentra ADNmt normal o sólo ADNmt mutado, se denomina homoplasmia. En general, cuando se acumula entre el 70-90% de ADNmt mutado, se produce NARP, pero cuando esta acumulación rebasa el 90%, entonces la enfermedad se manifiesta más severamente como MILS. Es posible entonces que aunque un paciente contenga una mutación de tipo L-R, manifieste NARP si su porcentaje de mutación es menor al 90%.

Una de las preguntas centrales para entender la fisiopatología de estas enfermedades generadas por cada una de estas mutaciones puntuales, es conocer cuál es el efecto de éstas en la estructura y función de la enzima. En el campo existe una controversia a este respecto dado que algunos grupos que trabajan primordialmente con tejidos obtenidos de manera *post-mortem* de los pacientes, y con algunas células en cultivo inmortalizadas, han encontrado que el complejo F₁F₀ se disocia en fragmentos menores debido a este tipo de mutaciones, y su conclusión es que es que éstas impiden el correcto ensamblaje de la enzima. Hay que recordar que la mayoría de las subunidades de la enzima se importan del citosol como precursores, y luego se procesan y se ensamblan dentro de la mitocondria, excepto las dos subunidades mitocondriales (Sub 6 y Sub 8). Esto implica que el complejo F₁F₀ se ensambla en módulos, por un lado la parte F₁, y por otro el canal F₀, luego ambos se asocian entre sí cuando se añaden las subunidades 6 y A6L de F₀ para hacer de la ATP sintasa un complejo funcional; finalmente, la enzima se asocia en forma dimérica para darle forma a las crestas, como discutimos anteriormente. Por lo tanto, la idea de algunos grupos es que las mutaciones en ATP6 que producen NARP/MILS, interrumpen este proceso en alguna o varias etapas dando como resultado los fragmentos de F₁F₀ que se observan en los tejidos *post-mortem* [21]. Sin embargo, datos de nuestro grupo y de otros laboratorios [22, 23], han mostrado recientemente que el complejo F₁F₀ completo, y funcional se puede aislar a partir de mitocondrias de cultivos primarios de fibroblastos de los pacientes, conteniendo a todas las subunidades de F₁ y F₀, incluyendo a la subunidad 6 mutada. Además, se ha observado también que la actividad residual de la F₁F₀-ATPasa y de la F₁F₀-ATP sintasa es completamente sensible a oligomicina, un inhibidor clásico que bloquea el flujo de los protones por la F₀ al unirse en la interfase de las subunidades 6 y c. Esto implica que para que la enzima mutante de los pacientes se inhiba con la oligomicina, tanto F₁ como F₀ deben estar muy bien acoplados estructuralmente en una enzima bien ensamblada, como la de los fibroblastos. Recientemente además, nos preguntamos si la enzima mutante de estos pacientes podría ensamblarse en cultivos homoplásmicos para estas mutaciones, tanto en su estructura monomérica como en la dimérica (Cortés-Hernández y cols., en preparación). De manera sorprendente, encontramos que la enzima mutante L156R, es decir la más frecuente y la más severa de estas mutaciones no sólo se puede ensamblar como monómero, sino que también se puede asociar en dímeros y multímeros de mayor peso molecular tal y como se observa en mitocondrias de bovino o de levadura (Fig. 4). En conclusión, las mutaciones NARP/MILS en la posición 156 de la subunidad 6 de la ATP sintasa humana no interfieren con el ensamblaje de la enzima monomérica ni dimérica.

Entonces ¿Qué hace esta mutación? Si no impide la formación completa de la enzima, entonces debe de tener un efecto funcional importante. Estudios de nuestro grupo en colaboración con el Dr. Roderick A. Capaldi, demostraron que esta mutación bloquea el flujo de protones por el canal F_0 , de tal manera que el potencial de la mitocondria se hiperpolariza debido a que los protones no pueden regresar a la matriz mitocondrial a través de los canales de la enzima mutada [22]. Seguramente, la introducción de un residuo de R o de P distorsiona a la hélice 4 de la subunidad 6 donde se localiza la arginina esencial de esta subunidad, de tal manera que disminuye la velocidad de rotación en la interfase 6/c₁₀₋₁₂, además, en el caso de la mutación L-R, la adición de una carga positiva debe de formar un puente salino extra, o distorsionar la hélice en mayor proporción, para hacer más lenta esta rotación y por lo tanto disminuir la velocidad de transporte de protones al menos a la mitad. Esto se ha propuesto por varios grupos además del nuestro, a la luz de encontrar que la enzima mutante humana no se desensambla y además es sensible a la oligomicina.

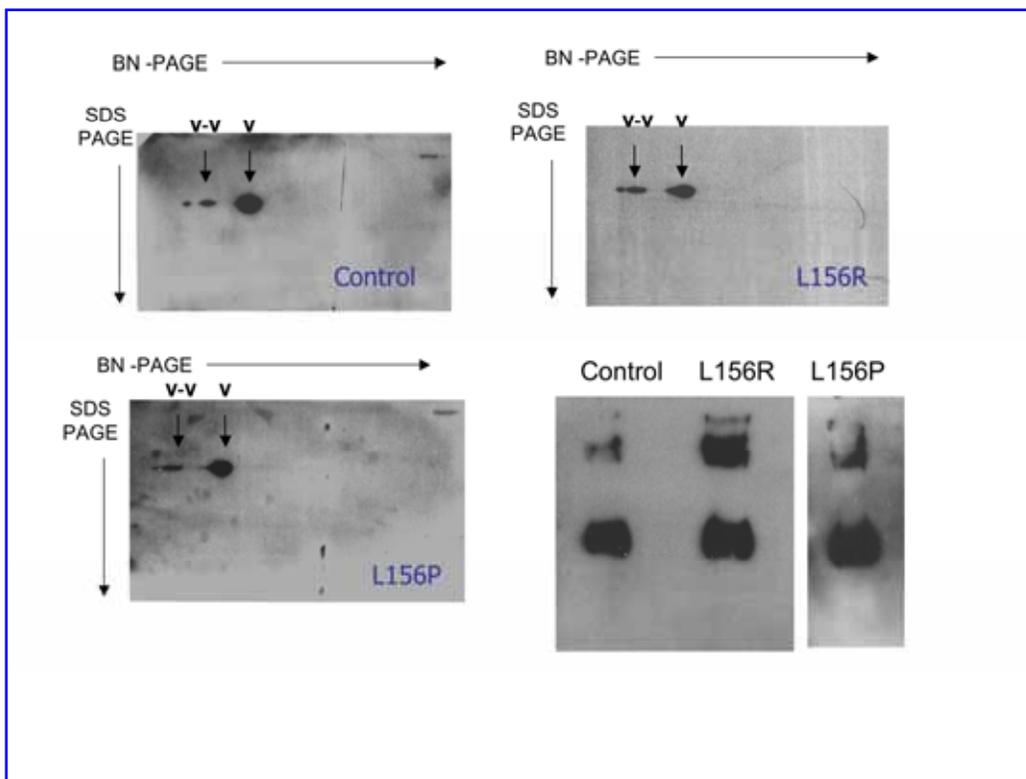


Figura 4. Detección del dímero y el monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa humana en células homoplásmicas de pacientes con mutaciones en ATP6 causantes de NARP/MILS. Después de extraer a las mitocondrias humanas (control, L156R y L156P) con digitonina, se efectuó una electroforesis nativa (derecha inferior) y posteriormente una segunda electroforesis desnaturizante (resto de los cuadros) los cuales se revelaron por inmuno-detección con un anticuerpo monoclonal anti subunidad α . Se muestra la posición del dímero (V-V) y del monómero (V) de la enzima. A pesar de la inhibición de la síntesis de ATP que ejercen estas mutaciones, no impiden el ensamblaje de la enzima en sus formas monomérica y dimérica. (Cortés-Hernández y cols., en preparación). Ver detalles en texto.

Por otro lado, una posibilidad a explorar es que aunque la enzima no se desensamble *per-se* por la mutación, se pueda desestabilizar en condiciones que induzcan su desnaturización. Para analizar esta posibilidad, incubamos a las membranas mitocondriales o a la ATP sintasa

monomérica y dimérica extraída con digitonina en condiciones que inducen la liberación de la IF_1 de la enzima y por lo tanto incrementan la actividad de F_1F_0 -ATPasa. Esto lo realizamos tanto para un control de las mitocondrias aisladas de las células en cultivo normales, como las provenientes de los pacientes con NARP/MILS. Como esperábamos, encontramos una diferencia crucial entre la actividad de F_1F_0 -ATPasa control y mutante, pues aunque la enzima silvestre se activó claramente unas 3-4 veces, la actividad de la mutante no sólo no se incrementó, sino que además declinó a tiempos largos de activación. Esta inhibición podría estar ligada a la desnaturalización de la enzima, dado que corroboramos que la IF_1 se desprendió de la enzima mutante, tanto como la enzima control, sin embargo esta última no se activó en lo absoluto. Para corroborar esta posibilidad, cuantificamos la cantidad relativa de dímero/monómero de la ATP sintasa aislada con digitonina o con lauril maltósido con la ayuda de geles azules nativos y de doble dimensión revelados por inmuno-detección de la subunidad α . Encontramos que las condiciones que activan a la enzima silvestre, inducen la desnaturalización parcial de la enzima mutante tanto en su estado monomérico como en su disociación de dímeros a monómeros. Si recordamos los antecedentes en donde se reporta que la enzima se encuentra parcialmente desensamblada en las biopsias *post-mortem* de los pacientes con NARP/MILS, podemos ahora conciliar esos resultados con los nuestros, dado que estos últimos indican que el desensamblaje de la enzima que se observa en las biopsias *post-mortem* se debe no a la mutación per-se, sino a que la enzima es inestable. Este resultado explica cómo es que las condiciones de estrés y proteólisis *post-mortem*, durante carácter crónico del padecimiento NARP/MILS, y durante el aislamiento de las mitocondrias de estos tejidos seguramente indujeron la desnaturalización y la degradación de la enzima. En resumen, las mutaciones NARP/MILS en la posición L156R/P son devastadoras para el ser humano por tres razones: 1) bloquean el flujo de protones por F_0 aunque no desensamblan al monómero o al dímero de la enzima; 2) este bloqueo induce una hiperpolarización mitocondrial que genera un incremento en el estrés oxidativo mitocondrial en estos pacientes; 3) el daño mitocondrial crónico en los pacientes puede desestabilizar estructuralmente a la enzima mutante de los mismos dado que ésta es más lábil, y esto desencadena la disociación de la enzima durante su aislamiento y estudio *in vitro*, incluso es posible que se desensamble *in vivo*.

Todas estas conclusiones, dan la pauta para ensayar nuevas estrategias de terapia génica en cultivo para contrarrestar los efectos de la mutación. Estos estudios están en marcha en nuestro laboratorio y esperamos darán como resultado una posibilidad de curar esta mutación *in vitro*, y dar la pauta para su posible aplicación a largo plazo.

Localización de algunas subunidades de la F_1F_0 -ATP sintasa en la membrana plasmática de varios tipos celulares

Como si fuera poco el grado de complejidad para entender cómo funciona el mecanismo rotacional del motor molecular más pequeño de la naturaleza, sus mecanismos de regulación *in vivo*, y el papel del estado de agregación de la enzima en las mitocondrias, además de los mecanismos de disfunción causados por mutaciones humanas, esta enzima se ha dado el lujo de exportar algunas de sus subunidades hacia la membrana plasmática de algunos tipos celulares, en donde funcionan como receptores a diferentes efectores fisiológicos importantes. Inicialmente se había reportado la presencia de la subunidad β de la F_1 en la membrana plasmática de células cancerígenas [24], pero esto no causó mucho interés inicialmente, dado que se sabe bien que las células neoplásicas tienen una expresión irregular de algunas de las subunidades de la F_1F_0 -ATP sintasa. Sin embargo, algunos grupos han seguido esta línea y han demostrado que algunas subunidades de la parte F_1 , como son las subunidades α y β se localizan en la membrana plasmática de las células no cancerígenas como son las endotelias del cordón umbilical humano (HUVEC) [25] o los hepatocitos [26]. En ambos casos, estas subunidades de la ATP sintasa parecen funcionar como receptores a diferentes ligandos como la angioestatina o la proteína A-I de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), respectivamente. En el primer caso, la subunidad β parece funcionar como regulador de la angiogénesis puesto que la

angiostatina es un efector anti-angiogénico. En el caso de los hepatocitos, la misma subunidad β funciona como regulador de la homeostasis del colesterol al hacer las veces de receptor para la endocitosis de las HDLs. En otras palabras, es evidente que algunas de las subunidades de la parte F_1 de la enzima se expresan en la membrana plasmática de algunos tipos celulares para funcionar como receptores para diferentes ligandos y por lo tanto, regular diferentes procesos.

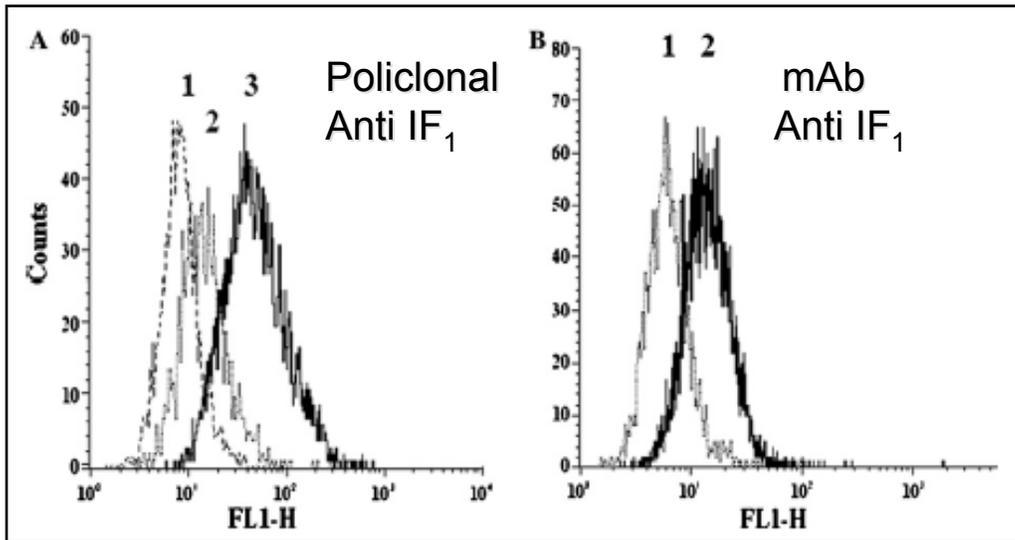


Figura 5. Inmuno-localización de la proteína inhibidora (IF_1) en la membrana plasmática de células endoteliales por citometría de flujo. La fluorescencia del anticuerpo secundario que reconoce a los anticuerpos anti- IF_1 se muestra como histogramas de eventos (ordenada) contra intensidad de fluorescencia (abcisa). A mayor cantidad de antígeno (IF_1) en la superficie de las células, la fluorescencia se desplaza hacia la derecha. El trazo con línea auxiliar (A1) corresponde a células incubadas con suero pre-inmune. Los trazos con líneas punteadas (A2 y B1) corresponden a células incubadas con los anticuerpos secundarios además del suero pre-inmune. Los histogramas con líneas continuas (A3 y B2) se obtuvieron con las células incubadas con los anticuerpos anti- IF_1 policlonales y monoclonales, respectivamente. (Ver ref. [27] para más detalles).

Esto abre una serie de preguntas novedosas para poder entender cómo es que estas subunidades que normalmente contienen una presecuencia que las dirige a la mitocondria, son llevadas a la membrana plasmática. Por otro lado, ¿es posible que la enzima completa, con las dos porciones F_1 y F_0 , se localice en la superficie de las células? Si es así, ¿se trata de una enzima funcional tanto en la dirección de síntesis como en la de hidrólisis de ATP? ¿Cómo es que una enzima diseñada como el factor de acoplamiento y motor molecular más eficiente para transducir energía y sintetizar ATP funciona ahora como un transductor de señales en la membrana plasmática? Todas estas preguntas abren una novedosa línea de estudio que está comenzando a ser estudiada en varios laboratorios del mundo incluyendo el nuestro. Algunos de estos grupos se han aventurado a medir la posible síntesis de ATP a nivel de la membrana plasmática catalizado por esta enzima, y aseveran que esta actividad existe en la superficie de las células y que responde a los inhibidores clásicos de la enzima como son la oligomicina e incluso la IF_1 . Por lo tanto, estos grupos aseguran que en la membrana plasmática se ensambla el complejo F_1F_0 completo y que además es capaz de sintetizar o hidrolizar al ATP. Dado que la síntesis de ATP requiere de muchos factores incluyendo un potencial transmembranal negativo

del lado de la F_1 y eso no es posible en la membrana plasmática, además de requerir el correcto ensamblaje y acoplamiento entre F_1 y F_0 incluyendo a las subunidades codificadas en el ADNmt, resulta difícil asegurar todo el complejo F_1F_0 se encuentra expresado y ensamblado en la membrana plasmática. Dado que esta pregunta sigue abierta, en nuestro grupo nos hemos dado a la tarea de determinar cuáles otras subunidades además de α y β se pueden localizar en la membrana plasmática de las células HUVEC y de otros tipos celulares en cultivo. Dado que la IF_1 es una subunidad regulatoria importante para la enzima, buscamos su presencia en la superficie de las células HUVECs vivas, esto es importante por que la mayoría de los estudios de inmunolocalización reportados se han realizado con las células fijadas, es decir, muertas. Cuando realizamos estudios de citometría de flujo, además de inmunotransferencias e inmunomicroscopía confocal, demostramos que la IF_1 se localiza en la superficie de estas células junto con la subunidad β de la F_1 , (Figs. 5 y 6) [27].

Por supuesto la siguiente pregunta es si ambas están asociadas entre sí formando un complejo F_1I como el de la mitocondria. Dada la dificultad para resolver esta pregunta en la membrana plasmática de las células vivas, y que los posibles estudios de colocalización por microscopía de fluorescencia no tiene la resolución para responder a esta pregunta, usamos la estrategia de la activación de las células HUVEC por $TNF-\alpha$, un efector natural de estas células que modifica la expresión de varias proteínas en su superficie.

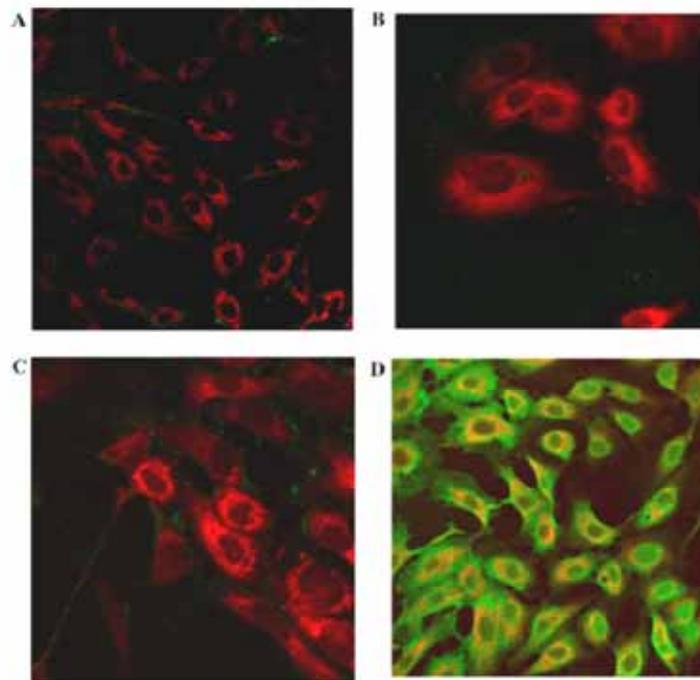


Figura 6. Inmuno-localización de la proteína inhibidora (IF_1) de la ATP sintasa en la membrana plasmática de células HUVEC por microscopía confocal. En rojo se muestra la tinción mitocondrial con Mitotracker-Red y en verde la fluorescencia de anticuerpos secundarios que reconocen a los primarios anti- IF_1 . A) y B) HUVECs incubadas con anticuerpos anti IF_1 policlonales y monoclonales, respectivamente. El anticuerpo policlonal marca la superficie de las células con una malla de puntos, mientras que el monoclonal genera puntos aislados dado que es más específico y se une con menor rendimiento a las células. C) HUVECs incubadas con un anticuerpo anti-CD47, un marcador de superficie de estas membranas como control positivo. D) Células permeabilizadas antes de la incubación con en anticuerpo anti- IF_1 , para mostrar la unión generalizada del anticuerpo cuando se rompe a la membrana plasmática. (Tomado de ref. [27]).

De manera interesante, observamos que tanto la IF₁ como la subunidad β cambian sus niveles de expresión en respuesta al TNF- α , pero en sentidos opuestos, es decir, que la expresión de IF₁ incrementa inicialmente mientras que la de la subunidad β disminuye. Esto implica que ambas proteínas no se encuentran formando un complejo estequiométrico, sino que posiblemente se encuentren separadas una de la otra en la superficie de las células, o al menos una fracción de la IF₁ podría estar unida a la F₁, pero gran parte de esta proteína se localiza en otro sitio diferente a la F₁. Esta conclusión es muy importante para el campo, y estamos en vías de demostrar si algunas otras subunidades se encuentran localizadas en la membrana plasmática y si existe IF₁, cuál sería su función además de unirse a la IF₁ en la superficie de estas células. Por lo pronto, hemos encontrado que la proteína inhibidora y la subunidad β se localizan en la superficie de otras células muy diferentes como lo son los condrocitos y fibrocondrocitos que componen al cartílago y el menisco de las rodillas humanas y de caballo. Al parecer existen niveles mayores de IF₁ en estas células comparados con las HUVECs y por supuesto, las preguntas a resolver están relacionadas con el papel de la IF₁ en el funcionamiento de los condrocitos como base estructural del cartílago, entre otras preguntas importantes por contestar.

Referencias

1. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine, *Annu Rev Biochem.* 66, 717-49.
2. Bianchet, M. A., Hüllihen, J., Pedersen, P. L. & Amzel, L. M. (1998) The 2.8-Å structure of rat liver F₁ ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 11065-70.
3. Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. & Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁, *Nat Struct Biol.* 10, 744-50.
4. Garcia, J. J. (2000) The F₀F₁-ATP synthase: binding energy, coupling and rotational catalysis, First edn, Transworld Research Network, Trivandrum.
5. Noji, H. & Yoshida, M. (2001) The rotary machine in the cell, ATP synthase, *J Biol Chem.* 276, 1665-8.
6. Garcia, J. J. & Capaldi, R. A. (1998) Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in *Escherichia coli* F₁-ATPase, *J Biol Chem.* 273, 15940-5.
7. Garcia, J. J., Minauro-Sanmiguel, F., and Bravo, C. (2002) Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6, I edn, Research Signpost, Trivandrum.
8. Jackson, P. J. & Harris, D. A. (1988) The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F₁ beta-subunit, *FEBS Lett.* 229, 224-8.
9. Lebowitz, M. S. & Pedersen, P. L. (1996) Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation, *Arch Biochem Biophys.* 330, 342-54.
10. Cabezon, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G. & Walker, J. E. (2001) The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase, *Embo J.* 20, 6990-6.
11. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. & Garcia, J. J. (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase, *J Bioenerg Biomembr.* 34, 433-43.
12. Cabezon, E., Butler, P. J., Runswick, M. J. & Walker, J. E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH, *J Biol Chem.* 275, 25460-4.
13. Schagger, H. (2001) Respiratory chain supercomplexes, *IUBMB Life.* 52, 119-28.
14. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. & Schagger, H. (1998) Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits, *Embo J.* 17, 7170-8.
15. Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D. & Velours, J. (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology, *J Biol Chem.* 279, 40392-9.
16. Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. & Velours, J. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology, *Embo J.* 21, 221-30.
17. Gavin, P. D., Prescott, M., Luff, S. E. & Devenish, R. J. (2004) Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae, *J Cell Sci.* 117, 2333-43.

18. Fornells, L. A., Guimaraes-Motta, H., Nehme, J. S., Martins, O. B. & Silva, J. L. (1998) Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F₁-ATPase, Arch Biochem Biophys. 349, 304-12.
19. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. & Garcia, J. J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis, Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 12356-8.
20. Allen, R. D. (1995) Membrane tubulation and proton pumps, Protoplasma. 189, 1-8.
21. Houstek, J., Klement, P., Hermanska, J., Houstkova, H., Hansikova, H., Van den Bogert, C. & Zeman, J. (1995) Altered properties of mitochondrial ATP-synthase in patients with a T→G mutation in the ATPase 6 (subunit a) gene at position 8993 of mtDNA, Biochim Biophys Acta. 1271, 349-57.
22. Garcia, J. J., Ogilvie, I., Robinson, B. H. & Capaldi, R. A. (2000) Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtdna, J Biol Chem. 275, 11075-81.
23. Sgarbi, G., Baracca, A., Lenaz, G., Valentino, L. M., Carelli, V. & Solaini, G. (2006) Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP/Leigh syndromes resulting from the 8993T>G mutation in mtDNA, Biochem J.
24. Das, B., Mondragon, M. O., Sadeghian, M., Hatcher, V. B. & Norin, A. J. (1994) A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines, J Exp Med. 180, 273-81.
25. Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W. & Pizzo, S. V. (1999) Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 2811-6.
26. Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Terce, F., Collet, X., Perret, B. & Barbaras, R. (2003) Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, Nature. 421, 75-9.
27. Cortes-Hernandez, P., Dominguez-Ramirez, L., Estrada-Bernal, A., Montes-Sanchez, D. G., Zentella-Dehesa, A., de Gomez-Puyou, M. T., Gomez-Puyou, A. & Garcia, J. J. (2005) The inhibitor protein of the F₁F₀-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells, Biochem Biophys Res Commun. 330, 844-9.

VIDA Y OBRA DEL MONÓMERO Y EL DÍMERO DE LA F₁F₀-ATP SINTASA MITOCONDRIAL Y DE SUS SUCURSALES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Resumen

La F₁F₀-ATP sintasa es el motor molecular más eficiente que ha diseñado la naturaleza para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. En mitocondrias, su funcionamiento lo controla una subunidad regulatoria (IF₁) que bloquea la rotación del cuello central de la enzima y los cambios catalíticos de las subunidades β cuando el gradiente de protones disminuye como ocurre en la isquemia. Además de este papel fundamental, el complejo F₁F₀ contribuye a darle forma a las crestas mitocondriales al dimerizarse y polimerizarse, incrementando la superficie membranal disponible para la fosforilación oxidativa. La dimerización de la enzima se logra por medio de algunas subunidades de F₀ como e y g. Por otro lado, también la IF₁ y posiblemente otras subunidades del cuello lateral contribuyen a estabilizar al dímero de la ATP sintasa al conectar las porciones F₁ de la enzima. Esta estabilidad es el blanco de las mutaciones humanas más severas que provocan miopatías mitocondriales y que se localizan en el gen ATP 6 de la subunidad 6 de esta enzima. Las mutaciones en ATP6 disminuyen la estabilidad del dímero y del monómero de la enzima y bloquean el paso de protones por el canal F₀; esto produce hiperpolarización y daño oxidativo mitocondrial crónico, y a esto se debe la severidad de estas mutaciones para la fisiología humana. Este conocimiento abre la pauta para nuevas estrategias de terapia génica para tratar estas enfermedades a nivel molecular. Por último, algunas de las subunidades de la enzima se exportan a la superficie de varios tipos celulares y funcionan como receptores a diferentes ligandos que regulan la angiogénesis y la homeostasis del colesterol, entre otros procesos. Algunas subunidades como la IF₁ y la β se localizan en la superficie celular sin formar un complejo estequiométrico como en la mitocondria. Falta resolver cuáles otras

subunidades de F_1 y F_0 se encuentran en la membrana de éste y otros tipos celulares, así como la biogénesis que las lleva a la membrana plasmática y los mecanismos de transducción de señales por el cual funcionan las subunidades de la ATP sintasa en la superficie celular.

Palabras clave: F_1F_0 -ATP sintasa, dímero, inhibidor IF_1 , crestas, ATP6, membrana plasmática.

Semblanza del Dr. José de Jesús García Trejo.



Nació en 1969 en México, D. F. Es Licenciado (1992), Maestro (1995) y Doctor en Investigación Biomédica Básica (1997) por la UNAM. Realizó una Estancia posdoctoral en el Institute of Molecular Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon, USA (1997-2000) y estancias como investigador visitante en el laboratorio del Prof. Roderick A. Capaldi en el Institute of Molecular Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon, USA y en el laboratorio del Dr. Jan-Willem Taanman, Royal Free Children Hospital, Londres, UK. Actualmente es Investigador Titular En Ciencias Biomédicas (nivel "E") en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología. Sus principales líneas de investigación son:

1. Estructura, regulación, mecanismo rotacional y evolución de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial y bacteriana.
2. Mecanismo molecular de cardiomiopatías humanas debidas a mutaciones en genes mitocondriales y nucleares.
3. Expresión ectópica de las subunidades de la ATP sintasa humana como receptores de membrana plasmática de varios tipos celulares

Su trabajo experimental se ha publicado en 20 artículos internacionales con aproximadamente 200 citas; ha publicado también 3 capítulos en libros internacionales y editado 1 más. En nuestro país ha publicado 3 artículos y un capítulo de libro. Es Investigador Nacional nivel 1 en el Sistema Nacional de Investigadores desde 1998, en el área de Ciencias Naturales especialidad en Bioquímica-Bioenergética. Ha dirigido 2 tesis de licenciatura y 1 de maestría y actualmente tiene 3 más en progreso, 2 de maestría y 1 de doctorado. Ha impartido e imparte diversos cursos en los posgrados de Ciencias, Ciencias Biomédicas, Bioquímica y Ciencias Médicas y Odontológicas de la UNAM.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

PROTEINAS DE PRION: DE LA PATOGÉNESIS A LA FUNCIÓN

Edward Málaga-Trillo y Gonzalo P. Solís
Departamento de Neurobiología del Desarrollo, Facultad de Biología
Universidad de Konstanz, 78457 Konstanz, Alemania
Edward.Malaga@uni-konstanz.de

Abstract

The prion protein (PrP) is a membrane-anchored glycoprotein normally present in all vertebrates. Under unusual circumstances, it can undergo structural transformation and become the sole constituent of prions, a unique class of infectious agent devoid of nucleic acid. Prions are the cause of a group of lethal neurodegenerative disorders that include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans and bovine spongiform encephalopathy (BSE) or "mad cow disease". Much is known about PrP's pathogenic properties; however, its natural role remains elusive despite extensive characterization of its biochemical and cellular properties. Here we review prion diseases and their molecular basis, as well as the evolution and function of prion proteins. We include work carried out in our laboratory, particularly our analysis of PrP loss-of-function phenotypes in the zebrafish and the heterologous expression of various vertebrate PrPs in zebrafish, mouse and Drosophila cells. Our data show that an evolutionarily conserved function of all vertebrate PrPs is the establishment of homotypic trans-interactions between neighboring cells, thus mediating cell contact formation and signaling via lipid rafts.

Keywords: prion proteins; transmissible spongiform encephalopathies; neurodegenerative diseases; species barrier; molecular evolution; zebrafish.

Introducción

Se denomina priones a las partículas infecciosas causantes de un grupo de enfermedades neurodegenerativas conocidas como "Encefalopatías Espongiformes Transmisibles" (EET). Todas las EETs descritas hasta ahora son mortales y afectan a mamíferos, comprometiendo al sistema nervioso luego de largos períodos de incubación que pueden llegar a durar años o incluso décadas. El término "prión" deriva del acrónimo "proin"

(proteinaceous infectious particle), y fue acuñado por Stanley B. Prusiner, ganador del premio Nobel 1997 por haber descubierto dichos patógenos. Uno de los aspectos más sobresalientes y controvertidos del trabajo de Prusiner fue su hallazgo de que, a diferencia de los virus y las bacterias, los priones son patógenos de naturaleza exclusivamente proteica. Por lo tanto, al ser entidades biológicas carentes de genoma y capaces de replicarse en ausencia de ácidos nucleicos, los priones parecían contradecir los dogmas de la biología moderna.

Prusiner también halló que los priones estaban compuestos de una sola proteína, conocida como “proteína de príon” (PrP) y codificada en el genoma del huésped. La PrP normalmente está presente en las membranas de neuronas y otros tipos celulares pero puede transformarse y asumir una estructura terciaria patogénica que es capaz de multiplicarse exponencialmente al entrar en contacto con PrP normales e inducir su transformación en cadena. La agregación de PrPs transformadas trae como consecuencia la formación de partículas infecciosas -priones- con propiedades altamente neurotóxicas. Así, el daño cerebral y neurodegeneración propias de las EETs están estrechamente ligados a desórdenes estructurales en las PrPs, los cuales pueden ser transmitidos por contagio, heredados, o incluso aparecer espontáneamente.

La biología de los priones está colmada de fenómenos fascinantes poco o nada comprendidos. A pesar de los numerosos avances en el estudio de estos enigmáticos agentes, aun no se ha hallado respuestas a muchas preguntas básicas como: ¿Cuáles son el origen y la función fisiológica de la PrP?, ¿Por qué se produce su conversión estructural?, ¿Cómo es que los agregados de PrP producen daño cerebral y neurodegeneración? ¿Son las propiedades patogénicas de las PrPs intrínsecas o fueron adquiridas durante la evolución? ¿Por qué algunas especies parecen ser más susceptibles a las EETs? En este artículo presentamos un resumen de los conocimientos disponibles acerca de las propiedades funcionales y patogénicas de la PrP.

EET (Encefalías Espongiformes Transmisibles)

Las enfermedades neurodegenerativas de priones han recibido mucha atención de la comunidad científica y del público en general, no sólo por su interés biológico sino también por sus consecuencias para la salud pública y la economía mundial. El nombre genérico de EETs incluye males tan diversos como el Kuru, el mal de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el síndrome de Gerstmann-Sträussler (GSS) y el insomnio fatal (FFI) en humanos, así como el scrapie en ovinos, el mal de las vacas locas (BSE) en bovinos y un número creciente de encefalopatías en felinos, cérvidos y ungulados [1, 2]. La epidemia de BSE (“mal de las vacas locas”) desatada en Gran Bretaña en 1986 significó la muerte de cerca de 200,000 reses [3, 4]. Existe la certeza que la enfermedad se propagó debido a un cambio en el proceso utilizado para preparar alimento para reses a partir de menudencias de rumiantes. Si bien es cierto que las estrictas medidas sanitarias impuestas por el gobierno británico en 1988 redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad, la epidemia causó estragos económicos y políticos en toda Europa. Es más, la aparición desde 1996 de nuevos casos de la “nueva variante” de CJD en Gran Bretaña y en Francia [5, 6] indican que la transmisión a humanos por consumo de carne de res contaminada continúa siendo un problema real [7, 8]. Otras situaciones de riesgo de CJD incluyen los contagios por trasplantes de duramadre, instrumentos quirúrgicos y quizás hasta a través de productos sanguíneos [9].

El síntoma primordial en los humanos es la demencia progresiva, que usualmente viene acompañada por disfunciones motoras como la ataxia cerebelar. En el caso de la FFI, también se observa disautonomía y disturbios del sueño. Los síntomas se manifiestan lenta y sutilmente en edades avanzadas pero siempre de manera destructiva, y pueden durar meses (CJD, FFI, Kuru) y hasta años (GSS), culminando invariablemente con la muerte [1]. Típicamente, las lesiones neuropatológicas observadas en EETs incluyen la degeneración espongiforme del cerebro y la deposición de placas amiloides (Fig. 1). Cabe notar que las EET tienen ciertos

aspectos clínicos, neuropatológicos y moleculares en común con otra conocida amiloidosis cerebral, el mal de Alzheimer [10].

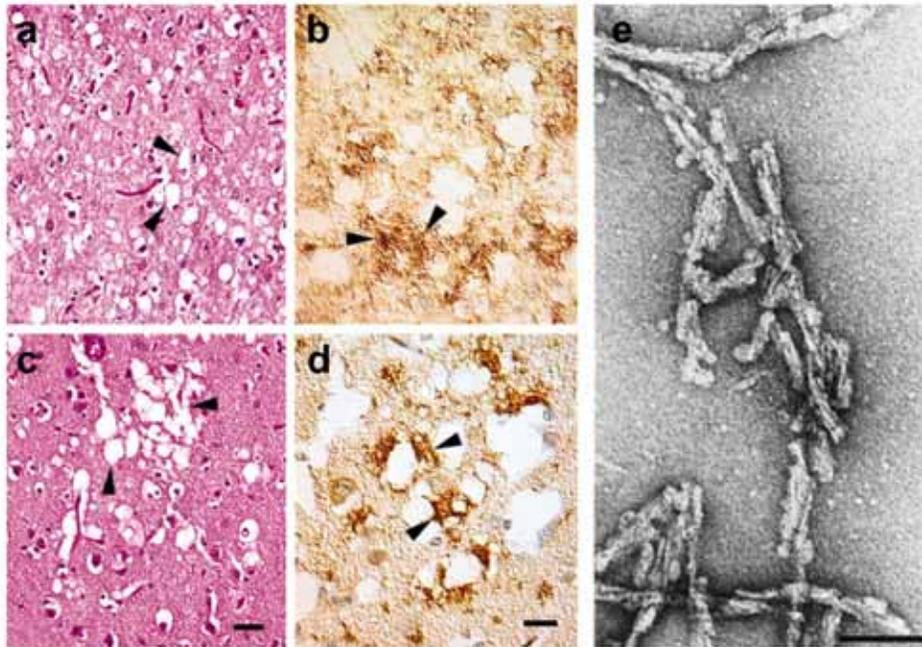


Figura 1. Lesiones espongiiformes y acumulación de placas características en CJD. Pruebas histológicas (a, c) e inmunohistoquímicas (b, d) de secciones de cerebro de dos pacientes con CJD. Las puntas de flecha apuntan a vacuolaciones (a, c) y a depósitos de PrP^{Sc} (b, d). Las fibras amiloides pueden ser teñidas negativamente y visualizadas usando microscopía electrónica (e). Tomado de [46, 104].

Dependiendo del origen de la infección, las EETs se clasifican generalmente en tres tipos: iatrogénicas (contagio por fuentes externas), familiar (mutaciones hereditarias del gen PrP), y esporádicas (conversión espontánea de la PrP o mutación somática de su gen). El contagio a través de la cadena alimenticia es la principal vía de transmisión entre especies distintas. Por ejemplo, se sabe que la nueva variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob en humanos (nvCJD) tuvo su origen en el agente responsable del BSE en bovinos [7, 8]. La probabilidad de este tipo de contagio depende principalmente de la predisposición genética del huésped y de la cantidad de material de riesgo ingerido. Durante la ingestión, los priones son captados en el intestino a través de las placas de Peyer, parte del llamado tejido linfático asociado a mucosa (MALT, por sus siglas en inglés). Luego de ser fagocitados, los priones circulan hacia otros tejidos linfáticos (como los nódulos linfáticos, el bazo y las amígdalas), donde al entrar en contacto con terminaciones nerviosas, pueden ser transportados retrógradamente por axones hasta la médula espinal y finalmente al cerebro. Así, el sistema linfático constituye la puerta de entrada de los priones al sistema nervioso [11, 12].

En las neuronas y la glia, los priones son internalizados por endocitosis y transportados a los lisosomas para su degradación. Es en estos compartimientos donde se produce el contacto entre la PrP transformada y la normal, induciendo la primera la transformación de la segunda de manera exponencial. La acumulación excesiva de priones en los lisosomas produce la ruptura de éstos, liberando al citosol su contenido de priones y proteínas hidrolíticas y provocando con ello

la lisis celular. Al quedar libres en el espacio extracelular, los priones se agregan y forman placas amiloides. El proceso se repite en las células adyacentes, creando agujeros en el tejido cerebral y confiriéndole a éste el aspecto esponjiforme característico de las EETs [1, 13-15].

La búsqueda del principio transmisible de la enfermedad es una historia de por sí interesante. La naturaleza infecciosa del scrapie, -mal neurológico caracterizado por el intenso prurito que obligaba a las ovejas afectadas a rascarse contra paredes y cercos, (del inglés scrape = rascar), fue demostrada por primera vez en 1939 al ser transmitido experimentalmente a cabras [16]. Durante los 1950s, Carleton Gajdusek describió el Kuru, una extraña enfermedad neurodegenerativa en una tribu aborigen de Nueva Guinea (los Fore), que era transmitida por canibalismo ritual [17]. La observación de William Hadlow acerca de las similitudes neuropatológicas entre el scrapie y el Kuru [18], finalmente llevó a la demostración experimental (por transmisión a primates) de que tanto el Kuru como el CJD son también males infecciosos [19]. Pattison [20] fue el primero en hacer notar que la transmisión de EETs entre especies distintas es limitada, lo cual se manifiesta en prolongados períodos de incubación aun entre especies muy cercanas como el ratón y el hámster [21].

A partir de los 1960s, las propiedades del agente infeccioso se convirtieron en un gran foco de atención. Sin embargo, no fue sino hasta dos décadas después que Stanley Prusiner propuso la hipótesis del prión [22], afirmando que el agente infeccioso de las encefalopatías esponjiformes carecía de ácidos nucleicos y estaba exclusivamente compuesto por un sólo tipo de proteína, llamada PrP^{Sc} ("PrP scrapie"). Más adelante se demostró que PrP^{Sc} era en realidad la forma alterada de una proteína codificada por el huésped, llamada PrP^C ("PrP celular") [23, 24]. Se propuso entonces que PrP^{Sc} era capaz de "imprimir" a PrP^C su conformación anormal, generando así moléculas adicionales de PrP^{Sc} en una reacción autocatalítica [25-28]. Por ello, las enfermedades de priones ejemplifican un novedoso mecanismo patogénico basado en cambios conformacionales proteicos capaces de autopropagarse. La identificación de proteínas de comportamiento similar en levaduras [29, 30] y hongos filamentosos [31] sugiere que la herencia de información biológica a través de conformaciones proteicas es un fenómeno bastante más generalizado de lo que se cree.

Las enfermedades de priones son únicas porque pueden ser contraídas por contagio pero también heredadas. Cerca del 10% de los casos de CJD, así como todos los casos de GSS y FFI están ligados a mutaciones en el gen PrP, en el cromosoma 20 [32, 33], usualmente inserciones en la mitad N-terminal y mutaciones puntuales en la mitad C-terminal de la PrP. Se cree que estas mutaciones favorecen la conversión espontánea de PrP^C en PrP^{Sc} sin necesidad de entrar en contacto con agentes infecciosos externos [25]. Es más, se ha propuesto que la predisposición genética a padecer nvCJD radica en el codón 129 del gen PrP: Individuos homocigotos para Metionina en este codón (M/M 129) serían susceptibles a nvCJD, mientras que individuos homocigotos para Valina (V/V 129) o heterocigotos (M/V 129) serían relativamente resistentes a la infección [34]. Si bien las EETs hereditarias aparecen espontáneamente como resultado de mutaciones en el gen de PrP, también pueden ser transmitidas a animales de laboratorio, lo cual confirma que la mutación induce la formación de priones infecciosos. Las formas esporádicas de EET, incluyendo la mayoría de casos de CJD, no presentan etiologías infecciosas o genéticas obvias y son por lo tanto atribuidas a la conversión espontánea de PrP^C en PrP^{Sc}, o a la presencia de mutaciones somáticas en la proteína que favorecen su conversión [25].

Bases moleculares de las EETs

Las PrPs son glicoproteínas unidas a la membrana celular por medio de un ancla GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). Contienen tres regiones distintivas: Un dominio repetitivo N-terminal, de estructura flexible y rico en repeticiones cortas; una región central hidrofóbica altamente conservada; y un dominio globular C-terminal, de estructura más estable y compuesto por tres

hélices α y dos hojas β -plegadas [35]. Luego de su procesamiento -que incluye la remoción de la secuencia líder N-terminal, glicosilación, formación de puente disulfuro y la adición del ancla GPI- la proteína madura de PrP consiste de aproximadamente 200 aminoácidos (aa).

Quizás la característica más llamativa de las PrPs es su capacidad de cambiar significativamente de estructura tridimensional, produciendo dos conformaciones diferentes: La PrP normal o “celular” (PrP^{C}), cuya estructura contiene 47% de hélices α y 3% de hojas β -plegadas, y la patológica o “scrapie” (PrP^{Sc}), compuesta en 17-30% de hélices α y 43-54% de hojas β -plegadas (Fig. 2) [36-38]. Es importante destacar que las formas PrP^{C} y PrP^{Sc} son la misma proteína, es decir, están codificadas por el mismo locus genético y comparten la misma secuencia de aminoácidos (estructura primaria). La diferencia entre ambas reside más bien en su estructura secundaria y terciaria (conformación espacial), al haber experimentado la PrP^{Sc} un cambio en el plegamiento respecto de la forma celular PrP^{C} . Como consecuencia de este plegamiento, la forma scrapie también difiere de la celular por su alto contenido en hojas β -plegadas, su insolubilidad en detergentes, resistencia a la proteólisis y propensión a agregarse. La transformación de las formas nativas es inducida al entrar en contacto con partículas PrP^{Sc} infecciosas. De este modo, se pone en marcha una reacción en cadena y la infección crece exponencialmente. Si bien el proceso descrito ocurre de manera autocatalítica, también se ha propuesto que la transformación puede ser asistida por una hipotética “Proteína X” [39, 40].

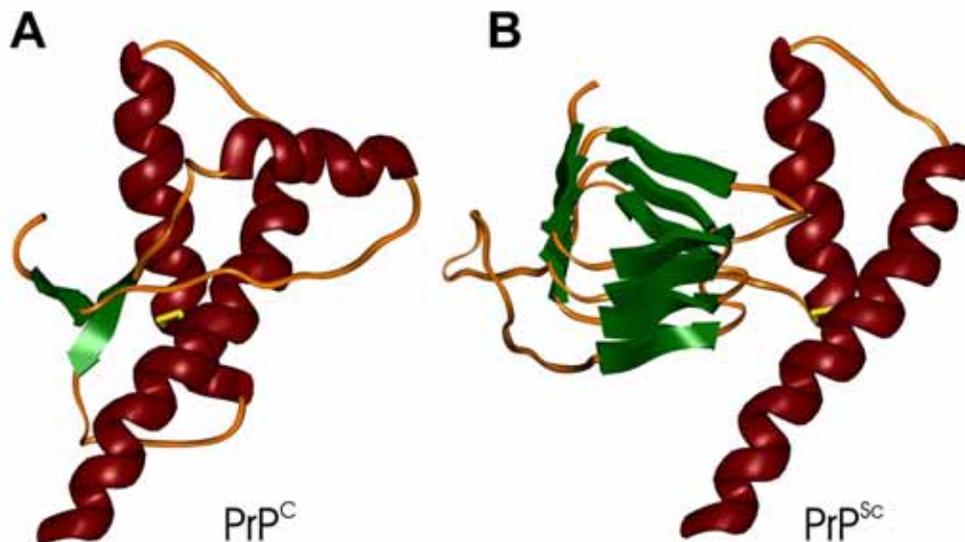


Figura 2. Modelos de la estructura 3D de la proteína de príon. A) La forma celular de PrP (PrP^{C}) es rica en hélices- α y presenta un bajo contenido de hojas β -plegadas. B) La forma asociada con la enfermedad, llamada PrP scrapie (PrP^{Sc}), presenta una mayor cantidad de hojas β -plegadas. Tomado de [105].

La región comprendida entre los residuos 90-112 ha sido implicada en la transformación del PrP^{C} en PrP^{Sc} [41]. Sin embargo, resulta curioso que las mutaciones causantes de las enfermedades de príon hereditarias se localizan a lo largo de toda la proteína. En estudios de transmisión con transgenes quiméricos de hámster/ratón y humano/ratón, se logró identificar un dominio entre los residuos 95-170 donde el PrP^{C} se uniría al PrP^{Sc} [42, 43]. Posteriormente, se

identificó un segundo dominio entre los residuos 180-205, que parece modular la interacción entre PrP^C y PrP^{Sc} [44]. Otra de las técnicas utilizadas para investigar los dominios patogénicos del prion consiste en crear mutantes de delección de PrP [45]. De este modo se halló que la remoción de cualquiera de las tres hélices α previene la formación del PrP^{Sc}. Por el contrario, al suprimir la región N-terminal entre los residuos 23-89, así como otros 36 residuos entre las posiciones 141-176, no se afecta a la aparición de PrP^{Sc}. La molécula truncada resultante, de 106 aa, fue denominada PrP106 y tiene propiedades idénticas a las de la PrP^{Sc} completa. Al ser de menor tamaño, ofrece ventajas experimentales para el estudio de su estructura.

La transmisión interespecífica de una enfermedad prión depende de que el prión patógeno del donante sea suficientemente similar a la proteína prión huésped como para poder unirse a ella e inducirle el plegamiento anómalo [46]. El grado de compatibilidad de ambas proteínas determina el tiempo de incubación de la enfermedad (meses, años, décadas). Si las PrP son compatibles (como entre bovinos y humanos), no existe barrera de transmisión. Como mejor se transmite la enfermedad (menor tiempo de incubación), es entre animales de la misma especie. Esta "barrera interespecífica" fue descubierta por Pattison en los años 1960s [47]. La causa de la barrera interespecífica es la evolución independiente de genes PrP con distintas secuencias según las especies. Por ejemplo, el gen PrP de ratón difiere del de hámster en 16 de 254 codones; y el de ratón del de humano en 28 codones. Estos genes codifican proteínas PrP cuyas secuencias de aminoácido difieren mínimamente, pero lo suficiente como para interferir con el reconocimiento entre PrP^C y PrP^{Sc}. En consecuencia, cuanto más parecidas sean las secuencias PrP^{Sc} infecciosa y PrP^C del huésped, más probable será que el huésped se pueda contagiar. Por ejemplo, ratones transgénicos que expresan la PrP de hámster son, a diferencia de ratones silvestres, altamente susceptibles a infección con priones de hámster Sc237 [48]. Del mismo modo, el hecho de que muchos casos de CJD -tanto esporádicos como adquiridos- se hayan producido en individuos homocigotos en el codón polimórfico 129 apoyan la idea que la propagación de los priones procede de manera más eficiente cuando las PrP^C y PrP^{Sc} involucradas tienen estructura primaria idéntica [49, 50]. Sin embargo, se reconoce que la transmisión entre especies distintas también depende del tipo de cepa de prión, el cual a su vez parece depender del grado de glicosilación de las PrPs en cuestión. Por ejemplo, la transmisión de CJD a ratones silvestres es muy difícil [51, 52], pero 100% efectiva a ratones transgénicos que expresan el gen PrP humano [51]; sin embargo, en el caso del vCJD, la transmisión a ratones silvestres es mucho más eficiente que a ratones transgénicos, o sea, se observa el efecto contrario [53]. Por lo tanto, se han sugerido términos más apropiados como "barrera interespecífica-intercepa" o simplemente "barrera de transmisión", dado que tanto la secuencia de aminoácido como el tipo de cepa afectan la estructura tridimensional de la PrP, la cual a su vez afecta la eficiencia de las interacciones proteína-proteína que determinan la propagación de los priones [2].

Las PrP de mamíferos están fuertemente conservadas. Se piensa que sólo un número limitado de conformaciones de PrP^{Sc} ("conformaciones preferidas") son lo suficientemente estables termodinámicamente como para poder ser propagadas y observadas. Es probable que los estados de glicosilación de la PrP sean importantes para la estabilización de conformaciones PrP^{Sc}. Si bien es cierto que debe existir un número elevado de posibles conformaciones PrP^{Sc}, es posible que solo un subconjunto de conformaciones preferidas exista en cada especie de mamífero. Por ello, la transmisión se produciría de manera rápida sólo si las dos especies en cuestión coinciden sustancialmente en sus conformaciones preferidas. En el caso contrario, la transmisión entre dos especies sin ninguna conformación preferida en común se hace improbable. Según este modelo de barrera de transmisión, el BSE representaría una conformación termodinámicamente muy estable de PrP^{Sc} que resultaría altamente permisiva para las conformaciones de PrP expresadas en un amplio rango de especies distintas. Esto explicaría la extraordinaria promiscuidad de esta cepa en mamíferos. Es probable que factores o cofactores adicionales aun no identificados contribuyan al establecimiento de las barreras interespecíficas [2].

Origen y evolución de las PrPs

Al ser una condición necesaria para el desarrollo de las EETs, la existencia de genes y proteínas de príon ha sido examinada en muchas especies animales [54-60]. Hoy sabemos que las PrPs están presentes en todas las clases de vertebrados pero ausentes en invertebrados [58]. Por lo tanto, el origen de las PrPs se remonta por lo menos a unos 300 millones de años, en un ancestro común de los vertebrados. Su ausencia en invertebrados invita a especular que las PrPs hayan aparecido de la mano con procesos evolutivos distintivos de los vertebrados, como la cefalización. La comparación de secuencias de aminoácidos de PrPs de mamíferos, aves, reptiles y peces revelan un escenario evolutivo muy complejo: las PrPs están fuertemente conservadas *dentro* de cada clase de vertebrados, pero son muy divergentes *entre* clases distintas (Fig. 3). Por ejemplo, los porcentajes de similitud de secuencia entre PrPs de peces y mamíferos son de 30% en promedio [55, 57, 60]. Sin embargo, todas las PrPs conocidas comparten la misma arquitectura de dominios y contienen motivos similares [55, 61-65] (Fig. 4A), lo cual refleja la conservación de una función biológica importante.

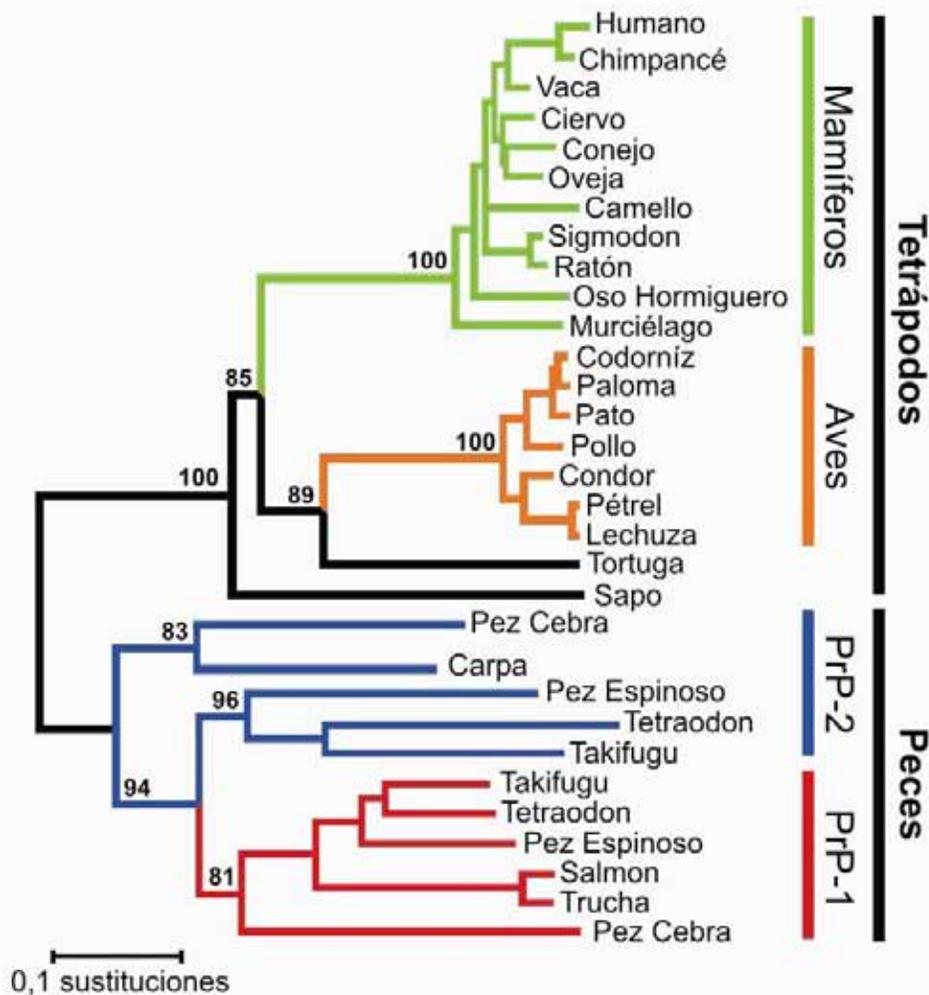


Figura 3. Evolución molecular del dominio globular de la proteína de príon en vertebrados. Modificado de [64].

Tradicionalmente se ha considerado a las PrPs como proteínas altamente conservadas [54, 66]. Sin embargo, esta observación se basaba en análisis parciales que sólo tomaban en cuenta secuencias de PrPs de mamíferos. Un análisis comparativo más completo, incluyendo a otras clases de vertebrados, revela más bien niveles altos de variación de secuencia, de peces a mamíferos [64]. Además, un examen detallado permite reconocer patrones mutacionales claramente distintos en los dominios repetitivo y globular de las PrPs. El hecho de que estas regiones hayan evolucionado como módulos independientes sugiere que la función de las PrPs requiere de por lo menos dos actividades biológicas distintas [64].

Por un lado, el dominio N-terminal ha experimentado cambios drásticos a lo largo de su evolución. En mamíferos, esta región se describía como compuesta de cinco repeticiones del octapéptido PHGGGWGQ, las cuales por contener un residuo de histidina, han sido relacionadas con una importante función asociada a la unión con moléculas de cobre [67, 68]. Al analizar las secuencias de otros vertebrados, observamos que si bien todas las PrP contienen repeticiones en la mitad N-terminal, las unidades repetitivas difieren notablemente en longitud y secuencia, siendo prácticamente inalineables entre distintas clases de vertebrados [55, 64]. Al reevaluar las secuencias de mamíferos, hemos encontrado que éstas contienen en realidad dos tipos de repeticiones: los octapéptidos antes descritos (redefinidos por nosotros como repeticiones tipo "B", de secuencia: WGQPHGGG), y un nuevo tipo de repeticiones (tipo "A", de secuencia: XRYPXQGS GGG) (Fig. 4B). Estos dos tipos de repeticiones (A y B) sí están representados en las PrPs de todos los vertebrados, pero en proporciones distintas, lo cual dificulta su reconocimiento. Así, cada clase de vertebrado posee un número característico y bastante conservado de repeticiones A y B (Fig. 4C). Por ejemplo, los mamíferos son los únicos vertebrados en los que se observa más repeticiones B que A; todos los otros vertebrados contienen un mayor número de repeticiones A que B. Dado que las repeticiones suelen evolucionar por expansión y contracción (inserción y delección sucesiva de unidades repetitivas), se infiere que el ancestro común de los vertebrados debió poseer una PrP con una repetición de cada tipo, y que durante el transcurso de la evolución, las repeticiones experimentaron expansiones y contracciones específicas dentro de cada clase de vertebrado. Si se considera la alta divergencia de secuencia en este dominio, es poco probable que las repeticiones o su unión a cobre contribuyan de manera fundamental a la función biológica de la PrP, sobretodo si se toma en cuenta que la gran mayoría de las repeticiones de vertebrados no mamíferos no contienen residuos de histidina.

El dominio C-terminal también presenta un patrón de evolución molecular intrincado [64]. Si bien existe gran variabilidad de secuencias entre clases de vertebrados, las diferencias están distribuidas desigualmente a lo largo del dominio: En los segmentos de importancia estructural (hélices α y hojas β -plegadas), las sustituciones están limitadas a aminoácidos que no alteran la estructura secundaria del dominio; por el contrario, en las asas que interconectan estas regiones (a modo de espaciadores) las sustituciones parecen ocurrir con mayores grados de libertad, observándose además inserciones y delecciones de tamaño considerable. De este modo, a pesar de las altas tasas de mutación, el dominio globular ha mantenido su conformación tridimensional gracias a un patrón de selección natural que permitió la evolución rápida de sus secuencias sin alterar sus características estructurales (Fig. 4D). La persistencia evolutiva de esta estructura globular en todos los vertebrados indica que el dominio globular alberga una función biológica muy importante y conservada. Por otro lado, el alto grado de variabilidad de secuencias entre clases de vertebrados podría indicar la aparición de especializaciones funcionales de la PrP en cada clase.

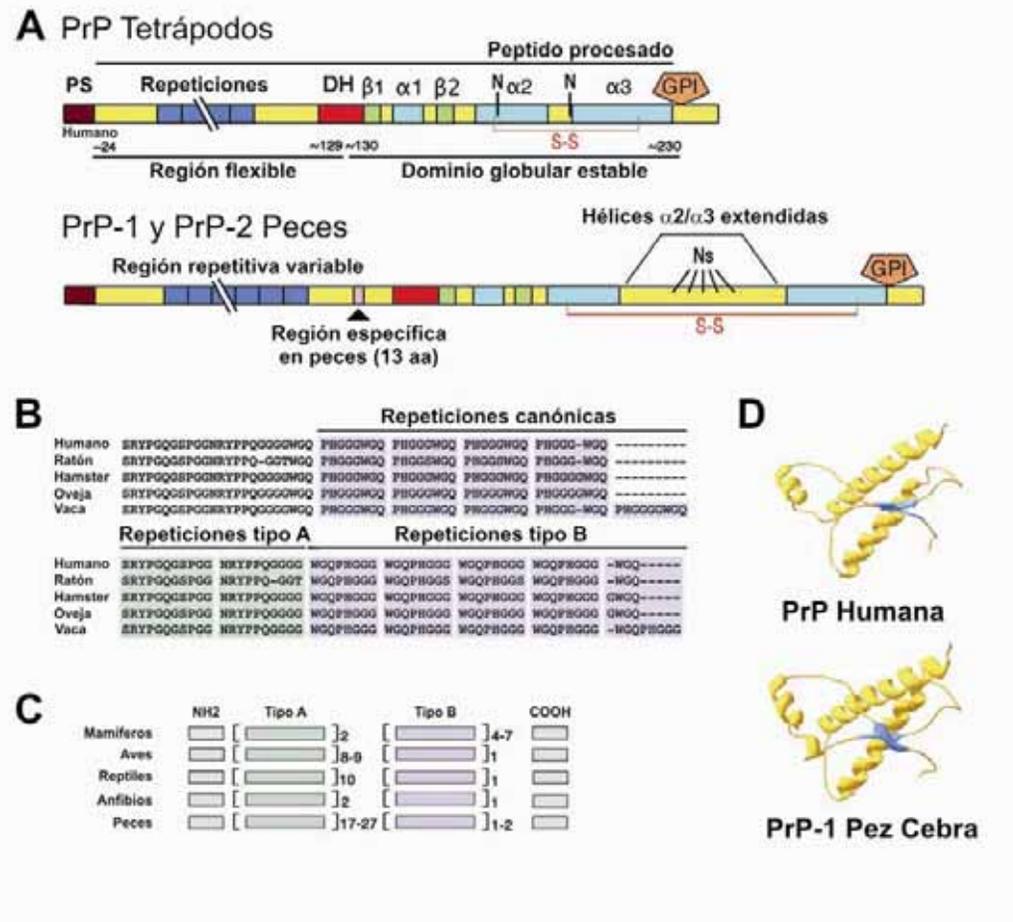


Figura 4. Dominios estructurales de la proteína de príon. A) Distribución de los motivos característicos de PrP en tetrápodos y peces. PS = péptido señal; pentágonos de color naranja = anclaje-GPI; N = sitios de N-glicosilación; y S-S = puentes disulfuros. Interrupciones en la región repetitiva indican variaciones en la cantidad de repeticiones en el dominio. B) Redefinición de las repeticiones canónicas del dominio repetitivo. La nueva definición incluye dos diferentes tipos; repeticiones de tipo A y B. C) Frecuencia relativa de las repeticiones de tipo A y B entre las distintas clases de vertebrados. D) Estructura 3-D de la proteína de príon humana y la predicción de PrP-1 del pez cebra. Modificado de [64].

Como ya se mencionó anteriormente, se conoce la existencia de priones en levaduras [69, 70]. Sin embargo, estas proteínas de príon no son homólogas ni en secuencia ni en estructura con las PrPs, sino que sólo comparten con ellas la capacidad de alterar su conformación y de “replicarse” en ausencia de ácidos nucleicos. Se piensa que los priones de levaduras y de vertebrados podrían utilizar los mismos mecanismos de conversión y agregación; por ello, constituye un reto el comprender cómo dos proteínas sin parecido estructural o funcional pueden tener comportamientos anómalos tan similares.

Función biológica de las PrP

Una de las cuestiones más escurridizas de la biología de los priones es la función normal de la PrP. En mamíferos, la forma PrP^C es expresada durante el desarrollo embrionario temprano y también en la mayoría de tejidos adultos [64, 71-73]. Sin embargo, se observan los

niveles más altos de expresión en el sistema nervioso, particularmente asociado a membranas sinápticas [74, 75]. La PrP también se expresa profusamente en células del sistema inmune [76]. Siendo una glicoproteína con anclaje en la membrana celular, se ha especulado que podría cumplir roles en adhesión celular [77, 78] o en procesos de señalización celular [79], pero su función exacta ha permanecido hasta ahora oculta. Otros roles propuestos para la PrP incluyen: neurogénesis [80, 81], interacción ligando-receptor [82, 83], metabolismo de cobre [84], estrés oxidativo [85, 86], apoptosis [87], y activación de linfocitos [88, 89]. Sin embargo, estos roles no convergen en un mecanismo molecular común que explique la función de PrP.

Dado el rol causal que cumple la PrP en la neurodegeneración, se esperaría obtener efectos dramáticos al producir animales carentes de ella. Por ello resulta sorprendente que ratones homocigotos para alelos nulos de PrP -ratones knockout- se desarrollen y comporten aparentemente de manera normal [90]. Dichos ratones son completamente resistentes a los priones y no propagan infectividad [91, 92]. Utilizando técnicas electrofisiológicas en secciones de hipocampo, se halló que los ratones knockout de PrP presentan deficiencias mínimas en la inhibición sináptica mediada por GABA_A, y en la potenciación a largo plazo [74, 93]; sin embargo, estos resultados no han sido fáciles de reproducir [94]. En todo caso, el hecho de que este fenotipo se pueda revertir mediante la expresión inducida de PrP humana indica que se trata de un efecto específico de la PrP [95]. Tales anomalías en la inhibición sináptica son reminiscentes de las anomalías neurofisiológicas observadas en pacientes de CJD y en ratones infectados con scrapie [96], sugiriendo la posibilidad de que la neurodegeneración inducida por priones se deba por lo menos en parte a la pérdida de función de PrP más que a un efecto deletéreo de la PrP^{Sc} [74]. La relativa normalidad de los ratones knockout de PrP, que no desarrollan neurodegeneración progresiva, podría deberse a cambios adaptativos durante el desarrollo del sistema nervioso. Es posible que en un sistema nervioso de menor plasticidad, la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} tenga consecuencias más severas. Curiosamente, la PrP^{Sc} parece no ser tóxica en células carentes de PrP^C [97]; además, la forma PrP^{Sc} es muy difícil de detectar en algunos casos de FFI [98] y en ratones transgénicos infectados experimentalmente con FFI [99], lo cual sugiere que, al menos en estos casos, la neurodegeneración podría no ser un efecto tóxico de la PrP^{Sc}. Según este modelo, la ganancia de función que implica el modo de herencia autosomal dominante sería un reflejo de la formación de PrP^{Sc}, la cual agotaría funcionalmente a la PrP^C por medio de un efecto dominante negativo. Otros fenotipos sutiles han sido descritos en ratones knockout de PrP, incluyendo anomalías del ritmo circadiano [100], degeneración de células cerebelares de Purkinje [101], y disfunciones neurofisiológicas en el hipocampo [102]. Sin embargo, la base molecular de estos fenotipos es incierta, y es posible que la variabilidad de los efectos observados se deba en parte al fondo genético de los ratones utilizados en cada estudio.

Durante los últimos 14 años, la falta de fenotipos claros en ratones knockout de PrP se ha convertido en un gran obstáculo para el análisis funcional de esta proteína, suscitando la pregunta de si su enigmática función es necesaria o dispensable para el organismo. Por ello es crucial llevar los estudios funcionales sobre PrP a otros modelos animales. Por ejemplo, nosotros venimos obteniendo resultados positivos utilizando el pez cebra (*Danio rerio*) para comprender mejor la función de la PrP. Este pequeño teleosteo es uno de los modelos preferidos en genética del desarrollo de vertebrados debido a las múltiples ventajas experimentales que ofrece [103]: prole numerosa, período de reproducción corto, fertilización y desarrollo externos, transparencia de los embriones, fácil manipulación genética, y sobretodo la posibilidad de producir knockouts temporales (knockdowns) por medio de la microinyección de antiRNAs modificados (morfolinos) que bloquean la traducción del RNAm. El genoma del pez cebra contiene dos copias del gen PrP, que codifican dos proteínas, PrP-1 y -2, homólogas a las PrPs de mamíferos [64]. Sus patrones de expresión espacio-temporales difieren durante el desarrollo pero juntos recapitulan el patrón conocido en mamíferos: mientras que la PrP-1 es expresada ubicuitamente en estadios tempranos de blástula y gástrula, la PrP-2 es expresada en estadios más tardíos y exclusivamente en neuronas en diferenciación, especialmente en el cerebro (Málaga-Trillo y cols., en revisión). Los bloqueos knockdown de PrP-1 y PrP-2 producen

fenotipos de pérdida de función muy severos que concuerdan con sus patrones de expresión: Mientras que el knockdown de PrP-1 resulta letal hacia el principio de la gastrulación (Fig. 5a-b), el de PrP-2 causa defectos morfológicos tardíos en la formación del cerebro, viéndose afectadas tanto la proliferación como la diferenciación neuronal (Fig. 5g-l). Estos constituyen los primeros fenotipos claros de pérdida de función de PrP (Málaga-Trillo y cols., en revisión). La letalidad del fenotipo PrP-1 puede ser revertida expresando RNAm para PrP-1, -2, y sorprendentemente, también PrP de ratón (Fig. 5d-f), indicando que las PrPs de mamíferos y peces comparten actividades biológicas importantes para el desarrollo embrionario. La diferencia entre los efectos de pérdida de función en el pez cebra y el ratón resulta difícil de comprender. Sin embargo, hay que tomar en cuenta las diferencias técnicas entre ambos sistemas: mientras que en el caso del ratón knockout, el gen PrP es físicamente eliminado del genoma, en el pez cebra el gen permanece intacto y es transcrito, siendo bloqueada su expresión mediante el uso de moléculas complementarias de RNA que impiden a los ribosomas la traducción del mensaje PrP. Es posible que en el ratón, la falta del gen PrP sea compensada por mecanismos genéticos regulatorios; en el pez cebra, estos mecanismos no se activarían porque el gen es normalmente replicado y transcrito.

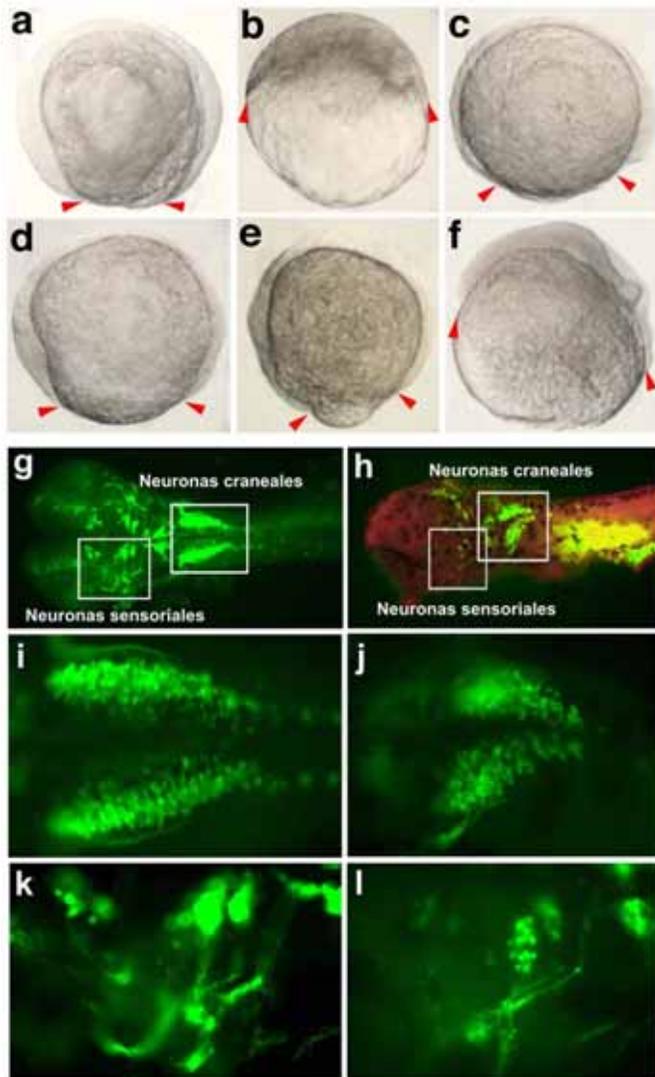


Figura 5. La pérdida de la función de la proteína de prión produce claros fenotipos en el pez cebra. Un embrión normal después de la gastrulación (a); la pérdida de la función de PrP-1 conlleva a un arresto letal en el desarrollo (b), mientras que la ausencia de la función de PrP-2 no produce fenotipo en este estadio (c). El fenotipo letal producido por la pérdida de la función de PrP-1 puede ser revertido por la expresión inducida de PrP-1 (d), PrP-2 (e) or PrP de ratón (f). La ausencia de la función de PrP-2 produce efectos tardíos en el desarrollo de estructuras neurales. Vistas dorsales del mesencéfalo y telencéfalo en un pez transgénico (g), en el cual las neuronas están marcadas con una proteína verde fluorescente (i, neuronas craneales y k, neuronas sensoriales). El fenotipo observado por la pérdida de la función de PrP-2 (h) se caracteriza por la disminución en el número y el grado de diferenciación de las neuronas (j, neuronas craneales y l, neuronas sensoriales).

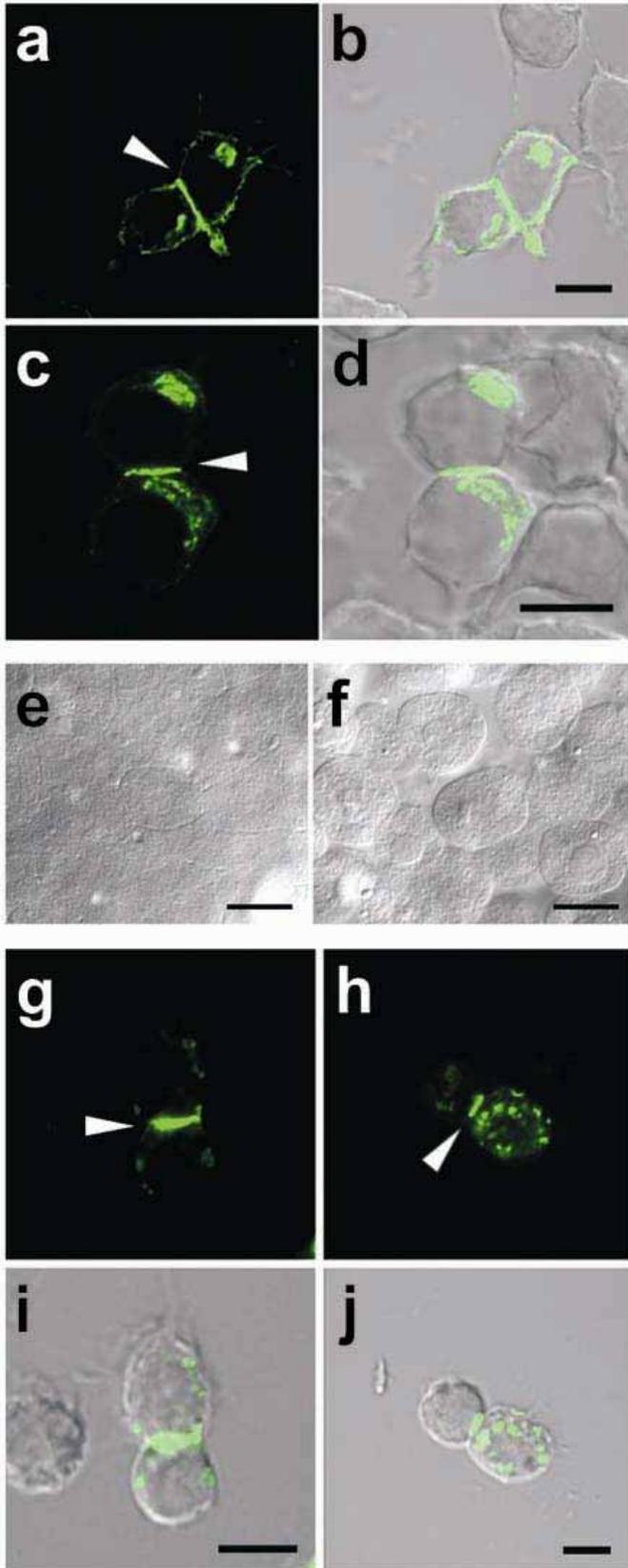


Figura 6. La proteína de príon induce contactos celulares. Cuando PrP de ratón (a, b) o de pez cebra (c, d) son expresadas en células N2a (neuroblastoma de ratón) se acumulan en contactos celulares, sugiriendo que su función involucra una interacción molecular que facilita la comunicación celular. Antes de producirse el arresto previo a la gastrulación en embriones de pez cebra donde se ha perdido la función de PrP-1, se observa una notoria pérdida de la adhesión celular (e) comparado con el embrión normal (f). En las células Schneider-2 (S2) de *Drosophila melanogaster* (un modelo celular no adherente usado para el estudio de moléculas de adhesión), la expresión de PrP de ratón (g, i) o de pez cebra (h, j) induce la formación de contactos celulares y la acumulación de la proteína de príon en los mismos.

Al expresar constructos fluorescentes de PrPs de pez cebra y de ratón en células neuronales de ratón observamos que ambas PrPs se acumulan fuertemente en los contactos celulares (Fig. 6a-d), fenómeno que también ocurre cuando se expresan los mismos constructos en embriones de pez cebra. El hecho de que la acumulación de PrP se produzca sólo en contactos entre células que expresan el constructo implica que las PrP son capaces de interactuar homotípicamente en *trans* (Málaga-Trillo y cols. en revisión). Al reexaminar los contactos celulares en embriones knockdown de PrP-1, notamos que la muerte de los embriones se produce por la pérdida de adhesión en los blastocitos, indicando que la interacción de PrPs en *trans* en los contactos celulares es crucial para mantener las células adheridas unas a otras (Fig. 6e-f). Además, utilizando células no-adherentes de *Drosophila* demostramos que la interacción en *trans* de las PrPs es suficiente para inducir adhesión y señalización celular (Fig. 6g-j) (Málaga-Trillo y cols. en revisión). La importancia de estas funciones, evidente por su conservación en todos los vertebrados y por la letalidad de los fenotipos PrP del pez cebra, apoya la idea de que la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} produciría un efecto de pérdida de función, que culminaría con la muerte celular debido al cese de una señal protectora o al encendido de una señal tóxica para la célula (Fig. 7). Cada vez resulta más evidente que las características funcionales y las propiedades patogénicas de la PrP son probablemente dos caras de la misma moneda.

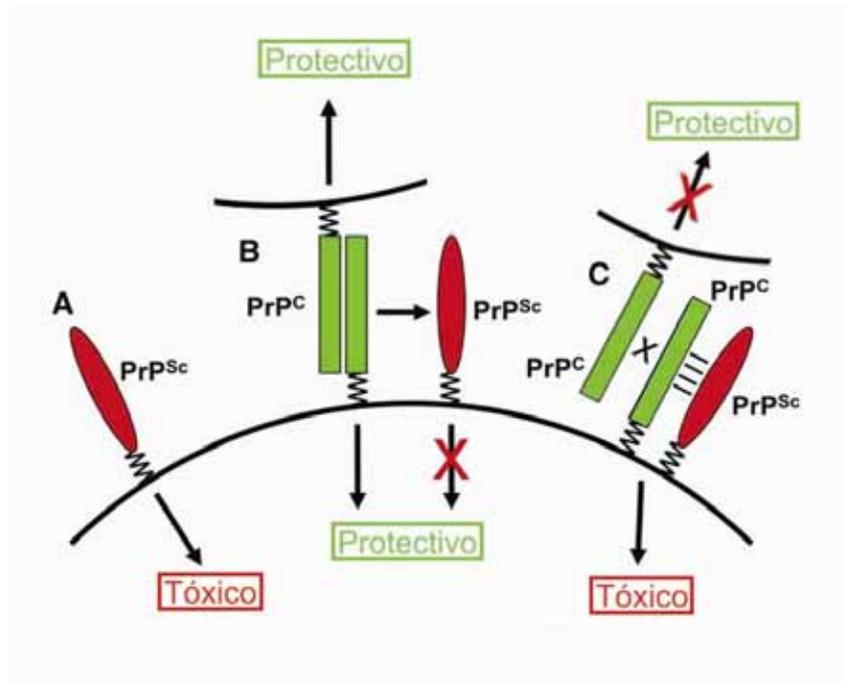


Figura 7. Modelos para la toxicidad celular de PrP^{Sc}. A) Actividad tóxica de PrP^{Sc} que es independiente de la función normal de PrP^C. Este escenario parece poco probable debido a los recientes estudios de Chesebro y cols. [106], que demuestran que la presencia de PrP^{Sc} por sí sola no induce neurotoxicidad *in vivo*. B) PrP^C posee una actividad normal, fisiológicamente activa, que induce neuroprotección mediada por la interacción en *trans* con otra PrP^C de una célula vecina. Esta actividad se pierde por la conversión a PrP^{Sc}. Este modelo sugiere un rol esencial en la protección celular para PrP^C que sería avalado por nuestros estudios mostrando que la falta de PrP^C en embriones de pez cebra es letal. C) La interacción en *cis* entre PrP^C y PrP^{Sc} desencadena una actividad neurotóxica. Simultáneamente, la interacción entre PrP^C-PrP^{Sc} compite con la interacción normal en *trans* con otra PrP^C, bloqueando la señal neuroprotectora y potenciando el efecto tóxico. Esta última posibilidad sería avalada por los estudios de Solfrosi y cols. [107] que sugieren que una posible interacción entre PrP^{Sc} y PrP^C en la membrana plasmática induciría apoptosis de neuronas *in vivo*.

Conclusiones

Debido a su relación causal con las encefalopatías espongiformes transmisibles, la PrP es una de las proteínas mejor estudiadas y caracterizadas a nivel estructural y bioquímico. Sin embargo, sus propiedades patogénicas aun están lejos de ser comprendidas del todo. Cuestiones básicas como la naturaleza de la conversión estructural, la replicación de los priones, y la especificidad del daño neuronal necesitan ser esclarecidos en detalle. Para ello, es necesario conocer mejor la función que la PrP desempeña en situaciones fisiológicas normales, no patológicas. Hasta ahora, esta función ha sido muy difícil de elucidar debido a la falta de fenotipos claros de pérdida de función en ratones de laboratorio y en sistemas de cultivo celular. Sin embargo, el uso de modelos animales alternativos ofrece nuevas posibilidades: por ejemplo, utilizando embriones de pez cebrá y células de *Drosophila* estamos obteniendo resultados significativos que revelan un rol fundamental de las PrPs durante el desarrollo embrionario, generando interacciones moleculares que determinan viabilidad y diferenciación celular. Será muy importante integrar la información obtenida de los distintos modelos animales y celulares para lograr una perspectiva evolutiva que nos permita comprender las propiedades patogénicas de los priones a partir de la evolución funcional de la PrP.

Agradecimientos

Las investigaciones de nuestro grupo son financiadas por la Fundación Alemana para la Ciencia, la Plataforma para el Investigación de Priones del Estado de Baden-Württemberg, y la Universidad de Konstanz.

Referencias

1. Harris, D. A. (1999) Clin Microbiol Rev **12**, 429-44
2. Collinge, J. (2001) Annu Rev Neurosci **24**, 519-50
3. Prusiner, S. B. (1997) Science **278**, 245-51
4. Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. y Wells, G. A. (1996) Nature **382**, 779-88
5. Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C., Blatter, T., Aguzzi, A. y Kopp, N. (1996) Lancet **347**, 1181
6. Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. y Smith, P. G. (1996) Lancet **347**, 921-5
7. Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. y Bostock, C. J. (1997) Nature **389**, 498-501
8. Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. and Hill, A. F. (1996) Nature **383**, 685-90
9. Brown, P., Rohwer, R. G., Dunstan, B. C., MacAuley, C., Gajdusek, D. C. y Drohan, W. N. (1998) Transfusion **38**, 810-6
10. Price, D. L., Borchelt, D. R. y Sisodia, S. S. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A **90**, 6381-4
11. Mabbott, N. A. y MacPherson, G. G. (2006) Nat Rev Microbiol **4**, 201-211
12. Aguzzi, A. (2003) Adv Immunol **81**, 123-171
13. Prado, M. A., Alves-Silva, J., Magalhaes, A. C., Prado, V. F., Linden, R., Martins, V. R. y Brentani, R. R. (2004) J Neurochem **88**, 769-81
14. Harris, D. A. (2003) Br Med Bull **66**, 71-85
15. Aguzzi, A. y Heppner, F. L. (2000) Cell Death Differ **7**, 889-902
16. Cuille, J. y Chelle, P. L. (1939) CR Seances Acad Sci **208**, 1058-1060
17. Gajdusek, D. C. y Zigas, V. (1957) N Engl J Med **257**, 974-978
18. Hadlow, W. J. (1959) Lancet **ii**, 289-290

19. Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. y Alpers, M. (1966) *Nature* **209**, 794-6
20. Pattison, I. H. (1966) *Res Vet Sci* **7**, 207-12
21. Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., y DeArmond, S. J. (1989) *Cell* **59**, 847-57
22. Prusiner, S. B. (1982) *Science* **216**, 136-44
23. Horwich, A. L. y Weissman, J. S. (1997) *Cell* **89**, 499-510
24. Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. and Cohen, F. E. (1998) *Cell* **93**, 337-48
25. Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. y Prusiner, S. B. (1994) *Science* **264**, 530-1
26. Come, J. H., Fraser, P. E. y Lansbury, P. T., Jr. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5959-63
27. Gajdusek, D. C. (1994) *Mol Neurobiol* **8**, 1-13
28. Hope, J., Morton, L. J., Farquhar, C. F., Multhaup, G., Beyreuther, K. y Kimberlin, R. H. (1986) *Embo J* **5**, 2591-7
29. Kushnirov, V. V. y Ter-Avanesyan, M. D. (1998) *Cell* **94**, 13-6
30. Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 495-8
31. Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. y Begueret, J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9773-8
32. Parchi, P. y Gambetti, P. (1995) *Curr Opin Neurol* **8**, 286-93
33. Prusiner, S. B. y Hsiao, K. K. (1994) *Ann Neurol* **35**, 385-95
34. Goldfarb, L. G. (2002) *Microbes Infect* **4**, 875-82
35. Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. y Dyson, H. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13452-7
36. Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. y Caughey, W. S. (1991) *Biochemistry* **30**, 7672-80
37. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., y Cohen, F. E. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-6
38. Jackson, G. S., Hill, A. F., Joseph, C., Hosszu, L., Power, A., Waltho, J. P., Clarke, A. R. y Collinge, J. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1431**, 1-13
39. Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. y Prusiner, S. B. (1995) *Cell* **83**, 79-90
40. Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. y Prusiner, S. B. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10069-74
41. James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B. y Cohen, F. E. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10086-91
42. Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J. y Prusiner, S. B. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9936-40
43. Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. y Prusiner, S. B. (1993) *Cell* **73**, 979-88
44. Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. y Prusiner, S. B. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14279-84
45. Scolnick, E., Rands, E., Aaronson, S. A. y Todaro, G. J. (1970) *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1789-96
46. Prusiner, S. B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-83
47. Pattison, I. H. y Jones, K. M. (1967) *Vet Rec* **80**, 2-9
48. Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., y Carlson, G. A. (1990) *Cell* **63**, 673-86
49. Collinge, J., Palmer, M. S. y Dryden, A. J. (1991) *Lancet* **337**, 1441-2
50. Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T. y Collinge, J. (1991) *Nature* **352**, 340-2
51. Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J. y Lantos, P. L. (1995) *Nature* **378**, 779-83

52. Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. y Lantos, P. (1997) *Nature* **389**, 448-50, 526
53. Hill, A. F., Antoniou, M. y Collinge, J. (1999) *J Gen Virol* **80** (Pt 1), 11-4
54. Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. y Schatzl, H. M. (1999) *J Mol Biol* **289**, 1163-78
55. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. y Malaga-Trillo, E. (2003) *Trends Genet* **19**, 72-5
56. Windl, O., Dempster, M., Estibeiro, P. y Lathe, R. (1995) *Gene* **159**, 181-6
57. Suzuki, T., Kurokawa, T., Hashimoto, H. y Sugiyama, M. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 912-7
58. Strumbo, B., Ronchi, S., Bolis, L. C. and Simonic, T. (2001) *FEBS Lett* **508**, 170-4
59. Simonic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Ceciliani, F. y Ronchi, S. (2000) *FEBS Lett* **469**, 33-8
60. Oidtmann, B., Simon, D., Holtkamp, N., Hoffmann, R. y Baier, M. (2003) *FEBS Lett* **538**, 96-100
61. Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Guntert, P. y Wuthrich, K. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*
62. Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fiorito, F. y Wuthrich, K. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*
63. Calzolari, L., Lysek, D. A., Perez, D. R., Guntert, P. y Wuthrich, K. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*
64. Rivera-Milla, E., Oidtmann, B., Panagiotidis, C. H., Baier, M., Sklaviadis, T., Hoffmann, R., Zhou, Y., Solis, G. P., Stuermer, C. A. y Malaga-Trillo, E. (2006) *Faseb J* **20**, 317-9
65. Billeter, M., Riek, R., Wider, G., Hornemann, S., Glockshuber, R. y Wuthrich, K. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7281-5
66. Schatzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. y Prusiner, S. B. (1997) *J Mol Biol* **265**, 257
67. Millhauser, G. L. (2004) *Acc Chem Res* **37**, 79-85
68. Morante, S., Gonzalez-Iglesias, R., Potrich, C., Meneghini, C., Meyer-Klaucke, W., Menestrina, G. y Gasset, M. (2004) *J Biol Chem* **279**, 11753-9
69. Wickner, R. B. (1994) *Science* **264**, 566-9
70. Lacroute, F. (1971) *J Bacteriol* **106**, 519-22
71. Harris, D. A., Lele, P. y Snider, W. D. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4309-13
72. Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H. y Hope, J. (1992) *Development* **115**, 117-22
73. Cotto, E., Andre, M., Forgue, J., Fleury, H. J. and Babin, P. J. (2005) *Febs J* **272**, 500-13
74. Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. y Jefferys, J. G. (1994) *Nature* **370**, 295-7
75. Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. y DeArmond, S. J. (1986) *Am J Pathol* **122**, 1-5
76. Dodelet, V. C. y Cashman, N. R. (1998) *Blood* **91**, 1556-61
77. Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. y Prusiner, S. B. (2001) *J Mol Biol* **314**, 1209-25
78. Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I. y Schachner, M. (2005) *J Cell Biol* **169**, 341-54
79. Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. y Kellermann, O. (2000) *Science* **289**, 1925-8
80. Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S. y Schachner, M. (2003) *Mol Cell Neurosci* **22**, 227-33
81. Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S. y Macklis, J. D. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3416-21
82. Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I. y Weiss, S. (1997) *Nat Med* **3**, 1383-8
83. Fischer, M. B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H. P. y Aguzzi, A. (2000) *Nature* **408**, 479-83

84. Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. y Kretzschmar, H. (1997) *Nature* **390**, 684-7
85. Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. y Kretzschmar, H. A. (1997) *Exp Neurol* **146**, 104-12
86. Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. y Jones, I. M. (1999) *Biochem J* **344 Pt 1**, 1-5
87. Kurschner, C. y Morgan, J. I. (1995) *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 165-8
88. Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. y Bendheim, P. E. (1990) *Cell* **61**, 185-92
89. Stuermer, C. A., Langhorst, M. F., Wiechers, M. F., Legler, D. F., Von Hanwehr, S. H., Guse, A. H. y Plattner, H. (2004) *Faseb J* **18**, 1731-3
90. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. y Weissmann, C. (1992) *Nature* **356**, 577-82
91. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. y Weissmann, C. (1993) *Cell* **73**, 1339-47
92. Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. y Weissmann, C. (1994) *Cell* **77**, 967-8
93. Manson, J. C., Hope, J., Clarke, A. R., Johnston, A., Black, C. y MacLeod, N. (1995) *Neurodegeneration* **4**, 113-4
94. Lledo, P. M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. y Nicoll, R. A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2403-7
95. Whittington, M. A., Sidle, K. C., Gowland, I., Meads, J., Hill, A. F., Palmer, M. S., Jefferys, J. G. y Collinge, J. (1995) *Nat Genet* **9**, 197-201
96. Jefferys, J. G., Empson, R. M., Whittington, M. A. y Prusiner, S. B. (1994) *Neurobiol Dis* **1**, 25-30
97. Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. y Aguzzi, A. (1996) *Nature* **379**, 339-43
98. Medori, R., Montagna, P., Tritschler, H. J., LeBlanc, A., Cortelli, P., Tinuper, P., Lugaresi, E. y Gambetti, P. (1992) *Neurology* **42**, 669-70
99. Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Gowland, I., Medori, R., Ironside, J. y Lantos, P. (1995) *Lancet* **346**, 569-70
100. Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. y Manson, J. C. (1996) *Nature* **380**, 639-42
101. Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. y Noda, T. (1996) *Nature* **380**, 528-31
102. Colling, S. B., Collinge, J. y Jefferys, J. G. (1996) *Neurosci Lett* **209**, 49-52
103. Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C. y Nusslein-Volhard, C. (1996) *Development* **123**, 1-36
104. Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., Miller, B. L., DeArmond, S. J. y Prusiner, S. B. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3501-3506
105. Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. y Cohen, F. E. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8342-8347
106. Chesebro, B., Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E. y Oldstone, M. (2005) *Science* **308**, 1435-1439
107. Solfrosi, L., Criado, J. R., McGavern, D. B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, E., Gilden, D., Oldstone, M. B., Conti, B. y Williamson, R. A. (2004) *Science*

**PROTEINAS DE PRION:
DE LA PATOGÉNESIS A LA FUNCIÓN**

Resumen

*La proteína de príon (PrP) es una glicoproteína de membrana normalmente presente en todos los vertebrados. Bajo circunstancias inusuales, la PrP puede experimentar una transformación estructural y convertirse en el constituyente único de los priones, peculiares agentes infecciosos que carecen de ácidos nucleicos. Los priones son la causa de un grupo de desórdenes neurodegenerativos que incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) en humanos y la encefalopatía espongiforme bovina o "mal de las vacas locas". Se sabe mucho acerca de las propiedades patogénicas de la PrP; sin embargo, a pesar de la detallada caracterización de sus propiedades celulares y bioquímicas, su función natural es aun desconocida. En este artículo, revisamos las enfermedades de priones y sus bases moleculares, así como la evolución y función de las proteínas de príon. Se incluye trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio, en especial nuestro análisis de los fenotipos de pérdida de función de PrP en el pez cebra y la expresión heteróloga de PrPs de diversos vertebrados en células de pez cebra, ratón y *Drosophila*. Nuestros resultados muestran que una función evolutivamente conservada de todas las PrPs de vertebrados es el establecimiento de interacciones trans homotípicas entre células adyacentes, mediando así la formación de contactos celulares y la señalización por medio de balsas lipídicas.*

Palabras clave: proteínas de príon; encefalopatías espongiformes transmisibles; enfermedades neurodegenerativas; barrera interespecífica; evolución molecular; pez cebra.

Semblanza del Dr. Edward Málaga Trillo.



Nació en Lima, Perú, el 6 de junio de 1969. Estudió Biología y Medicina en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Hizo su doctorado en Microbiología e Inmunología en la Escuela de Medicina de la Universidad de Miami, USA, y en el Instituto Max Planck para Biología en Tübingen, Alemania. Luego de una estancia postdoctoral en el Departamento de Biología Evolutiva de Universidad de Konstanz, Alemania, asumió su plaza actual en la misma universidad como Profesor Asistente del Departamento de Neurobiología del Desarrollo. Ha sido recientemente designado Profesor Principal e Investigador en el Centro de Investigación en Ciencias Biomédicas de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). Realizó especializaciones adicionales en el Instituto de Acuicultura, Universidad de Stirling, Escocia, en el Departamento de Ciencias Biosistemáticas de la Universidad de Postgrado para Estudios Avanzados de Hayama, Japón, en el Instituto de Neurociencia de la Universidad de Oregon, Eugene, USA, y en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA. Es miembro asesor del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú, del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), miembro de la Comisión Científica y Tecnológica Internacional, III Perú, y asesor de la International Fishmeal and Fish Oil Organization. Sus investigaciones están orientadas a comprender las propiedades funcionales de las proteínas de príon y su relación con las enfermedades neurodegenerativas de priones, así como las bases moleculares de la regeneración neuronal.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

HABÍA UNA VEZ UN GEN...LA DRAMÁTICA HISTORIA EVOLUTIVA DE LA FAMILIA DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN PRIMATES

Hugo A. Barrera Saldaña, Elva Aréchiga, Iram Rodríguez y Rafael González
Laboratorio de Ciencias Genómicas y Bioinformática
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León
Fco. I Madero y E. Aguirre Pequeño, Mitras Centro, Monterrey, N. L., 64460, México.
hbarrera@fm.uanl.mx

Abstract

During the evolution of vertebrates, the growth hormone (GH) locus has stayed basically without change, except for some minor changes in artiodactiles and fish (they have an extra copy of the gene). But surprisingly and suddenly this locus suffered dramatic change in primates. This is our contribution to the description and understanding of these extraordinary changes without precedent.

All our findings start to delineate the evolutionary pathway(s) that the GH locus has followed in primates and sustain the preexistent idea that this locus has been expanded by different recombination events. Once we get the complete locus structure we are going to be able to elucidate the pattern of these recombination events.

With the analysis of these loci, their genes and intergenic regions, we will have the possibility of inferring the evolutionary events that gave place to this multigenic family, and we will identify the forces and mechanisms involved.

We still need to understand the consequences or causes of this expansion and loci divergence, which could be based on several physiological, reproductive, and anatomic aspects that can be as obvious as those that differentiate an animal that looks like a squirrel, such as the prosimians, from the antropomorphic image of apes.

Keywords: Growth Hormone Locus, Molecular evolution in primates.

La familia multigénica

Al conjunto de genes que surgen de la duplicación de un gen ancestral y que comparten una similitud nucleotídica de al menos el 50%, se le conoce como familia génica (Barsh y cols., 1983). Sus miembros generalmente integran un grupo en un locus cromosomal y las proteínas que codifican tienen funciones similares o relacionadas, además de ser capaces de expresarse en diferentes momentos o en distintos tipos celulares. Las diferencias nucleotídicas de relevancia entre los miembros de una misma familia son aquellas que se concentran en sus regiones codificantes y regulatorias. Existen ejemplos de familias en las cuales la diferenciación aparece en ambas regiones, siendo mayor en genes con funciones disímiles, como lo son genes con diferente especificidad tisular de su expresión.

La gran familia GH

Dentro de las familias multigénicas con diferencias en especificidad tisular de la expresión de sus miembros, destaca la de los genes de la hormona del crecimiento (referida aquí como GH por sus siglas del inglés, lo que también aplica al resto de las hormonas incluidas en esta revisión). Interessantemente, en primates esta familia también incluye a los genes del lactógeno placentario (PL), recientemente rebautizado como somatomotropina coriónica (CSH). Aunque ya no en el mismo locus, pero sí por su similitud en mayor o menor grado estructural y funcional, esta familia también abarca a los genes de la prolactina (PRL), la proliferina (PLF), proteínas relacionadas a prolactina (PRP), proteínas semejantes a prolactina (PLP) y la somatolactina (SL), por lo que en este sentido amplio, la familia resulta extensa (Fig. 1).

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

CSH-1      -MAPGS-----RTSLLLAfallclpwlqeagavqtvplsrlfdhamlqahrahql 49
GH-1      -MATGS-----RTSLLLAfGllclpwlqegsafptiplsrlfdnamlrahrlhql 49
PRL       MNIKGSPWKGSLLLLVSNLLLCQSVAPLPICPGGAARCOVTLRDLFDRAVVLSHYIHNL 60
          **      :.***. .: **      .:*      :.*      ***.***: :* **

CSH-1      AIDTYQEFEEYIPKDKYSFLHDSQTSFCFSDSIPTPSNMEETQQKSNLELLRISLLLI 109
GH-1      AFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLI 109
PRL       SSEMFSFDFKRYTHGRG---FITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSIL 116
          : : :.***: *      . : :      . * :.***.***: **:** .: :*: : : :

CSH-1      ESWLEP----VRFLRSMFANNLVYDTSDDYHLLKDLEEGIQLMGRLEDGSRRTGQIL 165
GH-1      QSWLEP----VQFLRSVFNANLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQLMGRLEDGSPRTGQIF 165
PRL       RSWNEPLYHLVTEVRGMQEAPEAILSKAVEIEEQTKRLLLEGMELIVSQVHPETKENEIYP 176
          .** **      * :*. :      . : .      . * * ** : : :. : . : .

CSH-1      KQTYSKFDTNSHNHDA LLKNYGLLYCFRKMDKVF TFLRMVQCRSVEGSCGF 217
GH-1      KQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMDKVF TFLRIVQCRSVEGSCGF 217
PRL       VWSGLPSLQMADEESRLSAYNLLHCLRRDSHKIDNYLKLKCR IHNHNC- 227
          :      :. . . . *      * .***:**:** * .***: :.***:*** : . . .
    
```

Figura 1. Similitud entre miembros de la familia GH de humanos. Los asteriscos marcan las similitudes. CSH=somatomotropina coriónica, GH= Hormona de crecimiento, PRL= Prolactina.

Mientras que en la mayoría de los vertebrados la GH está codificada por uno o a lo más un par de genes, es en los primates donde experimenta una dramática evolución, misma que es el motivo central de nuestras actuales investigaciones. Ello se suma a otros atributos tales como traslape y diferenciación de funciones, surgimiento de las CSHs en dos ocasiones a nivel de la escala evolutiva —en roedores aún se les refiere como PLs y se postula que se derivaron del gen de la prolactina, mientras que en los primates lo hicieron del de la GH—, y expresión diferencial en al menos dos tejidos. Consecuentemente, la familia GH en primates constituye un

modelo ideal para estudios de evolución de la relación estructura-función y del origen de los mecanismos moleculares que subyacen en la expresión diferencial de los miembros de una familia génica.

Estructura y función del locus GH en humanos

El locus GH en el humano consta de cinco genes localizados en el brazo largo del cromosoma 17 (17q24.2). Estos genes se encuentran orientados en la misma dirección transcripcional en el orden: 5´-(hGH-N»CSH-1»CSH-2»hGH-V»CSH-3)-3´. A pesar de que sus unidades transcripcionales no ocupan más de 2 kb (para un total de 10 kb), las regiones que las separan (regiones intergénicas) aportan dos ~6 kb cada una y las otras dos ~13 kb también cada una, para abarcar una región genómica de aproximadamente 50 kb en total. Estos genes presentan una alta similitud en su secuencia nucleotídica (aproximadamente 95%), así como en su estructura, representada por cinco exones interrumpidos por cuatro intrones (Barrera y cols., 1982).

Además de en sus promotores, en las regiones intergénicas se encuentran elementos reguladores (potenciadores e inhibidores) que en conjunto circunscriben la expresión del primer gen del locus (hGH-N) a la hipófisis y la del resto a la placenta (Chen y cols., 1989; Golos y cols., 1993). En este sentido, el gen hGH-N codifica para la GH hipofisiaria, mientras que el gen hGH-V lo hace para la GH variante expresada en la placenta. Se ha descrito que esta última reemplaza a la primera en la sangre materna durante el embarazo. Los genes CSH-2 y CSH-3 se expresan en el sinciotrofoblasto de la placenta e interesantemente codifican ambos para una misma CSH madura (Barrera y cols., 1983). El gen CSH-1 parece ser un pseudogen (Resendez y cols., 1990) (Fig. 2).

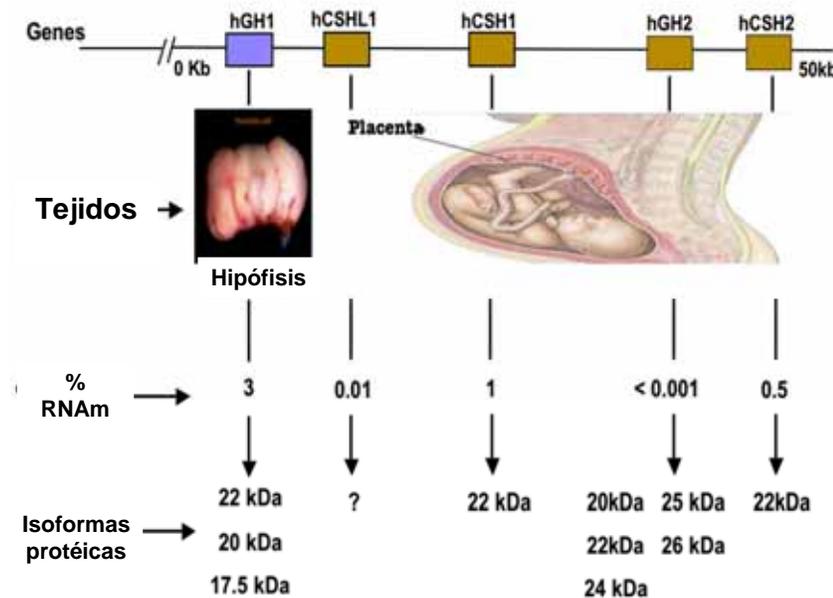


Figura 2. Potencial codificador del locus GH del genoma humano. Dos genes GHs producen cerca de la mitad de las proteínas como resultado del procesamiento diferencial de los transcritos primarios y modificaciones postraduccionales de las proteínas. Sorpresivamente, tres genes CSHs contribuyen únicamente a una proteína madura idéntica.

La dramática historia evolutiva del gen GH en primates

Existe evidencia que sugiere que el locus GH experimentó una muy rápida evolución en los primates, reflejada en tanto la expansión del número de genes, como su diferenciación, pasando así de un solo gen en prosimios a una media docena en grades monos. Se ha sugerido también que dicha diferenciación ocasionó que sus miembros acumularan sustituciones aminoacídicas que dieron pie al surgimiento a las dos otras hormonas arriba mencionadas: la GH y la CSH, ambas placentarias. Finalmente, de que en este proceso, los loci también experimentaron expansión a causa del incremento en la longitud de las regiones que separan a cada gen miembro del locus, es decir las regiones intergénicas. Dado que los eventos de duplicación, recombinación o posiblemente transposición que participaron en la adquisición de la especificidad tisular aún no han sido explicados, nuestro trabajo abarca también este otro reto.

Genómica comparativa del locus GH en primates

En nuestro laboratorio hemos sumado a nuestros trabajos previos en GHs (Barrera-Saldaña, 1998), el estudio de la evolución de esta interesante familia génica, siendo nuestro abordaje la genómica comparativa, es decir la descripción detallada de la estructura del locus GH en los diferentes órdenes de primates. Para ello escogimos cuando menos una especie de cada grupo de los primates. A saber, de los prosimios escogimos al lemur, de los monos del nuevo mundo (MNM) al mono araña (*Ateles geoffroyi*), de los monos del viejo mundo (MVM) al mono rhesus (*Macaca mulata*), y de los grandes simios al chimpancé (*Pan troglodytes*).

Para el análisis echamos mano de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas del inglés) y de iniciadores de secuencias consenso, es decir derivada de las regiones más conservadas de las escasas secuencias génicas de GHs de primates descritas con anterioridad. Con esta técnica, fuimos capaces de amplificar genes, así como regiones intergénicas de los loci de los monos en estudio. Cabe señalar que la amplificación de estas últimas regiones fue posible debido a una innovación nuestra en la técnica de la PCR: la inversión de la dirección de los oligonucleótidos en combinación con el uso de la PCR larga. De esta forma se generaron amplificaciones de regiones intergénicas que se traslapaban con los extremos de los genes, lo que nos permitió armar el rompecabezas con las que estamos siendo capaces de inferir la composición y organización de los loci en cada especie en estudio (Fig. 3).

Las regiones génicas e intergénicas del locus GH

Ahora sabemos que hubo un salto evolutivo desde el tronco del árbol filogenético de los primates: de prosimios a MNM se pasó de un gen a ocho genes. Sin embargo, aunque se creció dramáticamente en el número de genes, el locus en sí no abarca más que el del humano. Esto debido a que en dichos monos las regiones intergénicas son más cortas. Por ejemplo, en el mono araña, el locus está compuesto de seis genes separados por regiones intergénicas de 3.5 kb.

En el siguiente escalón evolutivo, de MNM a MVM, se aprecian dos fenómenos realmente intrigantes. Primero, varias de las copias de los nuevos genes adquiridos en el paso anterior (expansión de uno a seis genes) se transformaron en genes del tipo CSH. Segundo, las regiones intergénicas también crecieron, pasando de 3.5 kb a dos tamaños nuevos: 6 y 13 kb.

También resulta intrigante el hecho de que dentro de los MVM aparece la versión placentaria de la GH, pues al comparar un par de especies de este grupo, nos topamos con la sorpresa de que una posee y la otra no, este misterioso nuevo miembro de la familia. Finalmente, a pesar de que el número de genes es similar en los MVM y el chimpancé, un buen número de

las duplicaciones que generaron los genes en estos dos grupos parecen haber sido independientes.

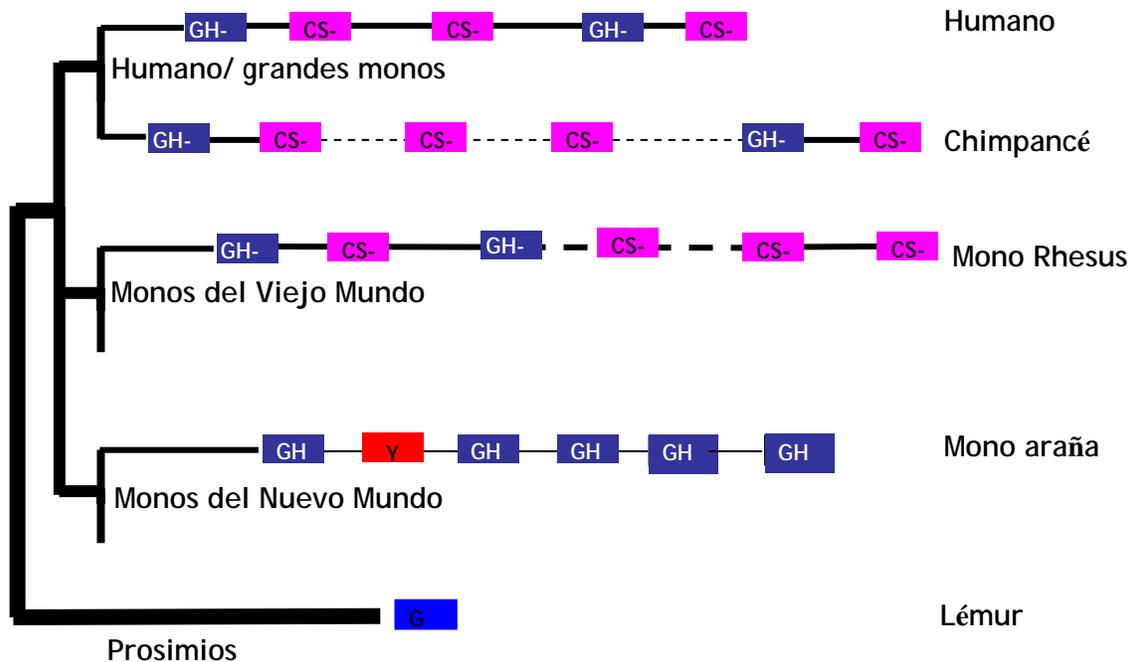


Figura 3. Descifrando la evolución del locus GH en primates. Mientras los monos del Nuevo mundo tienen únicamente genes del tipo GH en sus *loci*, los de los monos del viejo mundo y los grandes monos incluyen genes CSH. Las líneas en guiones representan las regiones intergénicas parcialmente secuenciadas, mientras que las punteadas a aquellas faltantes.

Elementos reguladores de la expresión génica diferencial tisular

A la par del estudio de los genes y su arreglo genómico, en nuestro laboratorio se ha venido investigando la presencia de los principales elementos reguladores en las regiones intergénicas de los loci de las diferentes especies de monos. Empezamos escudriñando dichas regiones mediante la hibridación con sondas marcadas radioactivamente (técnica del Southern blot). El estudio se centró, aparte de en los promotores génicos, en dos de los principales reguladores que encierran la clave hasta cierto punto del patrón de especificidad tisular que exhiben los miembros del complejo multigénico del locus GH del humano: el *inhibidor* que suprime la expresión de los genes placentarios en la hipófisis (conocido como elemento-P) y el *potenciador* que la estimula en la placenta (Barrera-Saldaña, 1998) (Fig. 4).

De los resultados anteriores se puede inferir que de los seis genes del MVM, el primero del locus (GH-N) es candidato a ser el único activo en la hipófisis, mientras que para los otros genes se asume que son expresados en la placenta. Esto ha sido verificado por investigadores de otros laboratorios para el caso del macaco (Golos y cols., 1993), única especie donde se había estudiado a la fecha el perfil de expresión de los miembros de esta familia génica. Trabajos recientes también de nuestro laboratorio, han permitido clonar ya los transcritos

derivados de la familia GH en el papión, lo que será dado a conocer en breve, coincidiendo en parte con el perfil de expresión revelado en el macaco.

El potenciador debió haber aparecido después de la divergencia de los MNM y los MVM (aproximadamente 45 millones de años atrás). Esto se cree debido a que en los MNM como el mono araña solo se evidenció la presencia del elemento P (Revol y cols, 2001), por lo cual resulta de sumo interés el determinar la expresión tejido específica de sus genes, experimento actualmente en curso en nuestro laboratorio. Por el contrario, las regiones intergénicas de los *loci* de las especies de los MVM que han sido estudiadas tienen ambas secuencias, por lo que es posible asumir que la expresión de sus miembros está gobernada por los mismos mecanismos de control que los descritos para el *locus* humano (Barrera-Saldaña, 1998).

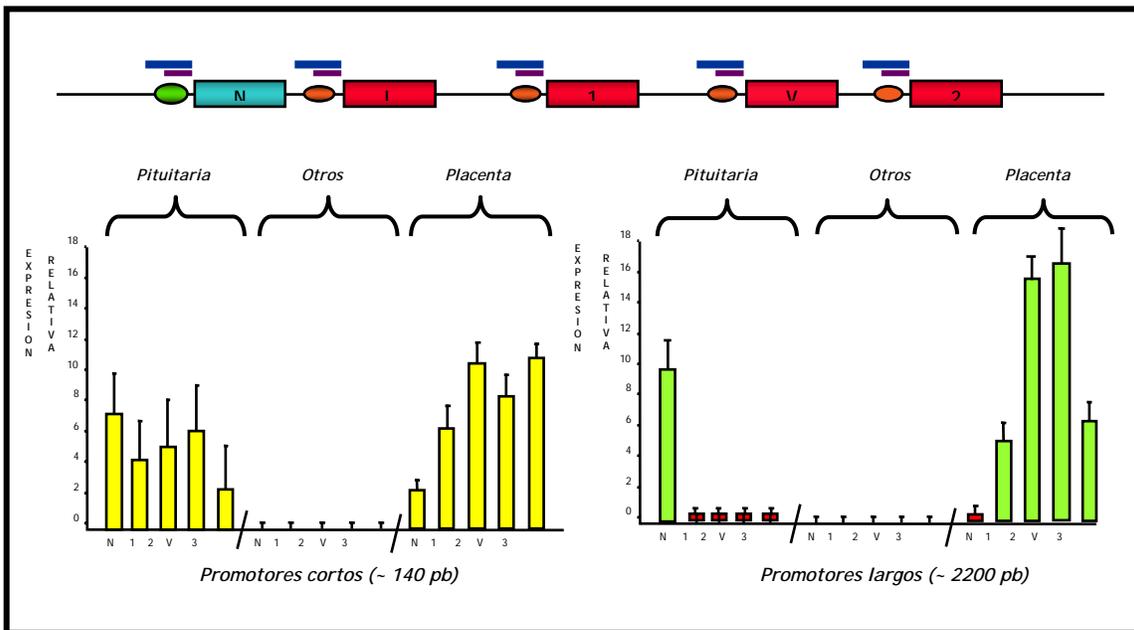


Figura 4. Avances en la regulación génica. Estudios por transfección de las diferentes versiones de los promotores (cortos y largos), revelan que la familia génica es regulada por la presencia en la hipófisis del activador (Pit-1) en el gen hGH-N y el represor (elemento P) en el resto de genes. En contraste, en la placenta el activador y el represor no existen, pero otros activadores (Sp1, potenciadores e iniciadores) activan el resto de genes.

Nuestros análisis de las secuencias de los promotores de los genes GHs y CSHs de las diferentes especies de primates en estudio en nuestro laboratorio, revelan que los principales elementos reguladores se encuentran conservados (Revol y cols., 2001). Por lo tanto se puede inferir que los mecanismos básicos de la regulación genética se asemejan entre MVM, gandes monos y el humano.

Mecanismos de evolución

La secuenciación parcial, principalmente de los genes, en contraposición a las extensas regiones intergénicas, de este locus en unos cuantos proyectos aislados sobre estudios del mismo en especies de primates, permitió comenzar a descifrar el proceso evolutivo que ha

venido moldeando la composición y organización del locus a lo largo del árbol filogenético de los primates.

Para acelerar este proceso, nuestro laboratorio inició el estudio sistemático de clonación, ensamblaje y secuenciación de los genes y regiones intergénicas de loci GHs de especies representativas de los diferentes grupos de primates, desde prosimios, hasta gandes monos. La identificación de varios elementos repetidos de la familia Alu, todos localizados en las regiones intergénicas, junto con el análisis de regiones de similitud, han permitido delinear las posibles unidades o bloques de duplicación subgenómica (Chen y cols., 1989).

En una primera hipótesis que buscaba explicar la posible vía que se siguió en la evolución del locus GH desde prosimios hasta el humano, el análisis de las secuencia del locus GH humano condujo a postular que en primates el gen CSH resultó de la divergencia de una copia del gen GH-N hace no menos de 31 millones de años. Posteriormente, la región que contiene estos dos genes se duplicó nuevamente, dando origen a un locus con cuatro genes: dos GHs y dos CSHs. Más tarde, el gene CSH faltante se derivó del CSH original. Finalmente, se propone que ocurrieron inserciones de elementos de control y al menos un evento de conversión génica (hace aproximadamente 10 millones de años) que hicieron todos estos genes más parecidos entre sí (Fig. 5).

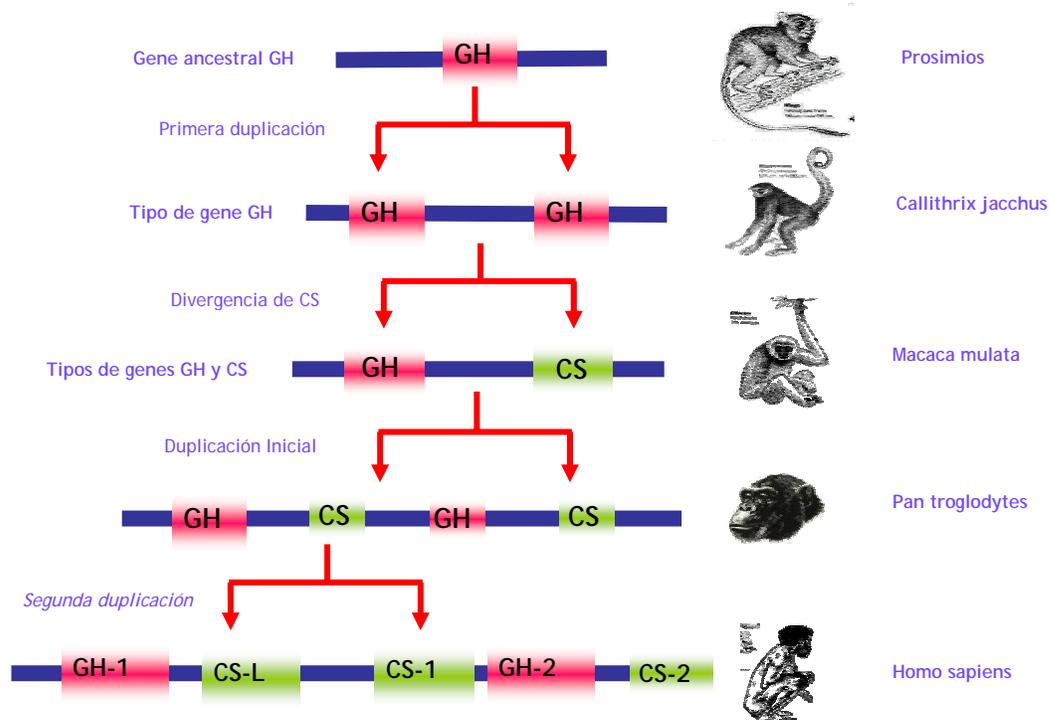


Figura 5. Hipótesis del proceso de formación del locus de GH. Descripción esquemática de los eventos evolutivos que originaron al locus GH del genoma Humano.

Nuevas pistas del porqué nuestro locus GH difiere del chimpancé

Sin embargo, nueva evidencia derivada ya no solo del análisis de las secuencias del locus GH del genoma humano, si no también de los *loci* GHs de los genomas de las diferentes especies de primates estudiados en nuestro laboratorio y particularmente del *locus* GH del chimpancé nos ha obligado a reconsiderar nuestra hipótesis original. De particular relevancia resultó el estudio de las secuencias parciales pero valiosas del *locus* GH derivadas del proyecto del genoma del chimpancé complementadas con nuestros análisis de este locus en varios cromosomas artificiales de bacterias (BACs).

En breve, la nueva hipótesis que postulamos propone que el evento final que originó al segundo gen activo CSH del locus humano, no usó como molde al gen CSH original, si no mas bien a la copia de éste surgida a raíz de la segunda duplicación (González-Álvarez, y cols., 2006). Esta nueva hipótesis tiene consecuencias muy importantes que apuntan a que posiblemente el locus GH deba incluirse entre aquellos *locus* que marcaron la diferencia entre el rumbo evolutivo que tomo nuestra especie y que ahora nos diferencia de nuestro cercano pariente. Esta, sin embargo, es otra historia que esperamos contarles en nuestro próximo encuentro.

Referencias

1. Barrera- Saldaña H.A., Robberson D.L. y Saunders G.F. (1982) Transcriptional products of the human placental lactogen gene. J. Biol. Chem. 257: 12399-12404.
2. Barrera-Saldaña H.A. (1998). Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. Gene, 211:11-18.
3. Barrera-Saldaña H.A., Seeburg P.H. y Saunders G.F., (1983). Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. J Biol Chem 258, 3787-3793.
4. Barsh GS, Seeburg PH y Gelinás RE. (1983). The human growth hormone gene family; structure and evolution of the chromosomal *locus*. Nucleic Acids Res. 11:3939-3958.
5. Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldaña H.A., Gelinás R.E. y Seeburg P.H. (1989) The human growth hormone *locus*: Nucleotide sequences, biology, and evolution. Genomics. 4:479-497
6. González-Álvarez R., Revol de Mendoza A., Esquivel-Escobedo D. C., Corrales- Félix G. L., Rodríguez-Sánchez I. P., González V., Dávila G., Cao Q., De Jong P. Yun-Xin F. y Barrera Saldaña H. A. Growth hormone locus expands and diverges after the separation of Newand Old World Monkeys. 2006. Gene. *In press*
7. Golos T.G., Durning M., Fisher J.M. y Fowler, P.D. (1993). Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. Endocrinology. 133, 1744-52.
8. Reséndez-Pérez, D., Ramírez-Solís, R., Varela-Echavarría, A., Martínez-Rodríguez, G.H. y Barrera-Saldaña, H.A. (1990). Coding potencial of transfected human placental lactogen genes. Nucleic Acid Research. 18:4665-4670.
9. Revol A., Esquivel-Escobedo D., Santiago Alarcón D. y Barrera-Saldaña, H.A. (2001). Independent duplication of the growth hormona gene in three Anthropeidean lineages. J Endocr. Genet. 2:151-159.

HABÍA UNA VEZ UN GEN...LA DRAMÁTICA HISTORIA EVOLUTIVA DE LA FAMILIA DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN PRIMATES

Resumen

Los organismos vivos han desarrollado varias maneras de interconvertir a la energía en sus diversas formas, utilizando compuestos de fosfato tales como trifosfato de adenosina (ATP) como fuente biológica de intercambio de energía. Las ATPasas pueden convertir la energía derivada de la hidrólisis del ATP en trabajo. Además, una parte significativa de la energía total liberada se puede disipar en el ambiente circundante como calor. En este trabajo, repasaremos y discutiremos los procesos de transducción de energía, la noción de los compuestos de fosfato de alta y baja energía, y la evolución de dos conceptos: (i) la energía derivada de la hidrólisis de los compuestos de fosfato se libera solamente antes de la hidrólisis del enlace del fosfato y (ii) la cantidad de energía liberada y la fracción de ella que se convierta en calor varía con el ambiente, e. g., si el compuesto se encuentra en solución o en la superficie de la enzima. También discutiremos algunas evidencias que indican que las ATPasas pueden modular la conversión de la energía durante el ciclo catalítico que determina la fracción de la energía derivada del compuesto del fosfato que será convertida en trabajo y la fracción que se convertirá en calor. Este concepto es importante para la comprensión de la termogénesis y de su papel en la resistencia al frío, el control del peso corporal, y el mecanismo varias enfermedades como el hipertiroidismo y la obesidad, que se asocian con la falta de regulación de la termogénesis.

Palabras clave: adenosin trifosfato, ATP; enlaces de fosfato; ATPasa; solvatación; transducción de energía; hidrólisis del fosfato; pirofosfato; termogénesis.

Semblanza del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.



El Dr. Barrera Saldaña es Bioquímico auto formado, al cursar la carrera de Biólogo y materias de la de Químico Bacteriólogo Parasitólogo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL, 1979) y doctor en Ciencias Biomédicas con especialidad en Biología Molecular por la Escuela de Graduados en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Texas en Houston (1982). Realizó una estancia posdoctoral en Biología Molecular en la Universidad Louis Pasteur de Estrasburgo, Francia (1984). Es especialista en Conversión de Tecnología a Capital por el Instituto de Innovación, Creatividad y Capital de la Universidad de Texas en Austin y el ITESM (1999). Ha sido declarado ciudadano distinguido de su ciudad natal (Miguel Alemán, Tamaulipas); distinguido con el nombramiento de primer Profesor de la UANL por el H. Consejo Universitario de la misma, por sus méritos como docente e investigador (1997). Junto con investigadores de Genentech, Inc. y de las Universidades de Texas y Washington, estableció en 1988 el record mundial de secuenciación manual de genes humanos, considerado evidencia de la factibilidad del Proyecto del Genoma Humano. Es promotor del programa AVANCE, Coordinador del Comité de Ciencias Multidisciplinarias y Evaluador del Área III del SNI, del CONACYT. Miembro del SNI desde su fundación y actualmente Nivel III en el mismo. Fundador de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL y ExJefe del mismo. Fundador de las Unidades de Servicio de Diagnóstico Molecular y de Innovación Biomédica de la Facultad de Medicina de la UANL. Autor de más de 100 publicaciones con más de 1000 citas, de un libro de divulgación, de una patente en biotecnología y de varias transferencias tecnológicas a los sectores productivos. Director o Co-director de 90 tesis: 22 de Licenciatura, 52 de Maestría y 16 de Doctorado. Distinguido con quince Premios de Investigación de la UANL y con más de veinte de carácter nacional, dentro de los que destacan los recientemente entregados: Premio de

Investigación Médica Dr. Jorge Rosenkranz 2005 (primer lugar, área epidemiológica), y el XVI Premio Nacional de Investigación 2005 (tercer lugar, área biomédica epidemiológica) de la Fundación GlaxoSmithKline. Ha impartido cursos en varias universidades nacionales, de Latinoamérica y de España. Miembro de las Academias Nacional de Medicina y Mexicana de Ciencias, así como de varias Sociedades Científicas del País y del Extranjero. Seleccionado en 1998 como el ExAlumno distinguido de la Escuela de Graduados en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Texas, en Houston. Fundó y fue el primer Director del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, en Reynosa, Tamps. Contribuyó a modernizar Unidades de Investigación en Genética Humana en México, Colombia, Venezuela y Perú. Es pionero en el diagnóstico molecular de varias enfermedades y coordinó el primer protocolo de Terapia Génica (contra cáncer de próstata) en Latinoamérica. Sus trabajos en regulación, evolución, disfunción y aprovechamiento biotecnológico de los genes de las hormonas del crecimiento, son pioneros en México y Latinoamérica. La prestigiada revista **Nature Medicine** le dedicó un perfil en su número de Julio del 2003. Presidente de la Asociación Mexicana de Genética Humana, A.C. (2004 - 2005). Secretario de Investigación, Regulación y Vinculación de la Facultad de Medicina – UANL. (Octubre del 2004 – actual).



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS FÚNGICAS PARA FINES AMBIENTALES

Gustavo Dávila y Rafael Vázquez-Duhalt

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 01000, México

vazqduh@ibt.unam.mx

Abstract

Ligninolytic fungi are the main organisms involved in the carbon recycling from lignin. Several enzymes are involved in this process and they are non specific with the capacity to produce free radicals. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, versatile peroxidase and laccases are extracellular enzymes and they are involved in the lignin degradation, with the contribution of the intracellular enzymatic system, cytochrome P450. In addition, these enzymes are able to transform a diversity of substrates, including pollutants and toxic compounds. This work reviews the literature on the capacity of these enzymes for the pollutant degradation, with emphasis on polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides and industrial dyes. The potential uses of these enzymes in biorremediation and reduction of environmental impact are discussed.

Keywords: Ligninolytic fungi, degradation enzymatic, biorremediation.

Introducción

Sin duda, uno de los grandes retos de la humanidad en este inicio del siglo XXI es el de convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes energéticamente. Por otro lado, se requiere tener la capacidad tecnológica para restaurar los sitios dañados ambientalmente. La biotecnología tiene un papel importante que desempeñar en esta transformación tecnológica. La investigación deberá estar enfocada en la utilización de nuevas herramientas biotecnológicas para la prevención, control y remediación de las contaminaciones ambientales. En este trabajo se analiza la posibilidad de usar sistemas enzimáticos para la transformación de contaminantes que conlleve a una reducción, o eliminación, de su impacto ambiental. Los microorganismos responsables del reciclaje del carbón proveniente de la lignina,

o degradadores de lignina, presentan una batería de enzimas poco específicas con un uso potencial en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos. Aquí se ejemplifica este potencial con la transformación enzimática de colorantes industriales, plaguicidas e hidrocarburos polinucleo aromáticos.

Lignina: estructura y biodegradación

La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera. La madera y otros tejidos vasculares contienen alrededor del 20-30% de lignina [1]. La mayor parte de ésta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa. Este compuesto provee de rigidez a las plantas superiores ya que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa formando la lámina media (Fig. 1) [2]. Además, protege a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa, hemicelulosa) de la hidrólisis enzimática microbiana [3].

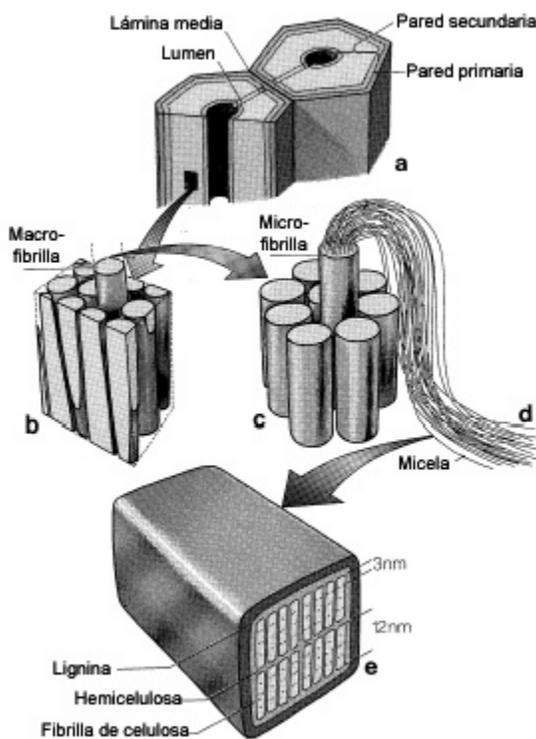


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular vegetal a cuatro niveles, aumentando de **a** hacia **e**. **a** Corte transversal de una fibra de madera mostrando la lámina media y la pared celular primaria y secundaria. **b** Sección transversal de una porción de la pared secundaria con macrofibrillas. **c** Un manojo de microfibrillas. **d** Los filamentos micelares. **e** Corte transversal de una micela, mostrando la composición ultraestructural: la lignina, hemicelulosa y celulosa. El espacio entre las fibras vegetales (lámina media), macrofibrillas, microfibrillas y los filamentos micelares está ocupado por lignina [4].

Una estructura química representativa de la lignina se muestra en la figura 2. Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos que le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además las protege del ataque de organismos patógenos [1, 5].

Biosintéticamente, la lignina proviene de tres alcoholes precursores: el alcohol *p*-hidroxicinámico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico. La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasa vegetales, da lugar al polímero de lignina [2]. Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo, y altamente ramificado [3].

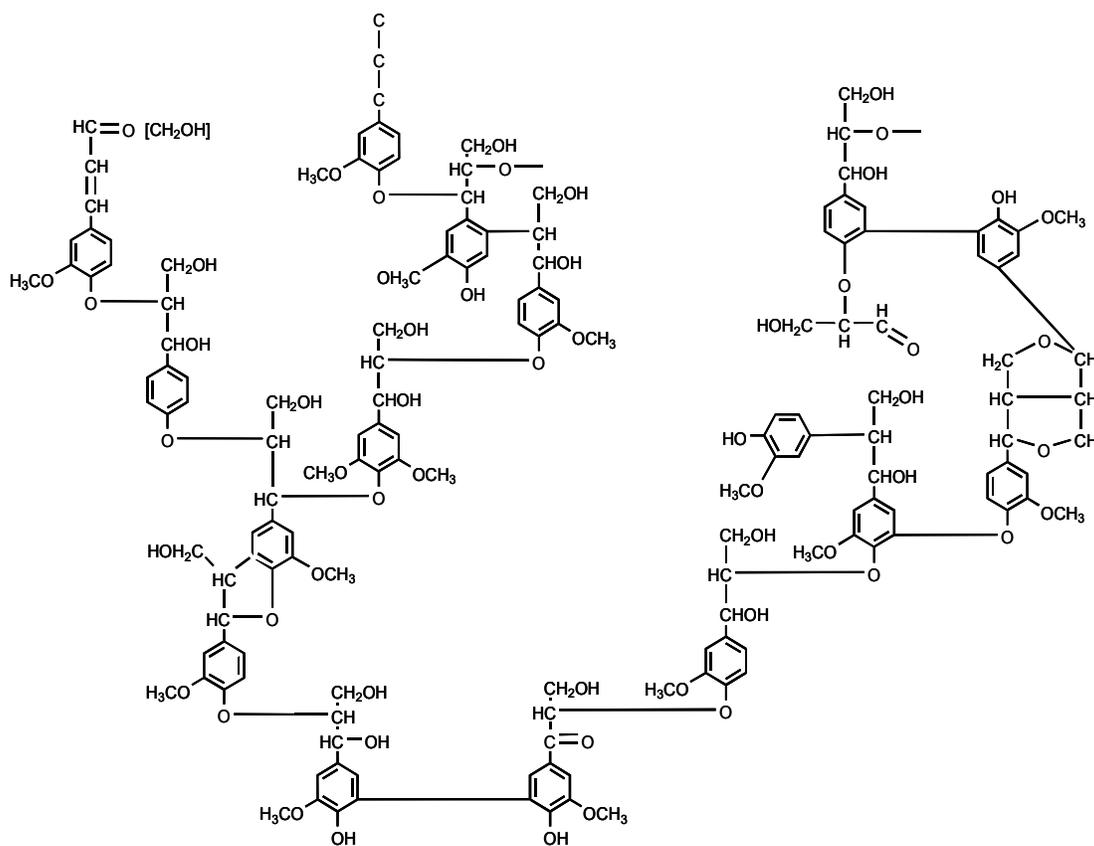


Figura 2. Estructura parcial de la lignina.

Las características estructurales de este heteropolímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación. Definiendo a una molécula de lignina con un peso molecular de entre 600-1000 kDa, es evidente que su tamaño le impide poder ser degradada intracelularmente [2]. Además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradado por mecanismos típicos de hidrólisis [6]. Por lo tanto, cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, no hidrolíticas y bastante inespecíficas [2].

Microorganismos ligninolíticos

La capacidad para catabolizar la celulosa y hemicelulosa es una característica común para diversos hongos y otros microorganismos. Por el contrario, al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta dióxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos [2]. Estos hongos ligninolíticos, denominados hongos de la pudrición blanca de la madera, comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para mineralizar eficientemente la lignina. Presumiblemente, esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía [7].

La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo *Basidiomycetes* y son los microorganismos más eficientes en degradar totalmente la lignina. Estos organismos secretan varias enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su mineralización [8].

Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere un uso potencial en biorremediación. Estos hongos han sido efectivos en la degradación de una diversidad de contaminantes ambientales peligrosos (Tabla 1).

Los contaminantes recalcitrantes, tales como bifenilos policlorinados y explosivos aromáticos [9], los hidrocarburos policíclicos aromáticos [10], los plaguicidas clorados [11] y los plaguicidas organofosforados [12], son todos efectivamente mineralizados a CO₂ por varias especies de hongos ligninolíticos. Además, la poca especificidad de las enzimas de estos organismos les permite degradar mezclas complejas de estos contaminantes.

Se ha demostrado la oxidación de efluentes provenientes del blanqueo del papel con *Phanerochaete chrysosporium*, y se sugiere que la enzima responsable de la decoloración de tales efluentes es principalmente la manganoso peroxidasa (MnP) [13]. También se han reportado altas eficiencias de decoloración en estos efluentes con la lacasa de otro hongo ligninolítico, *Trametes versicolor* [14].

Estudios de degradación de colorantes sintéticos han revelado que los hongos ligninolíticos son capaces de decolorar colorantes azo, trifenilmetano y heterocíclicos [8]. Específicamente, las (MnPs) de *Bjerkandera adusta* y de *Pleurotus eryngii* son capaces de decolorar algunos colorantes sintéticos [15]. También se ha demostrado que dos isoenzimas de lacasa, purificadas de *Coriolopsis gallica* decoloran diversos colorantes industriales [16].

Estudios realizados con *P. chrysosporium* han mostrado que este organismo ligninolítico degrada eficientemente 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, guayacoles policlorados y diversas vainillinas cloradas [17]. Además este hongo mineraliza pentaclorofenol (PCP). Debido a que

estos trabajos se siguieron en condiciones de cultivo ligninolíticas, se pensó que tales enzimas ligninolíticas podían estar involucradas en su transformación. Posteriormente se demostró que diversos fenoles policlorados son efectivamente sustratos de peroxidases extracelulares como la lignina peroxidasa (LiP) y la (MnP) de *P. chrysosporium*. Además, se ha demostrado que el 2,4-diclorofenol [18], 2,4,5-triclorofenol [19], 2,4,6-triclorofenol [20] y pentaclorofenol [21] son oxidados *in vitro* por estas enzimas hasta sus correspondientes 1,4-benzoquinonas como productos finales.

Para el caso del PCP se han identificado tanto a LiP y MnP como las enzimas capaces de llevar a cabo la deshalogenación únicamente en la posición 4 del anillo aromático. Debido a que esta deshalogenación da lugar a la quinona, se denomina deshalogenación oxidativa (Fig. 3). Posteriores eliminaciones de los demás átomos de cloro en la molécula policlorada son biocatalizadas por otros sistemas enzimáticos. En *P. chrysosporium* se ha propuesto la existencia de un sistema intracelular reductor capaz de deshalogenar totalmente el PCP, después de la acción de LiP y MnP [21].

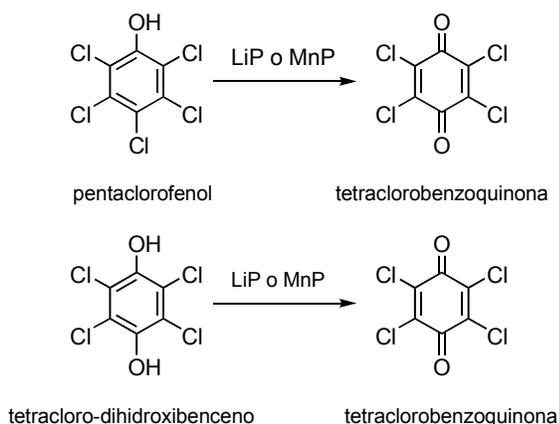


Figure 3. Productos identificados de la oxidación de PCP y tetracloro-dihidroxibenceno, utilizando LiP y MnP purificadas de *Phanerochaete chrysosporium* [21].

En algunos casos, la transformación de compuestos xenobióticos en los cultivos no es mediada por las enzimas ligninolíticas extracelulares. Por ejemplo, el fenantreno y el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano que no son sustratos para las peroxidases extracelulares [9, 22] son degradados por cultivos de *P. chrysosporium* (Tabla 1). Un sistema enzimático intracelular, la monooxigenasa citocromo P450, que está presente en todos los hongos, parece estar involucrado en la degradación de algunos compuestos como el fenantreno, el benzo(α)pireno y el DDT [22].

Tabla 1. Compuestos xenobióticos degradados por cultivos de hongos *de la podredumbre blanca*.

<i>Compuesto xenobiótico</i>	<i>Especie^a</i>	<i>Referencia</i>
Fenoles clorinados		
Pentaclorofenol	Pc, Ps, Po, Th, Cs	Mileski y cols., [23]
Triclorofenol	Pc	Field y cols., [10]
Diclorofenol	Pc	Field y cols., [10]
Cloroguaicoles	Pc	Field y cols., [10]
Bifenilos policlorinados		
Aroclor 1254	Pc, Tv, Pb, Fg	Eaton, [24]
Tetracloro bifenilo	Pc	Bumpus y col., [25]
Plaguicidas		
DDT	Pc	Fernando y cols., [9]
Terbufos	Pc	Bumpus y cols., [12]
Clorpirifos	Pc	Bumpus y cols., [12]
Fonofos	Pc	Bumpus y cols., [12]
Endosulfan	Pc	Kullman y Matsumura, [26]
Dioxinas		
Dicloro dibenzo- <i>p</i> -dioxina	Pc	Valli y cols., [22]
Tetracloro dibenzo- <i>p</i> -dioxina	Pc	Bumpus, [28]
Hidrocarburos policiclicos aromáticos	Pc	George y Neufeld, [29]
Fluoreno	Pc, Tv, Ba	Field y cols., [10]
Antraceno	Pc, Tv, Cl	Hammel y cols., [22]
Fenantreno	Pc	Hammel y col., [30]
Pireno	Pc, Tv, Ba	Field y cols., [10]
Benzo(α)pireno		
Alquil halidos		
Lindano	Pc	Kennedy y cols., [11]
Clordano	Pc	Kennedy y cols., [11]
Nitrotoluenos		
TNT	Pc, Ba	Fernando y cols., [9]; Eilers y cols., [31]
DNT	Pc	Valli y cols., [27]

Cloroanilinas		
Dicloro anilina	<i>Pc, Tv, Cl</i>	Morgan y cols., [32]
Colorantes		
Colorantes azo	<i>Pc, Po, Tv</i>	Cripps y cols., [33]; Spadaro y cols., [34]
Colorantes poliméricos	<i>Pc</i>	Glenn y Gold, [35]
Cristal violeta	<i>Pc</i>	Bumpus y Brock, [36]
Violeta ácido 7	<i>Tv</i>	Zhang y Yu, [37]
Clorolignina	<i>Pc</i>	Eriksson y Kolar, [38]

^a *Pc*, *Phanerochaete chrysosporium*; *Ps*, *Phanerochaete sordida*; *Po*, *Pleurotus ostreatus*; *Th*, *Trametes hirsuta*; *Cs*, *Ceriporiopsis subvermispora*; *Tv*, *Trametes versicolor*; *Pb*, *Phlebia brevispora*; *Fg*, *Funalia gallica*; *Ba*, *Bjerkandera adusta*; *Cl*, *Chrysosporium lignosum*.

Enzimas ligninolíticas de hongos

A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina [39]. Algunos años después, tres grupos reportaron de manera independiente, el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo [40, 41, 42], y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se calcularon pesos moleculares de entre 41-42 kDa y se encontró que contenía un grupo prostético hemo [43]. Estudios espectroscópicos mostraron que esta ligninasa era distinta de las oxigenasas P450, compartía algunas características con las hemoproteínas transportadoras de oxígeno y que era en realidad una peroxidasa [2]. A esta enzima se le denomina ahora como lignino peroxidasa (LiP).

A partir de este hallazgo, se encontró la producción de dos hemoperoxidasas más: la manganeso peroxidasa (MnP) que oxida el Mn^{2+} a la especie oxidante Mn^{3+} [44], mientras que recientemente en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* se ha descrito una MnP versátil (VP). Esta enzima conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP [45, 46].

Además de estas peroxidasas, se detectó la producción en estos hongos ligninolíticos de una cuarta enzima, una fenol oxidasa denominada lacasa. Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina [47].

Estas enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más. En la Tabla 2 se muestran algunos hongos ligninolíticos y las enzimas que producen.

Además de estos sistemas enzimáticos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de la lignina. Esto se postula debido a que la lignina en su estado natural es inaccesible para enzimas tales como la LiP y MnP. Entre los cofactores importantes para la transformación de la lignina se encuentran el manganeso, el alcohol veratrílico, el oxalato y el 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno [7].

Tabla 2. Organismos productores de enzimas ligninolíticas

<i>Organismo</i>	<i>Enzimas ligninolíticas</i>	<i>Referencias</i>
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>MnP, LiP</i>	<i>Paszczynski y cols., [48]</i>
<i>Trametes versicolor</i>	<i>MnP, lacasa</i>	<i>Paice y cols., [49]</i>
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	<i>MnP, lacasa</i>	<i>Urzúa y cols., [50]</i>
<i>Cyanthus stercoreus</i>	<i>MnP, lacasa</i>	<i>Sethuraman y cols., [51]</i>
<i>Phlebia radiate</i>	<i>MnP, LiP, lacasa</i>	<i>Van Aken y cols., [52]</i>
<i>Nematoloma frowardii</i>	<i>MnP, LiP, lacasa</i>	<i>Schneegab y cols., [53]; Hofrichter y cols., [54]</i>
<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>MnP, VP, lacasa</i>	<i>Martínez y cols., [55]; Caramelo y cols., [56]</i>
<i>Bjerkandera</i> sp. <i>BOS55</i>	<i>VP</i>	<i>Mester y Field [57]; Mester y Field [46]</i>
<i>Bjerkandera adusta</i> <i>UAMH 8258 y 7308</i>	<i>VP</i>	<i>Wang y cols., [58]</i>

Lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP).

Estas dos peroxidases involucradas en la despolimerización de la lignina fueron descritas por primera vez en el hongo ligninolítico *P. chrysosporium*. De este organismo se han purificado diez isoenzimas, nombradas H1 a H10, de acuerdo a su orden de elución de una columna de intercambio aniónico. De ellas, seis fueron identificadas como isoenzimas de LiP (EC 1.11.1.7), mientras que cuatro correspondieron a isoenzimas de MnP (EC 1.11.1.13). Ambas son capaces de oxidar a la lignina, y derivados de la misma, además de una variedad de compuestos modelo (Fig. 4) [2, 59, 60, 61].

Estas enzimas comparten la estructura del grupo prostético férrico protoporfirina IX (grupo hemo) presente en su sitio activo. Normalmente en las hemo peroxidases, el átomo de hierro se encuentra penta coordinado. Cuatro posiciones de coordinación son ocupadas por los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos. La quinta posición se localiza en el lado proximal (por "debajo") del grupo hemo y es comúnmente ocupada por un nitrógeno perteneciente al anillo imidazol de un residuo de histidina. La sexta posición de coordinación en la enzima en su estado basal está vacante y se ubica en el lado distal (por "arriba") del grupo hemo. Esta cavidad distal es la región en la que ocurren muchas de las reacciones de las hemoperoxidasas.

A pesar de la baja homología en secuencia entre diversas peroxidases (menor al 20%), el plegamiento y la estructura secundaria se encuentran conservadas [62]. La enzima se divide en dos dominios estructurales (proximal y distal) que envuelven al grupo prostético (Fig. 5) y su estructura está conformada principalmente por 10-11 α -hélices.

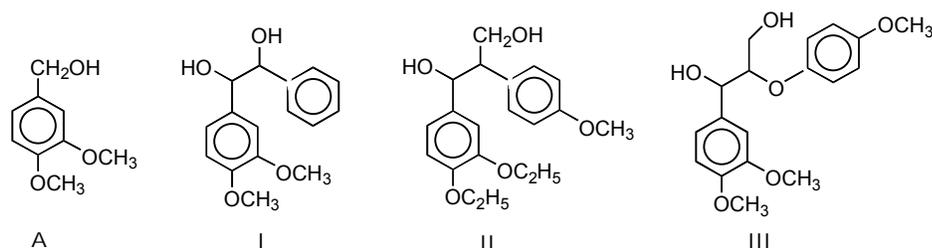


Figura 4. Compuestos Derivados de la Lignina: Alcohol veratrílico (A), y tres dímeros modelo (I, II, III).

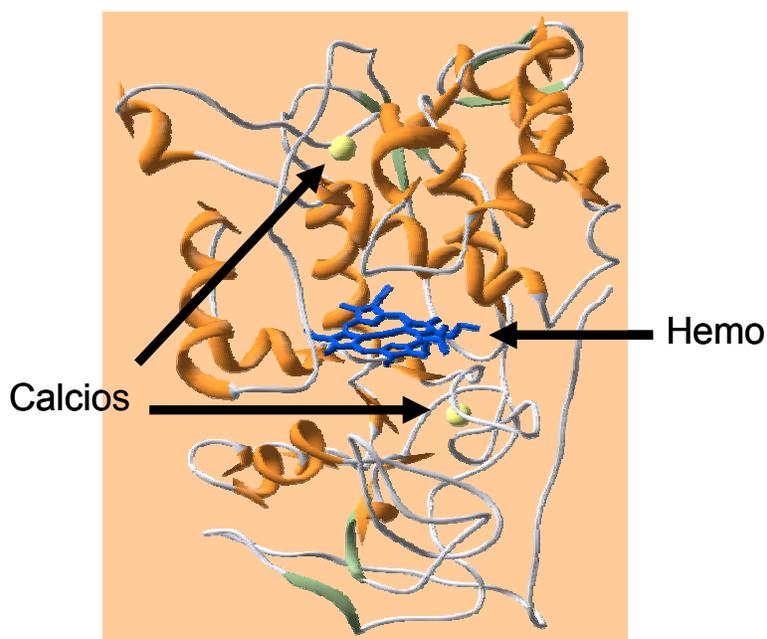


Figura 5. Modelo molecular teórico de la MnP de *Pleurotus eryngii* [63]. Se muestran las posiciones de las α -hélices, del grupo hemo, del Mn^{2+} y las porciones C y N terminal.

Las LiP presentan masas moleculares de aproximadamente 40 kDa, están glicosiladas y tienen puntos isoeléctricos y pH óptimos ácidos. Además su ciclo catalítico es común para diversas peroxididasas.

El ciclo catalítico de LiP y MnP está compuesto por tres reacciones consecutivas [64, 65]. Involucra primeramente la reacción del sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno. Esto produce la reducción del H_2O_2 a H_2O y la oxidación por dos electrones de la proteína férrica a un intermediario denominado compuesto I. Este intermediario posee dos equivalentes reductores, y contiene un centro oxiferril [$Fe^{IV}=O$] y un radical π -catiónico. Este radical puede

estar localizado ya sea en el grupo hemo o en algún residuo de la proteína, dependiendo de la isoenzima [62]. Después, el estado de la proteína denominado compuesto I, se reduce mediante un electrón de una molécula de sustrato reductor (AH) dando lugar a un radical del sustrato (A^{\bullet}) y al compuesto II, en el cual el radical catiónico ha sido reducido a su estado nativo. Finalmente el compuesto II es reducido con un electrón por una segunda molécula de sustrato reductor (AH) hasta el estado nativo de la enzima que contiene el Fe^{3+} .

Las peroxidasas ligninolíticas difieren en los sustratos reductores (AH) que son oxidados por la transferencia de un electrón a los compuestos I y II, [66]. La LiP es relativamente inespecífica en sus sustratos reductores. Puede oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox tales como el alcohol veratrílico (Fig. 4A), metoxibencenos y modelos diméricos no fenólicos de lignina. Mientras que la MnP es específica en sus sustratos reductores y solamente el Mn^{2+} puede completar eficientemente su ciclo catalítico. Estudios cinéticos han mostrado que el compuesto I de la MnP puede ser reducido tanto por Mn^{2+} como por compuestos fenólicos, mientras que solamente el Mn^{2+} reduce el compuesto II [64].

El Mn^{3+} generado por la MnP es una especie altamente oxidante (1.54 V) con el inconveniente de ser altamente inestable en medio acuoso. Para superar este inconveniente, los hongos ligninolíticos secretan ácido oxálico (y otros ácidos como el malónico) que acomplejan el Mn^{3+} . Estos ácidos dicarboxílicos forman complejos estables con el Mn^{3+} capaces de difundir a través de la estructura de la pared celular vegetal y que actúan como oxidantes de compuestos fenólicos [67, 68].

Es muy probable que las diferencias catalíticas entre LiP y MnP sean debidas a la existencia de diferentes sitios de unión para el sustrato en estas enzimas homólogas. El sitio de unión a Mn^{2+} está formado por los átomos de oxígeno carboxílico de dos glutamatos (ubicados en la posición 35 y 39), un aspartato (en la posición 179), un átomo de oxígeno de un propionato y dos oxígenos del agua. Los tres residuos acídicos delimitan un pequeño canal de acceso frente a los propionatos del grupo hemo. El Mn^{2+} entra a este sitio coordinado por los oxígenos del propionato interno y de los tres residuos acídicos. De esta manera puede transferirse un electrón hasta el grupo hemo vía el propionato [63]. Este sitio de unión a Mn^{2+} es exclusivo de la MnP, por lo que no existe en la LiP [69].

El amplio rango de sustratos para la LiP, que incluye moléculas aromáticas pequeñas y de mayor peso, sugiere que debe haber al menos un sitio de unión localizado en la superficie de la enzima. Así, se ha confirmado la participación de un triptofano superficial (ubicado en la posición 171 en la LiP) en la oxidación de alcohol veratrílico [70, 71]. Se propone que en este residuo se inicia la transferencia de los electrones a larga distancia hacia el grupo hemo. Debido a que este triptofano se encuentra altamente conservado se han propuesto rutas similares de transferencia de electrones para diversas peroxidasas.[63].

Peroxidasa versátil (VP)

Como se mencionó, tanto la (LiP) como la (MnP) fueron descubiertas en cultivos del hongo *P. chrysosporium* y estudiadas extensivamente. Recientemente se describió una tercera peroxidasa ligninolítica en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*. A esta enzima se le denominó versátil peroxidasa (VP). La VP, diferente de la MnP y LiP de *P. chrysosporium*, es capaz de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} , y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de Mn^{2+} [55]. Además se encontró que posee una alta afinidad hacia el Mn^{2+} , hidroquinonas y colorantes.

También es capaz de oxidar al alcohol veratrílico (a veratril aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP [45, 56].

El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP (figura 6). Sus características básicas son comunes a la mayoría de la peroxidasas. Sin embargo, la VP es única ya que es capaz de oxidar sustratos aromáticos como el alcohol veratrílico (AV) a su correspondiente radical AV•, el Mn²⁺ a Mn³⁺ y sustratos que la LiP sólo oxida en presencia de alcohol veratrílico. El ciclo de la VP incluye la sustracción de dos electrones de la enzima en estado basal por el peróxido de hidrógeno para producir el compuesto I_A (C-I_A), que contiene un oxo-Fe IV=O y un radical catiónico en la porfirina. La reducción en dos reacciones de un electrón produce el compuesto II_A (C-II_A), que contiene un oxo-Fe IV=O. Y después, la forma basal de la enzima [103]. El ciclo también incluye el compuesto I_B (C-I_B), que contiene un oxo-Fe IV=O y un radical triptófano (Trp•) y el II_B (C-II_B), que contiene un Fe III y un Trp• involucrado en la oxidación de AV y otros compuestos aromáticos de alto potencial redox (C-I_B y C-II_B están en equilibrio con C-I_A y C-II_A, respectivamente). El porcentaje de las formas A y B en las dos reacciones puede ser variable y su participación en la catálisis dependerá de los sustratos disponibles. En otras palabras, los compuestos I_A y II_A predominarán durante la oxidación de Mn²⁺, mientras que un porcentaje del Trp• será necesario durante la oxidación de AV. El triptófano activo en C-I_B y C-II_B es el W164 en la VP de *P. eryngii* [103].

Es importante mencionar que esta enzima oxida directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos, los cuales no son oxidados eficientemente por la LiP o la MnP en ausencia de veratril alcohol o Mn²⁺, respectivamente. Incluso oxida colorantes de alto potencial redox, los cuales solo son catalizados por la LiP en presencia de veratril alcohol [15, 45]. Para esta enzima, los pH óptimos para la oxidación de Mn²⁺ y sustratos aromáticos son diferentes. Para la oxidación de Mn²⁺ el óptimo es pH 5, mientras que para los compuestos aromáticos y colorantes es 3. Estos parámetros son similares a los de MnP y LiP, respectivamente [66].

Son dos los sitios de unión a sustrato en las VPs de *P. eryngii*, y *B. adusta*. Uno exclusivo para el Mn²⁺, cerca del grupo hemo, y otro para los sustratos aromáticos en donde tiene un papel fundamental un triptófano superficial. El flujo de electrones desde el triptófano y el grupo hemo se ha demostrado en la VP de *P. eryngii* [66] y se determinó para la VP de *B. adusta* [72, 73]. Estudios bioquímicos muestran la existencia de una inhibición no competitiva entre la oxidación de Mn²⁺ y los sustratos orgánicos, como colorantes de alto potencial redox [63] e hidrocarburos aromáticos [74]. Estos resultados apoyan la idea de la existencia de dos sitios de oxidación con afinidades distintas, que no se ven afectados por la presencia del sustrato alterno que actúa como inhibidor.

Lacasa

Las fenol oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua [75].

La lacasa es una fenol oxidasas que debe su nombre a que fue descubierta, hace más de un siglo, en el árbol japonés de la laca: *Rhus vernicifera* [76]. Esta enzima contiene átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias [77]. Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares [78] con

pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, y del 15 al 20% de su peso molecular esta dado por carbohidratos [75].

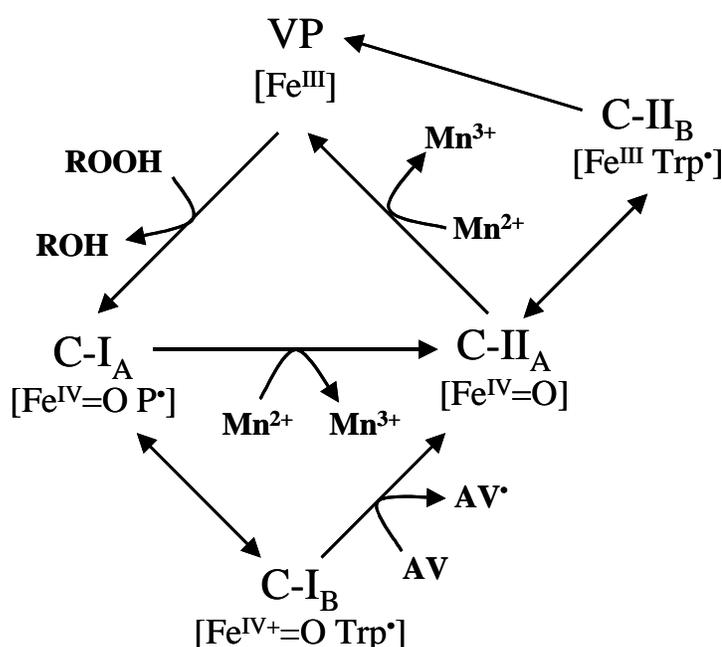


Figura 6. Ciclo catalítico de la versátil peroxidasa. VP, peroxidasa versátil en su estado basal; C-I_A, Compuesto 1A; C-I_B, Compuesto 1B; C-II_A, Compuesto 2A, C-II_B, Compuesto 2B; VA, alcohol veratrílico.

La lacasa fúngica (bencendiol:oxígeno oxidoreductasa, E.C. 1.10.3.2) es una fenol oxidasa extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos [79]. Los mejores productores de esta enzima son los hongos ligninolíticos [80]. Bioquímicamente, la lacasa es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos. Cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación ²⁺ que les confieren una coloración azul.

Esta enzima oxida no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila [81] y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación [82] o desmetoxilación [83]. Todas estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina.

La lacasa también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o despolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso molecular [84]. La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisorio para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel [84, 85], la decoloración de colorantes textiles [86, 87] y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos [88, 89, 90].

Oxidación biocatalítica de hidrocarburos poliaromáticos.

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) son componentes del petróleo crudo, la creosota y el carbón. Compuestos ampliamente distribuidos en el ambiente. La mayoría de la contaminación por HPAs está originada por el uso extensivo de combustibles fósiles como fuente de energía. Su alta persistencia en el ambiente se debe a su alta hidrofobicidad, lo que hace muy lenta su biodegradación microbiana. Su remoción del ambiente es prioritaria debido a que muchos de los HPAs tienen propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas [91].

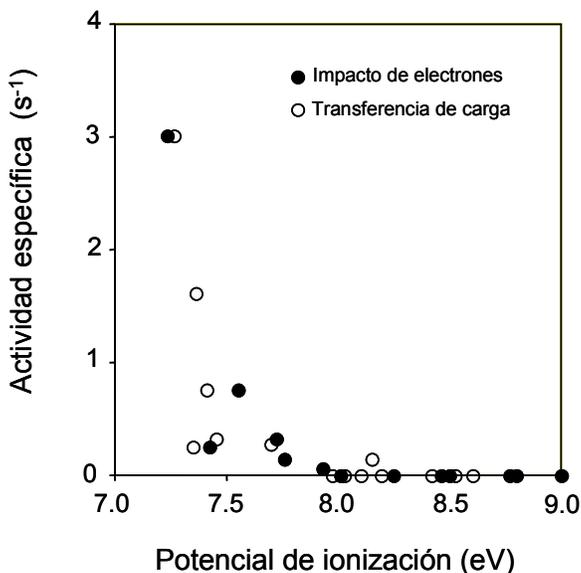


Figura 7. Relación entre el potencial de ionización el sustrato aromático y la actividad catalítica de la lignina peroxidasa de *Phanerochaete. chrysosporium* [94]. Los valores de potencial de ionización medidos por dos técnicas diferentes, impacto de electrones y transferencia de carga. La actividad específica en moles de sustrato transformadas por segundo por mol de enzima.

Compuestos como el pireno, benzo(a)pireno, acenafteno, fenantreno, antraceno y fluorantreno pueden ser oxidados por enzimas como la LiP [30], la MnP [92], la VP [74] y la lacasa [89, 93]. La habilidad de estas enzimas para oxidar los HPAs depende del potencial de ionización (PI) de cada compuesto (Fig. 7).

El PI es una medida (electrón-Volts) de la energía requerida para sustraer un electrón del orbital molecular más alto de un compuesto. La extracción de un electrón del sistema π de los compuestos aromáticos genera un radical catiónico. La capacidad de los HPAs para formar radicales catiónicos se relaciona con su PI, que a su vez, depende de la distribución de carga de los electrones π del compuesto. Las posiciones con la densidad de carga más alta, son las más susceptibles de sustitución nucleofílica. Se ha reportado una correlación entre el PI de los HPAs y la actividad específica de hemoproteínas como la LiP [94], la MnP [92], la hemoglobina y la VP [74]. En esos trabajos se ha reportado un valor de PI umbral para cada proteína: LiP ≤ 7.55 , MnP ≤ 8.2 , Hb ≤ 8.0 y VP ≤ 7.42 eV.

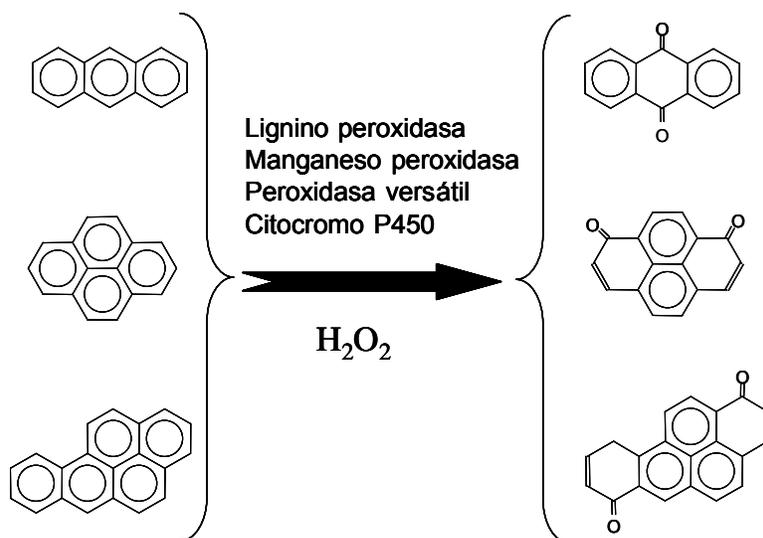


Figura 8. Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos con diferentes hemoproteínas.

Los productos de la reacción de la oxidación de HPAs con peroxidasa son esencialmente quinonas (Fig. 8). El hecho de que se obtengan los mismos productos de oxidación sugiere que las enzimas tienen el mismo mecanismo de oxidación [95]. La oxidación enzimática, seguida de la adición de microorganismos endógenos puede ser una estrategia de remediación efectiva debido a que la biodegradación de los HPAs y sus metabolitos, incrementa con su estado de oxidación. Adicionalmente, las quinonas son significativamente menos mutagénicas que sus correspondientes HPAs [96]. Por ejemplo, el ciclopenta(ed)pireno presentó una concentración mínima mutagénica en células linfoides humanas de 1.8 ng/ ml, mientras su respectiva quinona presentó una concentración mínima mutagénica de 2600 ng/ ml. Por otro lado el benzo(a)pireno, un potente carcinogeno, presentó una concentración mínima mutagénica de 14 ng/ ml, mientras que ninguna de sus quinonas fué mutagénica [96], Esto nos indica que una transformación enzimática de los HPAs es suficiente para reducir su impacto ambiental.

Transformación enzimática de plaguicidas

Una colección de 13 plaguicidas organosintéticos (Fig. 9) de los cuales 11 son organohalogenados se ensayaron *in vitro* con la VP de *B. adusta* para verificar su susceptibilidad a la transformación enzimática [97]. En la tabla 3 se muestran los resultados de la actividad de la VP sobre los plaguicidas, en dos condiciones de reacción. La actividad independiente (en ausencia) de Mn^{2+} se ensayó a pH 3.0, mientras que la actividad dependiente (en presencia) de Mn^{2+} se cuantificó a pH 4.0. Estos pH se han reportado como cercanos a los óptimos para la oxidación de sustratos aromáticos por la VP de *B. adusta* [98].

Como puede observarse en la tabla 3, solo tres compuestos fueron susceptibles de ser transformados por la enzima en las condiciones ensayadas. Estos plaguicidas fueron el bromoxinil, diclorofen y pentaclorofenol. Para el resto de los plaguicidas mostrados en la figura 9

no se detectó transformación enzimática. Los tres sustratos de la VP resultaron ser compuestos fenólicos organohalogenados.

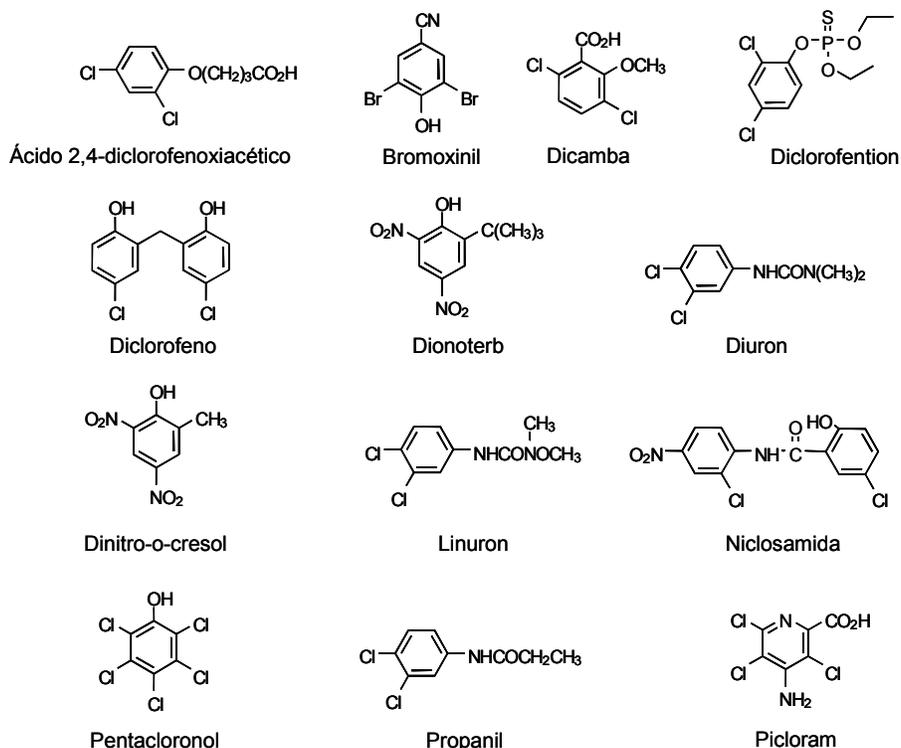


Figura 9. Plaguicidas seleccionados para la transformación enzimática con peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*.

El análisis de los productos mostró que los plaguicidas eran deshalogenados por la enzima [97]. En general, se considera que productos de reacción menos halogenados son usualmente menos tóxicos y más susceptibles a la biodegradación que los reactantes halogenados [99]. Por tal motivo, se ha pensado que tanto las peroxidases como algunas fenoloxidasas pueden ser de utilidad en procesos de descontaminación [100]. El hecho de que la VP de *B. adusta* sea capaz de generar productos menos halogenados que los compuestos iniciales, y en virtud de que durante su mecanismo de catálisis pueda polimerizar compuestos tóxicos, la convierte en potencial catalizador de aplicación ambiental.

Por otro lado, se estudió el sistema enzimático para la degradación de plaguicidas organofosforados por diferentes cepas de hongos ligninolíticos [101]. Una colección de 18 cepas diferentes de hongos degradaron *in vivo* el paratión adicionado a los cultivos en un tiempo de 96 h (Tabla 3). Tres de las cepas mostraron alta actividad degradativa y se seleccionaron para catalizar otros plaguicidas organofosforados. Estas tres cepas: *B. adusta* 8258, *P. ostreatus* 7989 y *P. chrysosporium* 3641 fueron capaces de degradar además de paratión, a los plaguicidas terbufos, azinfos metílico, fosmet y tribufos (DEF) en el rango de 50 al 96% en 96 h.

Para poder identificar el origen de la actividad degradativa se evaluaron las actividades de las enzimas ligninolíticas extracelulares contenidas en los extractos de los cultivos de las cepas seleccionadas. La actividad de la lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa fue

identificada en los extractos y no presentaron actividad sobre los cinco plaguicidas ensayados *in vivo*, sugiriendo que la actividad responsable podría encontrarse en el interior de la célula.

Tabla 3. Transformación enzimática de algunos plaguicidas [97].

Plaguicida	Actividad específica (min^{-1}) ^a	
	Ausencia de Mn^{2+} pH 3.0	Presencia de Mn^{2+} pH 4.0
Bromoxynil	68.10 (\pm 0.70) ^b	3.89 (\pm 0.18)
Diclorofen	173 (\pm 4.5)	198 (\pm 11.17)
Pentaclorofenol	10.87 (\pm 0.90)	0.23 (\pm 0.01)

^a Moles de sustrato transformadas por minuto por mol de enzima.

^b Valores en paréntesis son desviaciones estándar.

Tabla 4. Degradación de paratión por 18 cepas de hongos ligninolíticos después de 96 hrs de cultivo ^a

Hongo	Degradación (%) ^b
<i>B. adusta</i> 4312	49.0 \pm 4.2 ^c
<i>B. adusta</i> 7308	49.0 \pm 5.5
<i>B. adusta</i> 8258	78.3 \pm 3.6
<i>G. applanatum</i> 8168	ND
<i>P. ostreatus</i> 7964	44.5 \pm 4.1
<i>P. ostreatus</i> 7980	44.5 \pm 4.7
<i>P. ostreatus</i> 7988	18.4 \pm 4.0
<i>P. ostreatus</i> 7989	96.9 \pm 2.9
<i>P. ostreatus</i> 7972	32.3 \pm 3.1
<i>P. ostreatus</i> 7992	26.0 \pm 2.5
<i>P. ostreatus</i> IE8	48.5 \pm 2.3
<i>P. chrysosporium</i> FC-322	10.5 \pm 3.0
<i>P. chrysosporium</i> 3641	55.0 \pm 2.1
<i>P. chrysosporium</i> 3642	28.6 \pm 2.5
<i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725	30.0 \pm 2.0
<i>S. pulverulentum</i> 4521	7.7 \pm 3.2
<i>C. galica</i> 8260	28.5 \pm 2.5
<i>T. versicolor</i> 8272	9.5 \pm 3.4

^a La concentración inicial del plaguicida fue 20 mM. ^b Valores promedio obtenidos de ensayos por triplicado. ND: no detectado. ^c Desviación estándar

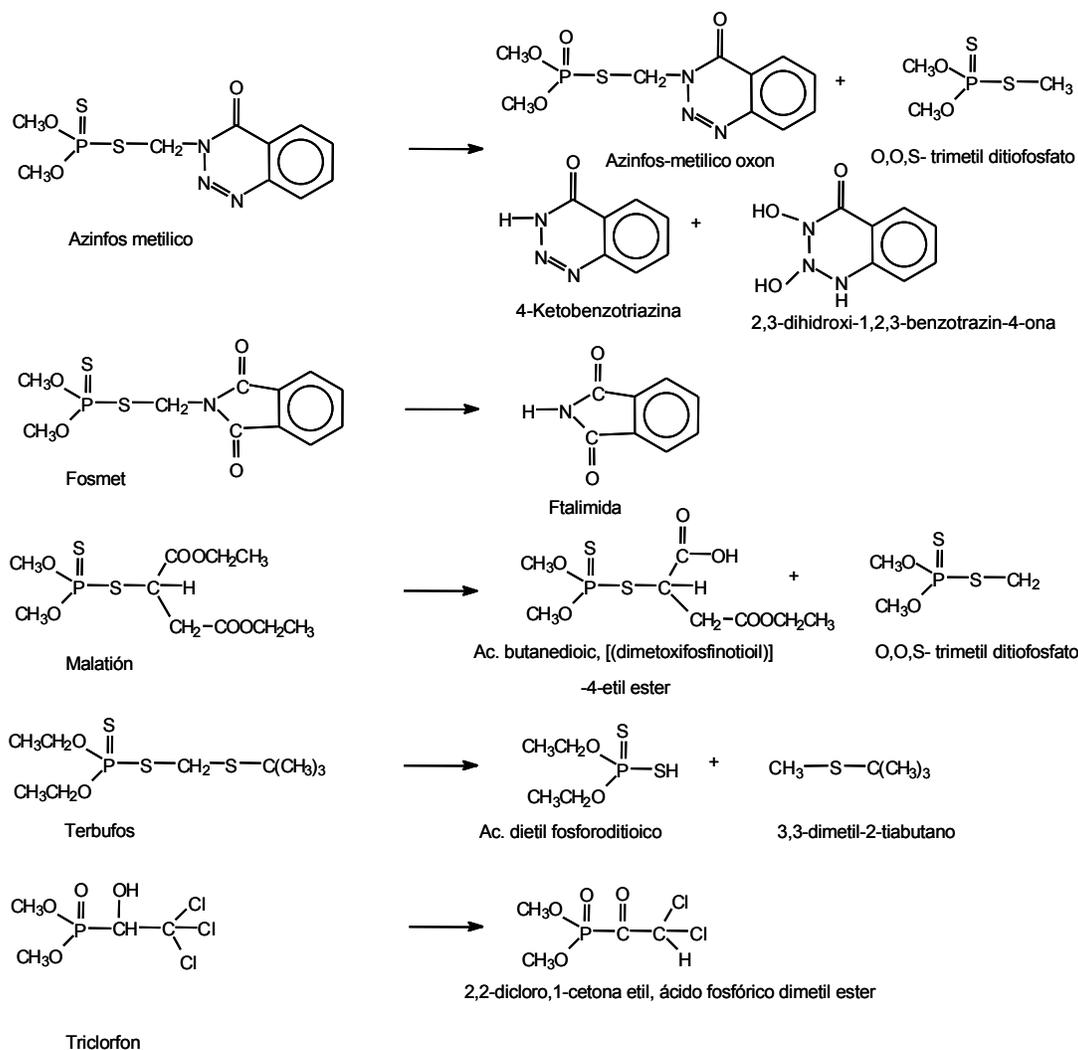


Figure 10. Productos de la degradación de los plaguicidas organofosforados por el sistema citocromo P450 de *Pleurotus ostreatus* [101].

Se obtuvieron y ensayaron *in vitro* las preparaciones obtenidas de microsomas de *P. ostreatus*, encontrándose velocidades de degradación de $10 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ para fosmet, $5.7 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ para terbufos y $2.2 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ para azinfos metílico. Estos resultados y la inhibición del sistema citocromo P450 por 3 inhibidores específicos empleados en estas mismas especies de hongos y el monóxido de carbono, así como el estricto requerimiento de NADPH durante la degradación, indican que en los hongos ligninolíticos la actividad de degradación de plaguicidas es debida al sistema multienzimático asociado al citocromo P450. Los productos de la degradación (Fig. 10) fueron identificados por espectrometría de masas acoplado a la cromatografía de gases.

El mecanismo molecular de la acción de los plaguicidas organofosforados es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, una serín esterasa ampliamente distribuida [102]. La acetilcolinesterasa se encuentra en el sistema nervioso central y periférico de los vertebrados y

su acción fisiológica es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina para que la activación de los receptores colinérgicos sea transiente. La inhibición de la acetilcolinesterasa resulta en la acumulación de acetilcolina y presentan signos de toxicidad colinérgica. Una transformación enzimática que reduzca el impacto ambiental del plaguicida deberá, entonces, reducir o eliminar la inhibición de la acetilcolinesterasa. En la figura 11 se muestran los resultados del ensayo de actividad de la acetilcolinesterasa con los productos obtenidos de las reacciones entre la fracción microsomal y los diferentes plaguicidas ensayados. Es importante señalar que en todos los casos (con excepción del triclorfón) el sustrato se agotó al término de la reacción (24 h). Además se incluye un control adicionando para cada uno de los plaguicidas, para conocer su efecto sobre la actividad acetilcolinesterasa y así saber si los productos son más o menos tóxicos. Se puede observar que en todos los casos se tiene mayor actividad de acetilcolinesterasa con los productos de la transformación enzimática de 1 μM de plaguicida que con los plaguicidas a la misma concentración [101]. Estos resultados indican que la transformación enzimática fue capaz de reducir la toxicidad de los plaguicidas organofosforados.

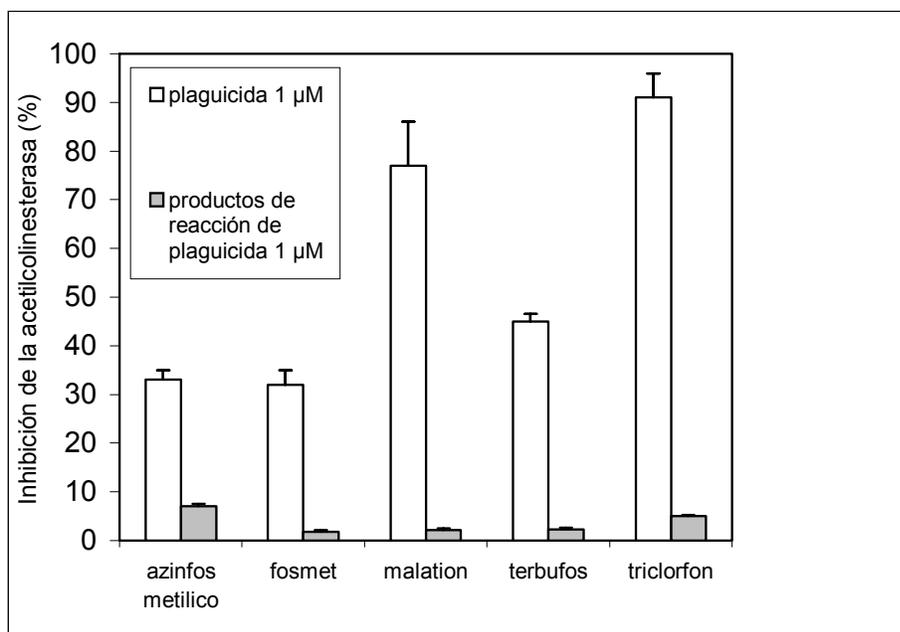


Figura 11. Efecto de distintos plaguicidas organofosforados y sus productos obtenidos de una transformación microsomal fungica, sobre la actividad de la acetilcolinesterasa.

Oxidación de colorantes industriales

Rodríguez y col. [87] identificaron la actividad decolorante en los hongos ligninolíticos para 27 colorantes de uso textil. La decoloración se llevó a cabo *in vivo* en un medio sólido y en fermentación líquida con las cepas de *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *Cladariomyces fumago*; resultando *P. ostreatus* la cepa con mayor capacidad decolorante en estos medios. Se estudiaron los extractos extracelulares de *P. ostreatus* en la fermentación líquida, así como aquellos provenientes de la fermentación en estado sólido utilizando trigo y avena como sustratos. Se encontró actividad decolorante en el fluido extracelular para 5 de 27 colorantes probados. La fermentación llevada a cabo en material ligninocelulósico estimuló considerablemente la actividad decolorante. Se comparó la capacidad de decoloración de *P. ostreatus* con 15 diferentes cepas de los géneros *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*,

Trametes y *Sporotichum* cultivados en avena (Tabla 5). Aquellos extractos extracelulares que presentaron actividad decolorante fueron, en su mayoría, obtenidos de las variedades de *Pleurotus* y *Trametes*. *P. ostreatus* y *T. hispida* tuvieron valores más altos de decoloración. Todas aquellas cepas que presentaron actividad decolorante, también presentaron actividad de lacasa. Se identificó a esta enzima como la responsable de la decoloración (Fig. 12). Las mayores actividades específicas fueron obtenidas de *T. hispida* y *P. ostreatus*. La lacasa fue parcialmente purificada a partir de los extractos obtenidos en fermentación en estado sólido de estas dos cepas. La enzima parcialmente purificada de *T. hispida* presentó mayor rango de decoloración y grado de pureza que la enzima de *P. ostreatus*. Se identificaron al menos dos isoenzimas. Con las isoenzimas obtenidas de *T. hispida* se realizaron los estudios de caracterización cinética utilizando ABTS (2,2'-azino-bis(etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)) y Azul Reactivo F-RL como sustratos modelo.

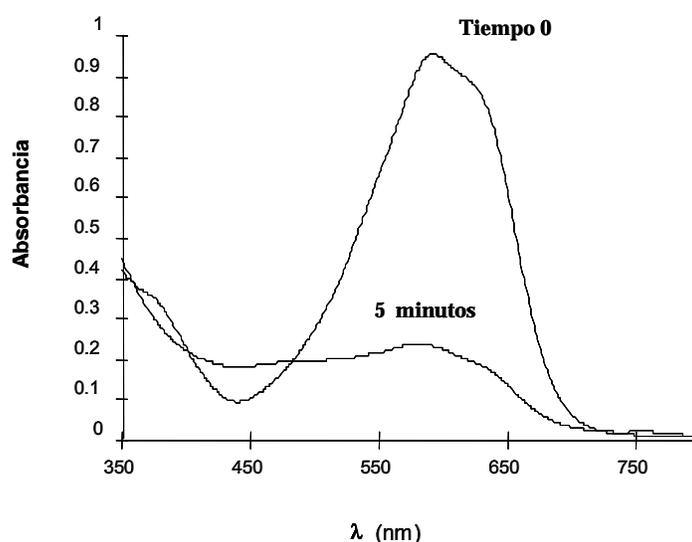


Figura 12. Decoloración del Azul Brillante Remazol R por la lacasa de *Trametes hispida*.

La capacidad biocatalítica de la lacasa abre nuevos campos de investigación enfocados a la optimización de técnicas de descontaminación no solo para colorantes sino para un gran número de compuestos xenobióticos recalcitrantes.

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad decolorante de la VP de *B. adusta*. En la tabla 6 se muestran las velocidades de decoloración de esta enzima purificada en dos diferentes condiciones de reacción: en presencia de manganeso y las condiciones reportadas como óptimas para su actividad de MnP y la otra en ausencia de manganeso y bajo las condiciones de la LiP.

Conclusiones

Como se ha mencionado, las enzimas ligninolíticas producidas por los hongos de la pudrición blanca son catalizadores poco específicos, que incluyen peroxidasas y lacasas. En ambos casos el mecanismo de reacción involucra la formación de radicales libres. Estas dos

características son muy buenas para fines ambientales ya que son capaces de oxidar una gran diversidad de compuestos orgánicos con estructuras químicas diversas.

Por otro lado en algunos casos la producción a gran escala, no parece representar un reto mayor. Sin embargo su clonación y expresión heteróloga es aún difícil y no se ha logrado más que la obtención de un número limitado de enzimas ligninolíticas. Esto último limita las posibilidades de realizar modificaciones moleculares con el objetivo de incrementar el potencial catalítico y especialmente la estabilidad operativa de las enzimas.

Tabla 5. Decoloración de colorantes de uso industrial por medio de la acción catalítica de extractos extracelulares crudos de diferentes cultivos de hongos ligninolíticos [87].

Cepa	Actividad decolorativa ^a ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ l}^{-1}$)				
	Azul reactivo Orisol	Azul ácido	Negro ácido	Azul Orisol	Turquesa
	185	185	194		
<i>B. adusta</i> (4312) ^b	nd ^c	nd	nd	nd	nd
<i>B. adusta</i> (7308)	940 - 1800	520 - 667	nd	nd	133 - 180
<i>B. adusta</i> (8258)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. ostreatus</i> (7964)	1300 - 2220	440 - 580	nd	nd	560-1040
<i>P. ostreatus</i> (7972)	1040 - 3320	140 - 460	0 - 160	0 - 180	400 - 480
<i>P. ostreatus</i> (7980)	8080 - 8420	1440	0 - 100	0 - 400	2040-3000
<i>P. ostreatus</i> (7988)	4180 - 10160	1580 - 3500	0 - 360	180 - 600	1800-6060
<i>P. ostreatus</i> (7989)	3860 - 6660	880 - 1960	0 - 460	160 - 320	1060-2580
<i>P. ostreatus</i> (7992)	1580 - 1820	60 - 600	0 - 40	0 - 260	0 - 780
<i>P. ostreatus</i> (IE8)	1060 - 9500	1160 - 2500	130 - 500	650 - 900	1200-2300
<i>P. chrysosporium</i> (3541)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. chrysosporium</i> (3642)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. chrysosporium</i> (ATCC)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>S. pulverulentem</i> (452)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>T. hispida</i> (8260)	14020 - 21700	2640 - 12840	420 - 740	240 - 780	2840-3720
<i>T. versicolor</i> (8272)	3480 - 14540	400 - 1220	0 - 840	360 - 840	480-900

^a Disminución de la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorbancia.

^b El número entre paréntesis indica el registro de la colección del Herbario Universitario de la Universidad de Alberta, Canadá.

^c No detectado.

Tabla 6. Velocidad de decoloración de diferentes colorantes industriales por la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*.

Velocidad de decoloración ($\Delta A/\text{min}$)			
Colorante (C.I.) ^a	Abs _{max}	pH 4 sin Mn ²⁺	pH 3 con Mn ²⁺
Acid black 194	570	0.86 (± 0.08)	0.08 (± 0.06)
Acid blue 185	620	5.45 (± 0.23)	5.25 (± 0.31)
Acid red 51	525	0.49 (± 0.04)	NR
Direct black 22	485	0.13 (± 0.01)	0.18 (± 0.02)
Direct blue 199	620	5.42 (± 0.34)	6.90 (± 0.13)
Direct blue 2	570	0.90 (± 0.11)	1.08 (± 0.04)
Direct green 6	620	0.52 (± 0.06)	0.08 (± 0.03)
Direct orange 26	495	0.74 (± 0.09)	0.81 (± 0.02)
Direct red 23	510	0.50 (± 0.06)	0.65 (± 0.04)
Direct yellow 58	415	NR	NR
Disperse black 1	560	NR	NR
Disperse blue 56	545	NR	NR
Disperse blue 73	580	NR	NR
Disperse blue 79	560	NR	NR
Disperse orange 30	455	NR	NR
Disperse red 1	440	NR	NR
Disperse red 60	535	NR	NR
Disperse red 72	510	NR	NR
Disperse red 161	470	NR	NR
Disperse red 167	620	NR	NR
Disperse yellow 3	440	NR	NR
Disperse yellow 54	430	NR	NR
Reactive black 5	595	2.25 (± 0.04)	2.50 (± 0.21)
Reactive blue 18	605	0.92 (± 0.11)	0.49 (± 0.04)
Reactive blue 19	590	0.76 (± 0.46)	1.28 (± 0.07)
Reactive blue 38	620	4.53 (± 0.03)	8.64 (± 0.36)
Reactive blue 72	665	0.20 (± 0.03)	0.60 (± 0.06)
Reactive blue 198	625	1.12 (± 0.02)	NR
Reactive green 19	610	0.44 (± 0.05)	0.29 (± 0.02)
Reactive orange 16	485	NR	NR
Reactive red 4	540	NR	NR
Reactive red 141	540	0.43 (± 0.05)	NR
Reactive red 180	540	NR	NR
Reactive yellow 2	400	NR	NR
Reactive yellow 84	410	NR	NR
Reactive violet 5	555	2.25 (± 0.03)	2.87 (± 0.21)
Solvent yellow 16	490	NR	NR
Sulfur black 1	635	NR	NR
Vat blue 7	605	NR	NR
Vat red 10	520	NR	NR
Vat yellow 46	440	NR	NR

^a C.I. Nombre del colorante según el Color Index.

NR. No reacción.

Referencias

1. Lin, S. Y., Dence, C. W. (1992) Methods in lignin chemistry. Springer-Verlag, Berlin.
2. Kirk, T. K., Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
3. Fritsche, W., Hofrichter, M. (1999) Aerobic degradation by microorganisms. En: Advances in biochemical engineering biotechnology. T. Scheper (Ed.), Springer-Verlag, Vol. 63. Biotransformations.
4. Hüttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A. (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:387-394.
5. Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23-63.
6. Fengel, D., Wegener, G. (1989) Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin.
7. Have, R., Teunissen, P. J. M. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101:3397-3413.
8. Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:20-33.
9. Fernando, T., Bumpus J.A., Aust S.D. (1990) Biodegradation of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1666-1671.
10. Field, J.A., Jong E.D., Feijoo-Costa G., de Bont J.A.M. (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIRTECH* 11: 44-49.
11. Kennedy, D.W., Aust S.D., Bumpus J.A. (1990) Comparative Biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2347-2353.
12. Bumpus, J.A., Kakar S.N., Coleman R.D. (1993) Fungal degradation of organophosphorus insecticides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39/40: 715-726.
13. Jaspers, C. J., Jiminez, G., Pennick, M. J. (1994). Evidence for a role of manganese peroxidase in the decolorization of Kraft pulp bleach plant effluent by *Phanerochaete chrysosporium*: effects of initial culture conditions on enzyme production. *J. Biotechnol.* 37:229-234.
14. Limura, Y., Hartikainen, P., Tatsumi, K. (1996). Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:434-439.
15. Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998b). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2788-2793.
16. Rodriguez, E., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38:27-32.
17. Aust, S. D. (1990). Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microb. Ecol.* 20:197-209.
18. Valli, K., Gold, M. H. (1991). Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 173:345-352.
19. Joshi, D. K., Gold, M. H. (1993). Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1779-1785.
20. Reddy, G. V. B., Gelpke, M. D. S., Gold, M. H. (1998). Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of reductive dechlorination. *J. Bacteriol.* 180:5159-5164.
21. Reddy, G. V. B., Gold, M. H. (2000). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146:405-413.
22. Hammel, K.E., Gai W.Z., Green B., Moen M.A. (1992) Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1832-1838.
23. Mileski, G.J., Bumpus, J.A., Jurek, M.A., Aust, S.D. (1988) Biodegradation of pentachlorophenol by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2885-2889.
24. Eaton, D.C. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 194-196.
25. Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D. (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.
26. Kullman, S.W., Matsumura, F. (1996) Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Appl. Environ. Microbiol.* 62; 2: 593-600.
27. Valli, K., Brock, B.J., Joshi, D.K., Gold, M.H. (1992) Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 221-228.
28. Bumpus J.A. (1989) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 154-158.

29. George, E.J., Neufeld R.D. (1989) Degradation of fluorene in soil by fungus *Phanerochaete chrysosporium*. CRC Crit. Rev. Toxicol. 17:25-65
30. Hammel, K. E., Kalyanaraman, B., Kirk, T. K. (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 261:16948-16952.
31. Eilers, A., Rüngeling, E., Stündl, U.M., Gottschalk, G. (1999) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 75-80.
32. Morgan, P., Lewis S.T., Watkinson, R.J. (1991) Comparason of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. Appl. Microb. Biotechnol. 34, 693-696.
33. Cripps, C., Bumpus, J.A., Aust, S.D. (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1114-1118.
34. Spadaro, J.T., Gold M.H., Renganathan, V. (1992) Degradation of azo Dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2397-2401.
35. Glenn, J.K., Gold, M.H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1741-1747.
36. Bumpus, J.A., Brock, B.J. (1988) Biodegradation of crystal violet by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1143-1150.
37. Zhang, F., Yu J. (2000) Decolourisation of acid violet 7 with complex pellet of white rot fungus and activated carbon. Bioproc. Eng. 23: 295-301.
38. Ericksson, K.E., Kolar M-C. (1985) Microbial degradation of chlorolignins. Environ. Sci. Technol. 19:1086-1089.
39. Kirk, T. K., Chang, H. M. (1975). Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. Holzforschung 29:56-64.
40. Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., Gold, M. H. (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:1077-1083.
41. Shimada, M., Higuchi, T. (1983) Recent advances in lignin biodegradation research. En: Recents advances in lignin biodegradation research. T. Higuchi, H. M. Chang y T. K. Kirk (Eds.), Uni Publishers. Tokio, pp 195-208.
42. Tien, M., Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Science 221:661-663.
43. Tien, M., Kirk, T. K. (1984). Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2280-2284.
44. Glenn, J. K., Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242:329-341.
45. Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A. T. (1998c). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. FEBS Lett. 428:141-146.
46. Mester, T., Field, J. A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. J. Biol. Chem. 273:15412-15417.
47. Bourbonnais, R., Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267:99-102.
48. Paszczynski, A., Crawford, R. L., Huynh, V. (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. Methods Enzymol. 161:264-270.
49. Paice, M. G., Reid, I., Bourbonnais, R., Archibald, F. S., Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. Appl. Environ. Microbiol. 59:260-265.
50. Urzúa, U., Kersten, P. J., Vicuña, R. (1998). Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. Appl. Environ. Microbiol. 64:68-73.
51. Sethuraman, A., Akin, D. E., Eriksson, K.-E. L. (1999). Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:689-697.
52. Van Aken, B., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A.I., Naveau, H., Agathos, S.N. (1999) Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. Biodegradation. 10:83-91.

53. Schneegab, I., Hofrichter, M., Scheibner, K., Fritsche, W. (1997). Purification of the main manganese peroxidase isoenzyme MnP2 from the white-rot fungus *Nematotoma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:602-605.
54. Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W., Hatakka, A. (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematotoma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1864-1870.
55. Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. J., Martínez, A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237:424-432.
56. Caramelo, L., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (1999). A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving a-keto-g-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:916-922.
57. Mester, T., Field, J. A. (1997). Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:161-168.
58. Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., Pickard, M. A. (2001). Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strains of *Bjerkandera adusta*. *Can. J. Microbiol.* 47:277-282.
59. Hammel, K. E., Kalyanaraman, B., Kirk, T. K. (1985). Mechanism of oxidative Ca-Cb cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. Stoichiometry and involvement of free radicals. *J. Biol. Chem.* 260:8348-8353.
60. Wariishi, H., Dunford, H. B., MacDonald, I. D., Gold, M. H. (1989). Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 264:3335-3340.
61. Wariishi, H., Valli, K., Gold, M. H. (1991b). In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:269-275.
62. Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53:253-263.
63. Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* 29:116-122.
64. Wariishi, H., Akileswaran, L., Gold, M. H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27:5365-5370.
65. Wariishi, H., Huang, J., Dunford, H. B., Gold, M. H. (1991a) Reactions of lignin peroxidase compounds I and II with veratryl alcohol. Transient-state kinetic characterization. *J. Biol. Chem.* 266:20694-20699.
66. Martínez, A. T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30:425-444.
67. Kuan, I. C., Tien, M. (1993). Stimulation of Mn-peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1242-1246.
68. Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H. B., Gold, M. H. (1994). Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. *Biochemistry* 33:8694-8701.
69. Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 269:32759-32767.
70. Blodig, W., Doyle, W. A., Smith, A. T., Winterhalter, K., Choinowski, T., Piontek, K. (1998). Autocatalytic formation of a hydroxy group at Cb of Trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry* 37:8832-8838.
71. Doyle, W. A., Blodig, W., Veitch, N. C., Piontek, K., Smith, A. T. (1998). Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 37:15097-15105.
72. Ayala Aceves, M., Baratto, M. C., Basosi, R., Vazquez-Duhalt, R., Pogni, R. (2001). Spectroscopic characterization of a manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centered radical by hydrogen peroxide. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 16:159-167.
73. Pogni, R., Baratto, M.C., Giansanti, S., Teutloff, C., Verdin, J., Valderrama, B., Lenzian, F., Lubitz, W., Vazquez-Duhalt, R. and R. Basosi (2005) Mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry* 44: 4267-4274.
74. Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., and Michael A. Pickard, M.A. (2003) Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polyaromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can. J. Microbiol.* 49: 675-682.
75. Shah, V., Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can. J. Microbiol.* 48:857-870.
76. Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer (Urushi). *J. Chem Soc* 43:472-486.

77. Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J. M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* 3:1-25.
78. Reinhamar, B. (1984) Laccase. En: Copper proteins and copper enzymes. R. Lontie (Ed.), CRC Press. Boca Raton, pp 1-35.
79. Bollag, J.-M., Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854.
80. Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic. Microbiol.* 41:185-227.
81. Agematu, H., Shibamoto, N., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. (1993). Oxidative decarboxilation of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:1877-1881.
82. Leonowicz, A., Edgehill, R. U., Bollag, J. M. (1984). The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* 137:89-96.
83. Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C.-L., Gratzl, J. S. (1995). Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *J. Org. Chem.* 60:4320-4321.
84. Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1876-1880.
85. Li, K., Helm, R. F., Eriksson, K.-E. L. (1998). Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27:239-243.
86. Reyes, P., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* 21:875-880.
87. Rodríguez, E., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38:27-32.
88. Bohmer, S., Messner, K., Srebotnik, E. (1998). Oxidation of phenantrene by fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:233-238.
89. Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1999a). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3805-3809.
90. Vandertol-Vanier, H. A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Pickard, M. A. (2002). Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of *Coriopsis gallica* laccase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29:214-220.
91. Mastrangelo, G., Fadda, E., Marzia, V. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* 104:1166-70.
92. Bogan BW, Lamar RT. (1995) One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2631-5.
93. Johannes C, Majcherczyk A. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000 66:524-8.
94. Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S., Fedorak, P. M. (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:459-466.
95. Vazquez-Duhalt R. (1998) Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Advances in Bioprocess Engineering II* (Galindo E. and Ramirez O.T. Eds.) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 183-207.
96. Durant, J.L., Busby, W.F. Jr, Lafleur, A.L., Penman, B.W., Crespi, C.L. (1996) Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat. Res.* 371:123-57.
97. Davila-Vazquez G, Tinoco R., Pickard M.A. and Vazquez-Duhalt R. (2005) Transformation of halogenated pesticides by versatile preoxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 36: 223-231.
98. Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998a). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165:43-50.
99. Dec, J., Bollag, J.-M. (1990). Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19:543-550.
100. Duran, N., Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B: Environ.* 28:83-89.

101. Jauregui J., Valderrama B., Albores A. and Vazquez-Duhalt R. (2003) Microsomal transformation of organophosphorus pesticides. *Biodegradation* 14: 397-406.
102. Ecobichon, D.J. (1996) Toxic effects of pesticides. In Casarett & Doull's Toxicology (C.D. Klaassen, M.O. Amdur, and J. Doull, Eds.), pp. 643-689. McGraw-Hill, New York.
103. Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M. J., Piontek, K. and Martínez, A. T. (2005). Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 354: 385-402.

ENZIMAS LIGNOLÍTICAS FÚNGICAS PARA FINES AMBIENTALES

Resumen

Los hongos ligninolíticos son los encargados principales de reciclar el carbón de la lignina. Para ello han desarrollado una estrategia de degradación que involucra una serie de enzimas, las cuales son poco específicas y que tienen la capacidad de producir radicales libres. Lignino peroxidadas, manganeso peroxidadas, peroxidadas versátiles y lacasas son enzimas extracelulares, quienes junto con el sistema enzimático intracelular, citocromo P450, son las encargadas de degradar la lignina. Estas enzimas son capaces, además, de transformar una gran diversidad de sustratos, que incluyen compuestos contaminantes y tóxicos. En este trabajo se realiza un análisis de la información existente sobre la capacidad de estas enzimas en la degradación de compuestos contaminantes con especial énfasis en los hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas y colorantes de uso industrial. Se discute el uso potencial de estas enzimas en la restauración y prevención de la contaminación ambiental.

Palabras clave: hongos ligninolíticos, degradación enzimática, biorremediación.

Semblanza del Dr. Rafael Vázquez Duhalt.



El Dr. Vázquez Duhalt nació el 5 de Enero de 1956, en la ciudad de México, D.F. Realizó estudios de Ingeniería Química Industrial en el Instituto Politécnico Nacional, estudios a nivel maestría en Química Analítica del Ambiente en la Universidad de Ginebra en Suiza y en Ecología Humana en el Centro Europeo de Ecología Humana, avalado por 7 Universidades Europeas. Además obtuvo el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas en la Universidad de Ginebra en Suiza. Después de trabajar tres años en el Centro de Investigaciones Biológicas en La Paz B.C.S., el Dr. Rafael Vázquez realizó una estancia posdoctoral de 3 años en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Alberta en Canadá bajo la dirección del Prof. Donald W.S. Westlake. Al terminar su estancia posdoctoral en 1993, se incorporó al Instituto de Biotecnología de la UNAM como Investigador titular y jefe de grupo.

Recién egresado trabajó durante casi tres años en la Fundación Mexicana para el Desarrollo Rural en donde realizó trabajos de organización y capacitación campesina. Promovió y diseñó proyectos agroindustriales para cooperativas campesinas en todo el país. Durante la etapa doctoral, el Dr. Vázquez Duhalt realizó estudios sobre el catabolismo y anabolismo de hidrocarburos. Debido a sus trabajos publicados durante ésta etapa, sobre la degradación bacteriana de aceites lubricantes usados, fue llamado por el Gobierno de Canadá, ya estando en México, para formar parte de un panel de expertos y revisar la legislación canadiense sobre la

disposición de productos peligrosos. Durante su doctorado realizó estudios sobre la producción de hidrocarburos por el alga *Botryococcus braunii* como fuente renovable de energía.

En México desde 1987, el Dr. Vázquez Duhalt trabajó en Centro de Investigaciones Biológicas, donde formó un grupo de investigación sobre el aprovechamiento biotecnológico de los cultivos de microalgas. Especialmente en la producción de aceites comestibles y terapéuticos. Fue nombrado Jefe del Departamento de Fisiología Vegetal, cargo que ocupó durante los dos últimos años en esa institución. Además, fue consultor de la Secretaría de Marina en derrames petroleros y de la Procuraduría del Consumidor en la calidad de combustibles.

Durante su estancia posdoctoral en la Universidad de Alberta en Edmonton Canadá, realizó estudios sobre la transformación enzimática de compuestos organoazufrados y asfaltenos presentes en el petróleo. Bajo la dirección del pionero de la microbiología ambiental, el Prof. Donald. W.S. Westlake y del Prof. Phillip M. Fedorak, exploró la capacidad catalítica de peroxidases de hongos ligninolíticos sobre los derivados del petróleo y en sistemas conteniendo solventes orgánicos.

A su regreso a México se incorporó al Instituto de Biotecnología de la UNAM donde formó un grupo de investigación en Biotecnología Ambiental y continuó sus trabajos sobre la actividad enzimática en compuestos contaminantes como hidrocarburos poliaromáticos, plaguicidas y colorantes industriales. El Dr. Vázquez Duhalt está actualmente estudiando, con herramientas químicas y genéticas, el diseño de biocatalizadores con mejor actividad y estabilidad para fines ambientales.

El Dr. Vázquez Duhalt ha sido consultor para el Environment Canadá (1993), Desert Energy Research Inc., U.S.A. (1994-1995), KAM Biotechnology Ltd., Canadá (1995), Instituto Colombiano del Petróleo. ECOPEPETROL (1995-1998), Petróleos Mexicanos, PEMEX-Refinación (1997), y la empresa Dinámica Agrícola y Ambiental S.A. de C.V. (2001-2004). Boehringer Ingelheim Vetmendica S.A. de C.V (2005). Se le ha otorgado una patente de Estados Unidos para un proceso enzimático de desulfuración de combustibles petroleros y tiene dos patentes nacionales de carácter ambiental. Ha publicado un libro de texto "Termodinámica Biológica" editado por AGT Editor y recientemente como compilador y autor de "Petroleum Biotechnology, developments and perspectives" publicado por Elsevier B.V.

El Dr. Vázquez Duhalt ha podido formar un grupo sólido de investigación y al mejor nivel mundial en aspectos de Biotecnología Ambiental. Sus colaboraciones con el Instituto Mexicano del Petróleo, el Instituto Colombiano del Petróleo, la Universidad de la Columbia Británica y la Universidad de Alberta en Canadá, la Universidad de Siena en Italia, y la Universidad de Murcia en España incluyen estancias de estudio y entrenamiento en el laboratorio del Dr. Vázquez de trabajadores y profesores de estas instituciones. En total ha formado 5 licenciados, 11 maestros y 6 doctores. Los estudiantes graduados bajo la dirección del Dr. Vázquez son, en su mayoría, investigadores en Universidades y Centros de Investigación. El Dr. Vázquez-Duhalt ha publicado 2 libros, 83 trabajos en revistas internacionales indexadas, 5 capítulos de libros, 14 memorias in extenso y 5 artículos de difusión científica. El Dr. Vázquez Duhalt es Investigador Nacional nivel III y ha sido invitado a dictar decenas de conferencias en México y en el extranjero.

El Dr. Vázquez Duhalt ha sido reconocido con el Premio Hilario Ariza Dávila en Investigación otorgado por el Consejo de Egresados ESQIE del Instituto Politécnico Nacional en el año del 2005. Además obtuvo el Premio Alfredo Sánchez Marroquín que otorga la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería por la Dirección de Tesis a la Mejor tesis de doctorado de Marcela Ayala Aceves en el año del 2003. En 2006 le fué concedida una Mención Honorífica al Mérito Ecológico por la SEMARNAT.

El Dr. Rafael Vázquez Duhalt es uno de los académicos, expertos en las ciencias ambientales, de mayor calidad científica del país, reconocido internacionalmente, y que ha contribuido de manera significativa en el avance de la ciencia y en la formación de recursos humanos en el área de la Biotecnología Ambiental



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EL CICLO CELULAR: MODELOS ANIMALES Y VEGETALES

Jorge Manuel Vázquez Ramos

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Apdo. Postal 20-364, Ciudad Universitaria, México, D.F., 01000, México

jorman@servidor.unam.mx

Abstract

Cell proliferation is driven by a series of complex molecular events known as the cell cycle. The four classic phases of the cell cycle, G₁, S, G₂ and M are in fact the consequence of the coordination of multiple biochemical processes that have as purpose the communication with the surrounding external milieu, the triggering of the cell cycle events, the coordination of cell cycle with cell growth, the regulation of DNA replication initiation, the perception that DNA replication has totally finished and that no damage or structural defects have accumulated, that chromosomes condense and move to the metaphase plane, with the concomitant rearrangement of the internal membrane system and, finally, that chromosomes are segregated and distributed equally between the two nascent cells, avoiding any possible biochemical regression. All these processes take place in a similar way in eukaryotes, whether uni or pluricellular, animals and plants, thus demonstrating that the basic processes that control the cell cycle have been conserved throughout evolution. In particular, this chapter emphasizes the similarities and differences between animal and plant cells. Unlike animal, plants are sessile organisms, exposed to the environmental conditions in which they develop without any possibility of "hiding" or moving. Therefore, the morphogenetic processes that model the structure of a plant will have ad hoc features, and cell proliferation will perform an essential task. Finally, a brief description of the main features of cell cycle during seed germination, a developmental process that is of fundamental importance for the life of plants, is included.

Keywords: Cell cycle, regulation, eukaryotes, animal cells, plant cells.

El ciclo celular

La proliferación celular requiere que las células incrementen su tamaño a tal punto que eventualmente se dividan, formando dos nuevas células. Cada una de estas células deberá contener una copia completa del material genético, el cual se duplicó durante el proceso de crecimiento celular y finalmente se distribuyó equitativamente entre las dos nuevas células. La coordinación de los eventos que permiten una proliferación ordenada está dada por el proceso conocido como Ciclo Celular. Tradicionalmente, el ciclo celular ha sido dividido en 4 etapas, las cuales son G1, S, G2 y M; una quinta etapa sería el proceso por el cual las células se separan formando dos nuevas, al que se denomina citocinesis. Al ciclo también se le puede dividir en dos fases: interfase y mitosis, donde la primera comprende las fases G1, S y G2. Generalmente durante la fase G1 (de gap o espacio), las células perciben las condiciones medio-ambientales en que se encuentran y comienza una etapa de crecimiento celular. Habiendo condiciones adecuadas para la proliferación, las células entrarán a la fase S (de síntesis), en la cual ocurrirá la duplicación del material genético (el DNA) que será posteriormente repartido entre las células hijas. La fase G2 (gap 2) tendrá como principal función el asegurarse que el material genético, o DNA, ha sido correctamente duplicado y que existen las condiciones necesarias para que se pueda repartir. Finalmente, durante la fase M (mitosis), los cromosomas duplicados son compactados, alineados en el plano de metafase y cada copia de los cromosomas es movilizadada hacia extremos opuestos de la célula, lo que permitirá la formación, primero de dos núcleos con idéntica información genética y, posteriormente, de dos nuevas células. Dado que es un ciclo, a la salida de M las células se encontrarán nuevamente en G1 y, si las condiciones ambientales son óptimas, una nueva ronda de eventos moleculares dará origen a un nuevo ciclo celular, promoviendo así la proliferación. En general, la regulación de los eventos que constituyen el ciclo celular es muy estricta y no es usual que las diferentes fases que lo constituyen cambien de orden, aunque algunos tipos celulares, tanto en los animales como en las plantas, pueden acortar o suprimir alguna de las fases del ciclo, como sucede durante la endoreduplicación típica, por ejemplo en los tejidos de reserva en las semillas de las plantas. Ahora bien, desde el punto de vista molecular y de regulación del ciclo, dentro de cada fase habría subfases, i.e., anafase temprana o anafase tardía, G1 temprano y G1 comprometido, dado que las condiciones bioquímicas que las definen son totalmente diferentes y, en general, no reversibles.

Ciclo celular en los animales

Las proteínas que participan en las diferentes fases que conforman el ciclo celular se pueden contar en los cientos y por esta razón, es fundamental que existan procesos altamente coordinados y regulados de tal forma que cada una de las fases ocurra en el tiempo y en la forma debida.

La primera evidencia sólida sobre la mecánica de la regulación del ciclo celular provino del trabajo con levaduras de fisión, en las que se encontró un producto génico que afectaba al ciclo en los puntos G1 y G2: el producto del gene *cdc2* (de *cell division cycle*); poco tiempo después, mediante experimentos de rescate de mutantes en el gene *cdc2* de levaduras de fisión, genes semejantes se encontraron en levaduras de gemación y en células humanas [1]. Lo anterior evidenció que en especies filogenéticamente muy alejadas había mecanismos conservados para la regulación del ciclo celular. El gene *cdc2* (o *cdc28* en levaduras de gemación), codificaba una proteína de 34 kDa que presenta actividad de cinasa [2]. Otro descubrimiento trascendental fue el encontrar, en células de invertebrados marinos, una conducta inusual de ciertas proteínas durante la interfase, ya que parecía que estas proteínas se sintetizaban en ciertas fases del ciclo para luego desaparecer abruptamente, particularmente hacia la entrada a la mitosis [3]. A estas proteínas se les llamó ciclinas, y sus genes fueron clonados y secuenciados, encontrando entonces que algunos genes semejantes ya se habían descrito en levaduras. Más interesante aún, estas proteínas ciclinas se asociaban a la proteína cinasa producto del gene *cdc2*, formando un complejo proteico con actividad de cinasa. De

entonces a la fecha, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que conducen y regulan al ciclo celular se incrementó exponencialmente, usando distintos modelos de trabajo, tanto animales como unicelulares y, mas recientemente, en plantas.

En todos los eucariotes, el ciclo celular es regulado por la acción de un complejo proteico con actividad de cinasa, formado por una proteína ciclina y por una cinasa dependiente de ciclina, o CDK (de *cyclin dependent kinase*). La investigación en diferentes sistemas biológicos ha aportado evidencia de que la estimulación de la proliferación requiere de la activación inicial de un complejo ciclina-Cdk, que en el caso de las levaduras de gemación corresponde a las ciclinas Cln [1-3] asociadas a la cinasa Cdc28 [4], mientras que en eucariotes superiores, el complejo está formado por ciclinas tipo D (D1 a D3) y cualquiera de dos tipos de cinasa, Cdk-4 ó Cdk-6 [5]. Estos tipos de complejos son importantes no solo porque le dan inicio y dirección al ciclo, sino porque también funcionan en el acoplamiento del ciclo con las condiciones medio-ambientales que determinan la iniciación de los eventos moleculares que permiten la proliferación [5]. En los eucariotes uni o pluricelulares la actividad de este complejo con actividad de cinasa es altamente regulada por los estímulos externos e intracelulares, como son la presencia de los factores de crecimiento, las hormonas, la presencia de nutrientes (fuente carbonada principalmente), suero y otras condiciones ambientales (Figura 1), todos las cuales promueven mecanismos de transducción de señales que finalmente activan al complejo con actividad de cinasa [6]. La regulación puede darse a niveles transcripcional, postranscripcional, traduccional o postraduccional. Por ejemplo, la ciclina D esta ausente en las células no proliferativas, pero la presencia de suero estimula su producción; no obstante, aún cuando esté presente y se encuentre asociada a una Cdk, la actividad de la cinasa será inhibida por proteínas inhibitoras específicas en G1 si las condiciones medio-ambientales no son propicias para iniciar los eventos del ciclo celular.

La función más relevante del complejo ciclina D-Cdk es la fosforilación, y de esta manera la inactivación de una proteína conocida como pRB (de retinoblastoma, por haberse hallado originalmente en tumores en ojo) cuyo propósito dentro del ciclo es el de impedir su continuación [7]; la ciclina D se asocia a la proteína pRB mediante una secuencia, LXCXE, presente generalmente en el extremo amino de las ciclinas D [8]. El mecanismo por el cual pRB logra detener al ciclo involucra el secuestro de un factor transcripcional, formado por las proteínas E2F y DP (figura 1). Este es un factor fundamental para el avance hacia la fase S, ya que la acumulación de un buen número de proteínas que participan en la transición G1-S y en la fase S dependen de su acción [9]. Al ser blanco de fosforilación por un complejo ciclina D-Cdk, pRB también resulta ser un factor proteico controlado por el entorno en el que se encuentran las células. En condiciones poco propicias para la proliferación, pRB inhibe el avance del ciclo y las células se mantienen en G1. Cuando el entorno cambia y las señales de proliferación son fuertes y predominantes, pRB es fosforilada e inhibida, lo que permite así el avance, ya irreversible, hacia la fase S. Este mecanismo es también un importante punto de control para evitar que las células que van saliendo de un ciclo anterior, prosigan hacia uno nuevo sin haberse percatado si las condiciones del entorno son las adecuadas; esto constituye lo que se conoce como un control tipo checkpoint, o de aduana.

El término E2F comprende al menos 8 diferentes tipos de factores en las células de los mamíferos, de los que del 1 al 3 son potentes activadores transcripcionales de los genes de la fase S, mientras que los factores 4 y 5 se encuentran preferentemente en las células en quiescencia y se especula que controlan la salida del ciclo y el comienzo de un programa de diferenciación terminal. Los E2F del 6 al 8, al carecer de dominio transactivacional, se sugiere que actúan como represores de la transcripción [10,11].

Fase G1 del ciclo celular

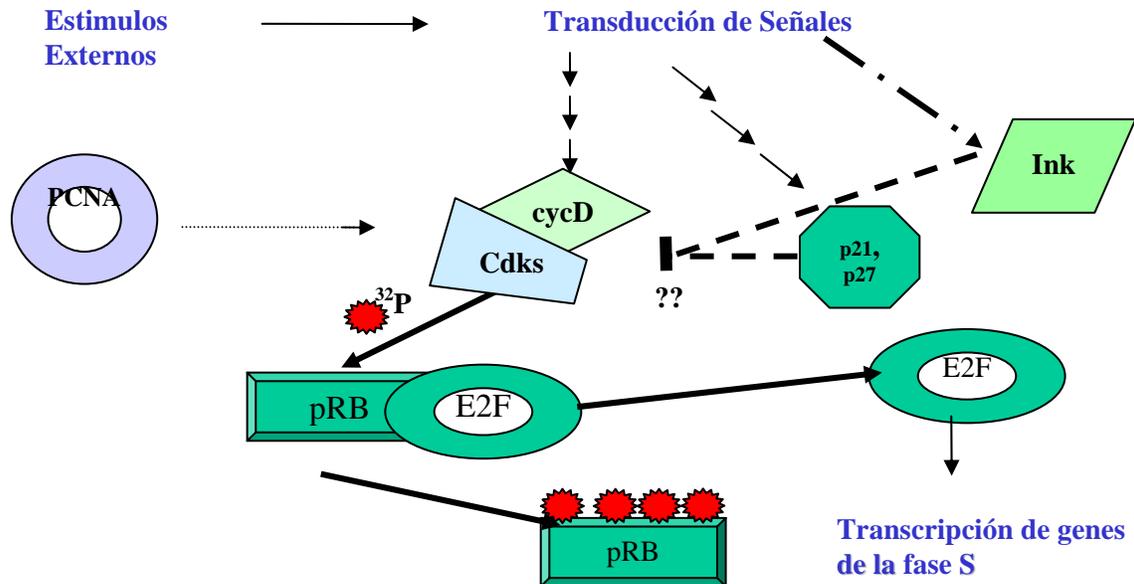


Figura 1. Eventos fundamentales en el control del inicio del ciclo celular eucariote. La transducción de señales derivada de los estímulos mitogénicos externos que reciben las células permite la activación de una cascada de señales que finalmente provocará la activación del complejo ciclina-cinasa de G1 el que, a su vez, encenderá los eventos moleculares de inicio del ciclo. Esencial para el avance del ciclo es la inhibición por fosforilación de la proteína pRB y la liberación del factor transcripcional E2F, fundamental para la promoción de la expresión de genes que participan y/o regulan los eventos de la transición G1-S. Paralelamente, la cascada de activación del ciclo puede también provocar la acumulación de proteínas como p21, p27 e Ink, que tienen como función inhibir la acción de las ciclinas-cinasas, cooperando así a regular los tiempos del ciclo.

pRB no es la única proteína que inhibe el avance del ciclo; el complejo ciclina D-Cdk4 [6] es blanco de al menos otras dos familias de inhibidores de las Cdk, denominados Cip/kip (de Cdk interacting protein ó kinase inhibitor protein) e Ink4 (de inhibitor of Cdk4) [12]. La familia Cip/Kip contiene tres miembros: p21, p27 y p57 y tiene como blancos a los complejos formados por ciclina D-Cdk4 [6], o bien ciclina E-Cdk2. La familia Ink4 tiene 4 posibles miembros: p15, p16, p18 y p19, y al menos p15 y p16 inhiben directamente a la Cdk4 [12]. La expresión de estos inhibidores es regulada por señales tanto internas como extracelulares, que tienen como propósito evitar el avance del ciclo si no están dadas las condiciones ambientales, metabólicas o de integridad del DNA. Su tiempo de acción es primariamente durante la fase G1, aunque la acción de algunas de estas proteínas podría extenderse hacia G2. Un elemento adicional de control de la fase G1 del ciclo lo constituye la presencia de un conglomerado proteico, con actividad de proteasa, que previene la acumulación de ciclinas de la fase G1 si las células no han salido apropiadamente de la fase M, o bien si no existe el potencial para entrar irreversiblemente a la fase G1; este complejo proteico, conocido como el proteasoma, evita la acumulación, entre otras proteínas, de las ciclinas de G1 [13,14] por lo que el avance del ciclo dependerá también de la inhibición del proteasoma. Toda esta gran variedad de proteínas que inhiben o regulan la acumulación de complejos ciclina-Cdk refleja claramente la importancia que tiene el que las células estén absolutamente seguras de que todo está bajo control antes de comprometerse irreversiblemente a completar un ciclo celular.

Otra proteína que, aparentemente, es un acompañante usual de los complejos ciclina-Cdk es PCNA (de proliferating cell nuclear antigen), particularmente durante G1 [5]. PCNA, un homotrímero en forma de dona (Fig. 2) que originalmente se encontró como una proteína accesoria de las DNA polimerasas replicativas [15], podría servir como una deslizadera para que el complejo ciclina-cinasa encuentre sus proteínas blanco sobre el DNA; uno de estos blancos podría ser la proteína pRB.

HOMOTRIMERO DE PCNA

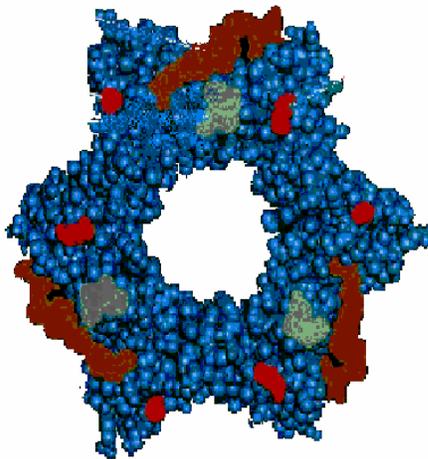


Figura 2. Activación del origen de replicación eucariote. El principal punto de regulación de la replicación del DNA es el origen de replicación. Una serie de proteínas reconocen y se acumulan gradualmente sobre la secuencia de inicio para permitir la apertura de las dos cadenas, de una manera dependiente del progreso del ciclo. Así, las proteínas ORC (1 al 6) reconocen y se acomodan sobre la secuencia de origen, permitiendo de esta manera la llegada de dos proteínas regulatorias importantes, Cdc6 y Cdt1, las que son fundamentales como receptoras del complejo proteico MCM (2 al 7), que constituyen la helicasa que abrirá el DNA y permitirá la entrada del aparato de replicación (Tomado de: Tsurimoto, T. (1998) BBActa, 144:23-39)

Como se mencionó, la fosforilación de pRB provoca su inactivación y la consiguiente activación del factor transcripcional E2F/DP, de los que existen varios miembros; un número importante de genes son blanco de cualquiera de los miembros de la familia E2F/DP, pero para propósitos de este artículo, baste decir que se activan una serie de genes cuyos productos participan tanto en la transición G1/S como en la fase S. Ejemplos de estos productos génicos son la ciclina E, la ciclina asociada a la cinasa Cdk2, la ciclina A y Cdk2; algunas proteínas esenciales para la iniciación de la replicación como las ORC (de origin recognition complex) y las MCM (de minichosome maintenance), proteínas de la replicación como la DNA polimerasa alfa, la DNA primasa, la DNA ligasa, PCNA; las proteínas de la fase G2 como Cdc25 y p34Cdc2 (Cdk1) y muchas otras proteínas del metabolismo del DNA [16]. El complejo formado por ciclina E-Cdk2 participa también en la fosforilación de la proteína RB, apoyando la acción de ciclina D-Cdk en la liberación del factor transcripcional E2F/DP y de esta manera al inicio de la fase S. Ciclina E-Cdk2 participa igualmente, y de una forma aún no bien entendida, en la regulación de

la iniciación de la replicación del DNA, en los orígenes de la replicación, muy probablemente junto con otra cinasa formada por las proteínas Dbf 4-Cdc7 [17].

La iniciación de la replicación del DNA en los eucariotes depende del previo reconocimiento de los sitios donde esto ocurrirá, los cuales son conocidos como orígenes de la replicación. A diferencia de las bacterias y de las levaduras de gemación, no existe en los eucariotes pluricelulares una secuencia de DNA definida, indicativa de la presencia de un origen, y estos orígenes son mas bien "marcados" por un conjunto proteico que reconoce ciertas características de la estructura del DNA para unirse y permitir su posterior activación. Estas son las proteínas ORC, de las que se conocen 6 diferentes tipos, todas las cuales cumplen con una función esencial en el reconocimiento y, probablemente también, en la activación de cada origen de la replicación. La presencia de las proteínas ORC unidas a la cromatina permite el posterior ensamblaje de otras 8 proteínas, las 6 MCM y los productos proteicos de los genes *cdc6* y *cdt1* [18]. Las proteínas *Cdc6* y *Cdt 1* realizan una función vital para la regulación de la iniciación, acoplado las fases previas del ciclo con la fase S, pero además, funcionan como plataforma para la unión de las proteínas MCM (Fig. 3). La función de estas últimas había sido una incógnita hasta que se encontró que al menos un subconjunto de las MCM funciona como la helicasa requerida para lograr el avance de la horquilla de replicación una vez que la síntesis de DNA ha comenzado. Pero para que la activación de los orígenes ocurra, esto es, para que la región de DNA intervenida se abra y permita la entrada de las proteínas de replicación, es necesaria la acción de las dos cinasas de G1/S mencionadas arriba, ciclina E-Cdk2 y Dbf4-Cdc7 (o DDK, de Dbf4-dependent kinase). Los blancos de fosforilación de estas cinasas es aun materia de especulación, pero se sabe que varias de las proteínas ORC y de las proteínas MCM, se fosforilan previo a la activación de los orígenes [17]. La fosforilación de ambas, *Cdc6* y *Cdt1*, es también un evento regulatorio previo a, y durante, la replicación del DNA, lo que por cierto permite la eliminación de estas proteínas, para evitar procesos de reduplicación del DNA, esto es, que la replicación ocurra una, y solo una vez por ciclo [17,18]. Aparentemente, como resultado de los procesos de fosforilación, las proteínas MCM 4, 6 y 7 despliegan su actividad de helicasa, o sea, realizan trabajo sobre el DNA para abrir ambas cadenas, en ambas direcciones [18], exponiendo las cadenas sencillas de DNA sobre las que actuarán la DNA primasa y la DNA polimerasa. Previo al inicio de la adición de nucleótidos por la primasa y la polimerasa, se requiere la llegada de la proteína RP-A, probablemente la primer proteína en ocupar las cadenas sencillas de DNA; RPA, un complejo heterotrimérico, tiene funciones parecidas a las proteínas de unión a la cadena sencilla de DNA o SSBs bacterianas, aunque no solo protege a la cadena sencilla del ataque de las nucleasas o le impide reasociarse en una doble cadena, sino que constituye una plataforma de reconocimiento para la DNA polimerasa [19]. Ahora bien, ninguna DNA polimerasa descrita a la fecha es capaz de iniciar la síntesis de DNA por si sola y requiere necesariamente de la existencia de un cebador de RNA que le proporcione un extremo 3'OH para comenzar su acción catalítica. Esta acción es llevada a cabo por las DNA primasas las que, en los eucariotes a diferencia de las enzimas procariones, son parte del complejo proteico que constituye la DNA polimerasa alfa [19], un conjunto de 4 proteínas diferentes de las que un heterodímero son la DNA primasa. La unión de la DNA polimerasa alfa al DNA, en el sitio donde se encuentra RP-A, depende de la acción del producto proteico del gene *cdc45*, cuya forma de actuar no se comprende aún [20].

Una vez que la DNA polimerasa alfa ha sido ubicada sobre la cadena sencilla del DNA, su actividad de primasa actúa sintetizando un cebador de RNA de 15 a 30 nucleótidos, el cual es prolongado por la adición de desoxinucleótidos por la actividad de la DNA polimerasa alfa, formando un polímero probablemente no mayor de 100 nucleótidos, el cual tendrá que ser extendido por otra DNA polimerasa replicativa [21]. Aun no es claro por qué los eucariotes tienen una DNA polimerasa que hace funciones de primasa y que, además, no es capaz de extender el DNA logrando su completa duplicación.

ORIGEN DE REPLICACION EUCARIOTE

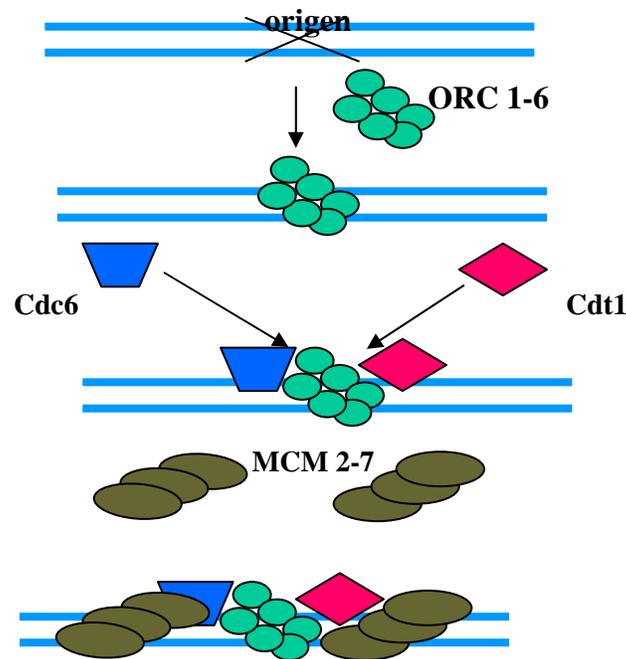


Figura 3. Estructura de la proteína Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA). La proteína PCNA se estructura como un homotrímero en forma de dona con un diámetro interno de 3 nm por donde pasa el DNA. Esta proteína es un factor esencial para la replicación del DNA, pero además se asocia a múltiples proteínas del metabolismo del DNA, entre ellas las ciclinas-cinasas, probablemente para permitirles encontrar sus proteínas blanco dentro del DNA.

Las verdaderas DNA polimerasas replicativas deberían tener como característica ineludible la de poder copiar un molde de DNA de cientos o miles de nucleótidos sin despegarse, esto es, ser procesivas. En este sentido, la DNA polimerasa alfa no es una verdadera enzima replicativa, aun cuando es una enzima vital, i.e., la eliminación de cualquiera de los genes que la conforman es letal. Las DNA polimerasas delta y épsilon de eucariotes son enzimas replicativas y procesivas. La DNA polimerasa delta es una enzima heterotrímica, altamente fiel durante el copiado de la hebra molde y también altamente procesiva, característica que es debida a su asociación con la proteína PCNA, la que funciona como una pinza deslizando sobre el DNA para la polimerasa. La DNA polimerasa épsilon, una proteína heteropentamérica, también hace uso de PCNA, aunque no es evidente un requerimiento absoluto por este factor proteico para su procesividad [15, 21]. Como se mencionó, la función de PCNA en estos complejos proteicos es el de formar un anillo homotrímérico que rodea al DNA; en este caso en particular, lo hace sobre la estructura de transición que forma la cadena sencilla de DNA recientemente cebada, dejando en evidencia la presencia de un extremo protruyente 3'OH, fundamental para la posterior elongación de la cadena por cualquiera de las DNA polimerasas replicativas, delta o épsilon [15]. Las DNA polimerasas delta o épsilon reconocen la estructura DNA-PCNA y usan a PCNA como una pinza deslizando para moverse sobre el DNA, añadiendo nucleótidos. No es claro aún cual DNA polimerasa actúa sobre cual cadena de DNA, la líder o la retrasada; sin embargo, la lógica pareciera indicar que la DNA polimerasa delta actúa preferentemente sobre la cadena líder y la épsilon sobre la cadena discontinua. Un problema adicional se presenta cuando se reflexiona

sobre quien une a PCNA, sobre las cadenas de DNA. Para esto existe un complejo heteropentamérico llamado RF-C (de Replication Factor C) que tiene como función unir y, aparentemente también liberar, a PCNA [19]. En la mecánica de la reacción se especula sobre el trabajo que se hace sobre una de las tres subunidades (idénticas) de PCNA, para permitir una apertura transitoria del anillo de PCNA tanto para su unión, como para su liberación, del DNA. Este mecanismo debería aplicar igualmente para ambas cadenas de DNA, la líder y la discontinua. En este último caso, resulta importante considerar que la cadena discontinua crece en forma de fragmentos de DNA que se van uniendo gradualmente hasta producir un DNA de alto peso molecular, llamados fragmentos de Okazaki, gracias a la acción de la DNA ligasa y de un conjunto de enzimas que tienen como función la eliminación del RNA cebador presente en los fragmentos de Okazaki [21].

El proceso de la elongación de la replicación es también blanco de la regulación por las ciclinas-CDKs, particularmente por ciclina A/Cdk2. Las proteínas como la DNA polimerasa alfa, algunas MCM o bien alguna de las subunidades de RF-C, parecen ser blanco de fosforilación por esta cinasa [22]. Aunque la evidencia obtenida no es todavía concluyente, pareciera ser que ciclina A-Cdk2 provoca la inhibición de algunas de estas proteínas, lo que pareciera una acción contraria a lo que debiera suceder durante la fase S. Sin embargo, debe considerarse que durante la maduración de los fragmentos de Okazaki, o bien cuando se encuentran las horquillas de replicación, se debe de producir un desensamblaje de las proteínas y actividades enzimáticas, para ser reubicadas en otro lugar y este proceso podría ser regulado por eventos de fosforilación/desfosforilación.

Una vez que han terminado de duplicar al DNA, las células pueden entrar a la fase G2. En realidad no se produce estrictamente un "cambio de fase", sino que desde que está ocurriendo la fase S existen factores proteicos que vigilan que el DNA se replique completamente y que no se produzcan o acumulen defectos en la estructura del DNA que pudieran detener al ciclo, o que pudieran ocasionar una repartición inadecuada (y potencialmente deletérea) del material genético durante la mitosis [4]. El mecanismo de regulación involucra la inhibición de la actividad de la cinasa responsable de la transición G2/M, formada por la ciclina B y la cinasa Cdk1, sobre las que actúan una serie de proteínas regulatorias. Cdk1 corresponde a la proteína p34Cdc2, descubierta originalmente en las levaduras de fisión y posteriormente en los invertebrados marinos y células del humano [2]. Mientras que Cdk1 es una proteína relativamente estable, sin grandes fluctuaciones en su concentración durante el ciclo, la ciclina B comienza a acumularse durante la fase S y alcanza su máximo en G2; la asociación con Cdk1 también es gradual [23] y en un principio, este complejo carece de actividad de cinasa, la cual aparece según avanza la fase G2, siempre y cuando no haya signos de un DNA defectuoso replicado de manera incompleta [24]. La regulación negativa de la actividad de la cinasa está dada por eventos de fosforilación en la tirosina de la posición 15 y la treonina de la posición 14 en Cdk1, llevados a cabo por los productos proteicos de los genes *wee1* y *myt1* [23]. Son este tipo de cinasas las que son activadas por la señalización resultante de una horquilla de replicación detenida, daños en el DNA, o estructuras defectuosas del DNA, señalización que también se manifiesta, en general, por cascadas de fosforilación/desfosforilación por enzimas presentes durante la fase S y que previenen un comienzo anticipado de la fase G2, o peor aún, de la fase M [23]; este evento constituye otro ejemplo de una regulación de checkpoint o de aduana. Por lo tanto, la fase G2 permanecerá inhibida en tanto la cinasa p34Cdc2 se encuentre fosforilada en ciertos residuos de aminoácidos. La activación del complejo de la ciclina-cinasa de G2 dependerá de la aparición de una actividad de fosfatasa que elimine el fosfato del par de aminoácidos modificados por *Wee1* y *Myt1*. El producto del gene *cdc25*, una fosfatasa dual de tirosina y treonina/serina, es la proteína responsable de la activación de ciclina B-Cdk1 al eliminar los fosfatos inhibitorios sobre Cdk1 [23]; no es de extrañar que esta fosfatasa sea de igual manera el blanco de una regulación tipo checkpoint, mediante una fosforilación inhibitoria, ya que una proteína Cdc25 activa desde la fase S ocasionaría que la cinasa de G2 se activara antes de tiempo, con el subsecuente ingreso de las células a la fase M en condiciones en que no se hubiera terminado de replicar el DNA,

muy probablemente con consecuencias letales. Un elemento de control adicional está dado por el requerimiento de una nueva fosforilación, en este caso estimuladora, de la cinasa Cdk1 en la treonina 160 por una cinasa denominada CAK (de Cdk Activating Kinase). Solo bajo la conjunción de todas estas condiciones es que la cinasa de G2 puede ahora desempeñar su función como inductor de la G2/M y de esta manera el establecimiento de la fase M [23]. Múltiples blancos se han demostrado, o propuesto, de la acción del complejo Ciclina B-Cdk1, entre los que se encuentran las láminas de la membrana interna nuclear, algunas proteínas del citoesqueleto y del huso mitótico, las proteínas del proteasoma de la fase M, las proteínas centroméricas y del cinetocoro y muchas otras. Una consecuencia directa de la acción de esta cinasa es el desensamblaje de la envoltura nuclear y la reorganización del citoesqueleto para comenzar con la formación del huso mitótico. El movimiento por el que los cromosomas se orientan hacia el centro de la célula y forman el plano de metafase y su posterior y abrupta separación al comienzo de la anafase serían también, directa e indirectamente, producto de la acción de Ciclina B-Cdk1 [24]. Este mecanismo involucra la activación del proteasoma de la fase M, conocido como el Complejo Promotor de la Anafase, o APC, que en última instancia es responsable de la degradación de la ciclina B y, por lo tanto, de la gradual inactivación de la cinasa de la fase M, lo que lleva a que las células completen la telofase y salgan nuevamente hacia una G1 temprana [25]. La degradación de la ciclina B, y la consecuente inhibición de la cinasa acompañante, es también un requisito para que comience, desde los finales de la fase M y en la G1 temprana, la serie de eventos requeridos para reensamblar las proteínas de reconocimiento de los orígenes de replicación, esto es, las proteínas ORC.

Ciclo celular en plantas

Aunque aún lejos de ser comprendidos en la manera en que se conocen los eventos en las células animales, los procesos que regulan el ciclo celular en las células vegetales han demostrado ser sorprendentemente semejantes, tanto en las proteínas que participan como en los mecanismos primarios de acción, lo que implica que los principios básicos del ciclo celular se han conservado a lo largo de la evolución. Esto a pesar de que hay claras diferencias entre animales y plantas en la forma en que se estructuran los organismos, siendo la organogénesis en plantas, a diferencia de los animales, un proceso casi completamente postembrionario, con una capacidad potencial de producir nuevos órganos, como raíces, hojas, tallos, flores, mediante conjuntos celulares particulares que proliferan y eventualmente siguen un programa de diferenciación específico [26], de tal forma que estos patrones organogenéticos pueden permanecer latentes y activables durante el periodo completo de vida de las plantas, permitiendo así un constante incremento en la talla y arquitectura del organismo. Dados ciertos cambios en el medio ambiente y promovidos por cambios hormonales internos, estos paquetes celulares pueden entonces desdiferenciarse en un momento dado, proliferar y eventualmente seguir un nuevo camino morfogénico particular que permita la aparición de las nuevas estructuras.

El descubrimiento de la existencia de una proteína semejante a p34Cdc2 fue la primera evidencia de conservación de los procesos del ciclo celular [27] y poco después se clonaron los genes correspondientes de maíz (*Zea mays*), de *Arabidopsis*, de alfalfa (*Medicago sativa*) y de chícharo (*Pisum sativum*) y se estudió su expresión en diferentes tejidos [28,29, 30,31]. Las primeras ciclinas también se descubrieron por esos años [32]. De entonces a la fecha, la búsqueda de las ciclinas y de las cinasas tipo Cdk resultó en la descripción de varias decenas de ciclinas de diferentes tipos, y varias Cdk, particularmente en *Arabidopsis*, aprovechando el hecho de que su genoma había sido secuenciado en su totalidad. Las ciclinas de las plantas han sido agrupadas en diez diferentes familias, mientras que las Cdk se han agrupado en cinco diferentes familias.

Ciclinas y Cdk en las plantas

El número de las ciclinas presentes en plantas pareciera ser mayor que el que se ha descrito para las células animales. Tan solo en *Arabidopsis* se ha descrito la existencia de 49

diferentes ciclinas, de las que las mejor descritas pertenecen a las familias A, B y D. En general las ciclinas se distinguen por una secuencia poco conservada, conocida como caja de las ciclinas, a la que se une la Cdk. Dentro de las ciclinas A se pueden encontrar tres subtipos, CycA1, CycA2 y CycA3 y cada uno de éstos tiene variantes (10 en total); también existen de la misma manera tres subgrupos de ciclinas B (B1 a B3) con sus variantes (9 en total). Las ciclinas D (9 en total) están comprendidas en seis subgrupos (D1 a D6) y algunos de ellos con variantes [33,34, 35,36].

Las ciclinas A y B se asocian a los procesos que ocurren entre la fase S y la fase M. Se ha demostrado mediante cultivos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*, [37], *Arabidopsis* [38], *Catharanthus* [39] y arroz (*Oriza sativa*, [40]), que la expresión y acumulación de los transcritos para las ciclinas tipo B ocurre en la fase G2 tardía y particularmente en la fase M; por otra parte, la acumulación de los transcritos de las ciclinas A comienza desde la fase S. No ha sido demostrado fehacientemente que estas ciclinas A tengan una función específica dentro de la fase S, aunque podrían actuar de manera análoga a como lo hacen las ciclinas A en células animales.

Las ciclinas A y B presentan en su estructura secuencias requeridas para su degradación, llamadas cajas de destrucción, las que son fundamentales para que se dé el recambio de las ciclinas durante el ciclo y se permita la transición entre fases [41]. Se ha demostrado la existencia de subunidades del proteasoma en las plantas y se ha descrito su actividad, distribución y regulación [42].

Como se mencionó, las ciclinas D presentan una característica definida, que es la secuencia de los aminoácidos LXCXE en su extremo amino terminal, por la que se unen a la proteína RB [9]; esta secuencia está presente en el extremo amino de las ciclinas D de las plantas y se ha demostrado que se unen a la proteína RBR (o relacionada a RB) vegetal. Las ciclinas D presentan lo que se conoce como caja de ciclinas, las que pueden ser mono o bipartitas y la similitud es relativamente baja entre las diferentes proteínas [43]. Al igual que todas las ciclinas, las tipo D deberían ser de una vida media relativamente corta; sin embargo, la vida media de las diferentes ciclinas D en las plantas varía; esto podría deberse a que no todas presentan la secuencia de degradación típica, o caja PEST (por la secuencia de aminoácidos presente, [44,105]) y no existe evidencia de otro tipo de secuencia involucrada en el recambio proteico.

Diversos estudios han mostrado que las ciclinas D de las plantas muestran una expresión dependiente del ciclo y son responsivas a la acción de los factores de crecimiento, nutrientes y hormonas. Por ejemplo, en cultivos celulares de tabaco, la CicD3 se induce en G1 en cultivos sincronizados [44]. En cultivos celulares de *Arabidopsis* la sacarosa, la cual es el metabolito más importante que se produce durante la fotosíntesis, induce la expresión tanto de la CicD2 como de la CicD4 [45,34]. En estos mismos cultivos, la expresión de la CicD3 es inducida por la combinación de la sacarosa y de la hormona citocinina y en las plantas completas o sus explantes, la sobreexpresión de la CicD3 hará a las plantas independientes a la acción de citocininas para proliferar, lo que implica que el ciclo celular se activa a partir de la expresión de esta ciclina [45, 46]. Otro tipo de hormonas, los brasinosteroides, también inducen la expresión de la CicD3 [47], aunque se desconoce el mecanismo de estimulación, el cual podría estar ligado a la acción de otro tipo de hormonas, las auxinas. Sin embargo, habría que considerar que lo descrito para las ciclinas de *Arabidopsis* podría no ser idéntico en otros sistemas vegetales; por ejemplo, en maíz, la expresión de la ciclina D2 responde a la acción conjunta de las citocininas y la sacarosa [48], semejante a como ocurre con la D3 de *Arabidopsis*. Adicionalmente, la expresión de las ciclinas D1, D2 y D4 de maíz se incrementa notablemente por acción de las auxinas, no así de las citocininas [105]. Probablemente los genes de las ciclinas D respondan diferencialmente a diversas condiciones ambientales y hormonas en cada tejido vegetal [43] y, de una manera individual, en cada especie vegetal.

Las cinasas dependientes de las ciclinas (Cdks) en las plantas se han agrupado en 5 categorías diferentes, dependiendo del tipo de secuencia de unión a las ciclinas que presentan [49]. La proteína p34Cdc2 de las levaduras y de los mamíferos presenta una secuencia PSTAIRE en el sitio de unión a las ciclinas, la cual fue la primera en ser caracterizada y definió la existencia de las Cdks 1 y 2. En las plantas, la proteína Cdk-A es la cinasa estructuralmente homóloga a la Cdk1 y presenta el motivo PSTAIRE. A semejanza con las levaduras y a diferencia con las células de mamíferos, CdkA es activa desde G1 hasta G2, muy probablemente está asociada a diferentes ciclinas [49,50] y es la ciclina que se ha conservado en todas las especies vegetales estudiadas. Dependiendo de la especie, puede haber uno o dos diferentes genes codificando para CdkAs. Aparentemente *Arabidopsis* tiene solo uno, pero en maíz existen dos genes virtualmente idénticos, los que difieren sólo en las regiones no traducibles 3' y 5' [28].

CdkA se une a ciclinas de diferente tipo en distintas especies vegetales; por ejemplo, CicA2;1 de alfalfa se une a CdkA [51]; las proteínas CicD2;1 y CicD3;1 de tabaco se unen a CdkA *in vivo*, y en estos complejos la cinasa fosforila a la proteína RBR endógena [52]. En *Arabidopsis*, CicD2 y CicD3 interactúan con una Cdk formando complejos con actividad de cinasa sobre la histona H1 [53].

La regulación de la Cdk *in vivo* parece ocurrir de manera semejante a como ocurre en todas las células eucariotas estudiadas. En las células de tabaco incubadas en ausencia de las citocininas, CdkA se acumula en G2, aunque sin actividad enzimática, la cual se incrementa según se añade la hormona. La diferencia está en el estado de fosforilación de la cinasa: en ausencia de la hormona, CdkA se encuentra fosforilada en una tirosina inhibitoria; la adición de las citocininas provoca la desfosforilación, y activación, de CdkA [54]. La homóloga de la cinasa inhibitoria de CdkA, Wee1, se describió en el endospermo de maíz [55], aunque la fosfatasa estimuladora, el producto del gene *cdc25*, no se ha encontrado en ningún sistema vegetal estudiado hasta la fecha; probablemente esto implique que otra fosfatasa, no relacionada, pudiera tener esta función en las plantas.

La búsqueda de las proteínas tipo Cip/Kip ha dado como resultado la descripción de al menos 7 diferentes tipos de proteínas con homología a p27 de los animales, las que se denominan KRPs (kinase regulatory proteins) o ICKs (inhibitor of cyclin dependent kinases). Se ha demostrado que las 7 proteínas son capaces de unirse a las ciclinas tipo D y solo algunas se unen directamente a CdkA [56], inhibiendo su actividad de cinasa [57,58]. La inducción de algunas de ellas por el ácido abscísico, una hormona inhibitoria de los procesos proliferativos, da sustancia a su función como inhibitorias de las Cdks. Existe evidencia de que la sobreexpresión de ICK1 provoca una reducción del número de células y del crecimiento celular *in vivo*, alterando la estructura de los tejidos tales como las hojas, lo que sugiere que ICK1 participa en el control del crecimiento y desarrollo tisular [59]. De hecho, la sobre expresión de todos los miembros de la familia ICK provoca, en mayor o menor medida, cambios en el crecimiento y morfogénesis tisular [59].

El segundo miembro de la familia de las Cdks, CdkB, posee secuencias de unión a las ciclinas PPTALRE ó PPTTLRE, según si es CdkB1 ó CdkB2 respectivamente, que difiere de la de CdkA. Es importante mencionar que esta secuencia es exclusiva de las Cdks de los vegetales [60, 61]. Las CdkBs difieren también de CdkA en que su expresión es dependiente del ciclo celular, por lo que se acumulan principalmente en la transición G2/M [50]. Las ciclinas con las que CdkB se asocia son CicA y CicB [62].

Las otras tres familias de las Cdks son CdkC, CdkD y CdkE y ninguna de estas proteínas ha sido caracterizada formalmente. La secuencia de unión a las ciclinas de Cdk-C es PITAIRE, también presente en la Cdk9 de humanos [63]. La cinasa CdkD ha sido clasificada como una CAK (Cdk activating kinase) y tiene una secuencia de unión a las ciclinas N(I/F)TALRE; esta proteína tiene semejanza a la Cdk7 de humanos y se ha encontrado que, en arroz, CdkD puede

fosforilar a CdkA [64]. La secuencia de unión a las ciclinas de la CdkE es SPTAIRE y se desconoce su función [60].

Proteínas del ciclo celular en las plantas

Mientras que la presencia de las Cdks del tipo p34Cdc2 predomina en las plantas durante las transiciones G1/S y G2/M, similar a lo que ocurre en las levaduras, la presencia de las proteínas relacionadas a pRB y E2F en las células vegetales asemeja la forma en que se controla el ciclo en las células animales. La existencia de las proteínas relacionadas a RB, o RBR (de RB-related) en las células vegetales derivó del descubrimiento de que en las proteínas de los virus vegetales (geminivirus) existía una secuencia de unión a pRB, la secuencia LXCXE. Poco después esta secuencia se reportó también en las ciclinas tipo D [45,65, 66]. Pronto se realizó la identificación de RBR en las células de maíz [67,68, 69] al igual que la determinación de su interacción con las ciclinas tipo D [69,70] y la fosforilación de RBR por las cinasas asociadas a las ciclinas [52]. Más importante aún, semejante a como ocurre en los sistemas animales, RBR era capaz de inhibir la actividad del factor transcripcional E2F en las células humanas [70]. La existencia de E2F en las plantas y su unión con RBR fue demostrada por experimentos de dos híbridos. Tres diferentes genes codificantes de RBR se han encontrado en los sistemas vegetales, aunque *Arabidopsis* contiene un solo tipo.

A la fecha se han encontrado 6 diferentes tipos de E2F y dos tipos de DP1 [71,72]. Los E2F tipos a, b y c son muy parecidos a los E2F clásicos de los animales ya que contienen sitios de unión al DNA (sitio consenso TTCCCGGC), a RBR y al factor DP1, además de que poseen un dominio de transactivación. En general se expresan en las células en proliferación y son regulados positivamente en la transición hacia S [73]. Por otra parte, los E2F d, e y f son atípicos en el sentido de que tienen un doble dominio de unión a DNA y no poseen sitios de unión a RBR o a DP1 [26].

Se ha estudiado la actividad transcripcional de E2F mediante la búsqueda de la caja E2F en la región promotora de los genes que se inducen por la adición ectópica de E2F/DP. Se encontró en *Arabidopsis* que al menos 181 genes son inducidos directamente por E2F y que sus productos proteicos están involucrados en el ciclo celular, la replicación del DNA y dinámica de la cromatina [75]. La función de E2F como un represor transcripcional (posiblemente unido a RBR), también se ha demostrado [71,74].

La importancia de PCNA como un marcador de la fase S, y también como un blanco de E2F, ha hecho que se le estudie con mayor profundidad. PCNA de las plantas muestra una gran identidad con la de los mamíferos y se ha clonado de diferentes especies vegetales, como el arroz, la zanahoria, el tabaco, el chícharo y el maíz [76] y se ha encontrado, en todos los casos, una región de unión a las ciclinas D, semejante a lo encontrado en las células animales [5]. Complejos similares, conteniendo a las ciclinas y las Cdks se han encontrado en las células de maíz [77, 78, 48]. Aunque la naturaleza de esta asociación es aún motivo de especulación, podría sugerirse que, siendo PCNA una proteína que engloba a, y se resbala sobre el DNA, podría mediante este deslizamiento transportar a los complejos ciclina/cinasa hacia donde se localizan sus proteínas blanco.

La función principal e inicialmente descrita para la PCNA de humanos, de ser una deslizadera para las DNA polimerasas replicativas no ha podido ser corroborada en el caso de los sistemas vegetales. El problema principal es la pobre descripción que se ha hecho de las DNA polimerasas de los vegetales. Solo recientemente se han clonado los genes de DNA polimerasas replicativas [79,80], pero aún no se hace un trabajo con las polimerasas y PCNA purificados. Adicionalmente a este problema, se conoce que para que se asocien establemente PCNA y las DNA polimerasas, se requiere la acción del complejo proteico RF-C, y éste aún no

se ha caracterizado en las plantas. Ejemplos de las DNA polimerasas alfa, delta y épsilon, descritas bioquímicamente son las de trigo, chícharo, arroz y maíz [81-86].

La DNA polimerasa 2 de maíz es de tipo alfa y es probablemente la polimerasa-primasa mejor descrita en términos bioquímicos [83-85]. Esta es una fosfoproteína y se tiene evidencia de una regulación dependiente del ciclo celular, mediada por modificaciones postraduccionales [83]. La procesividad de una DNA polimerasa tipo delta en el trigo fue estimulada por PCNA de los mamíferos [87], siendo éste el mejor ejemplo de la presencia de una polimerasa delta en las plantas.

La secuenciación de los genomas de *Arabidopsis* y arroz ha permitido la identificación y la posterior clonación de múltiples secuencias de DNA codificantes de las proteínas del ciclo celular; particularmente, se han descrito los equivalentes en las plantas de las proteínas MCM y ORC, además de muchas otras proteínas regulatorias de la transición hacia la fase S, como son Cdc6, Cdt1, Cdc45, RP-A y RP-C [72]. Es interesante observar que en la mayoría de estos genes la región promotora contiene cajas E2F. En *Arabidopsis*, la expresión de las 6 proteínas ORC se regula durante el ciclo celular, con una expresión máxima en la transición G1/S y se encuentra que, a excepción de ORC5, la expresión de las ORC depende de E2F/DP [88]. Las proteínas Cdc6 y Cdt1 de *Arabidopsis* también son reguladas durante el ciclo celular por medio de una regulación transcripcional (por E2F) y postranscripcional (mediante fosforilación y degradación por proteasoma). Ambas proteínas son fundamentales para permitir la iniciación de la replicación y la alteración de sus niveles puede ocasionar la salida del ciclo, o procesos endoreduplicativos [89]. Los genes codificantes de proteínas MCM también han sido clonados y su expresión es también dependiente de proliferación [90-92].

Estudios recientes del transcriptoma en las células sincronizadas de *Arabidopsis* o de tabaco, han mostrado que existe una periodicidad en la expresión de los genes del ciclo celular, genes cuyos productos se relacionan con el ciclo, genes cuyos productos participan en las vías de transducción de señales, genes que responden a hormonas y otros que participan en el control transcripcional y genes de vías metabólicas relacionadas con el avance del ciclo [93,94]. Este tipo de estudios son importantes porque dan indicios de cómo ocurren y se regulan los programas de desarrollo en las células vegetales.

Germinación de maíz y el ciclo celular

Nuestro grupo de trabajo desarrolla como línea principal de investigación la relación existente entre la germinación de las semillas y el ciclo celular. Mientras que el comienzo de la germinación en las semillas ortodoxas (i.e., virtualmente todas aquellas de interés agrícola) es fundamentalmente un proceso impulsado por la imbibición, el término de la germinación no es simplemente un proceso de brotamiento de estructuras como la raíz; se ha documentado la protrusión de la raíz en las semillas no viables. Es necesario por lo tanto que se establezcan procesos metabólicos, de muy diferentes tipos, que promuevan una reactivación de las estructuras subcelulares, de las enzimas, de los ribosomas, de la producción de energía, que le permitan a las células embrionarias despertar del letargo que significa la desecación durante la formación de la semilla y entonces retomar el camino para la que están destinadas, el proceso morfogénico que significa la formación de una nueva planta. Evidentemente, lo anterior implica que las células tendrán que encender, en algún momento durante la imbibición, los mecanismos para la proliferación. De esta manera, se conoce que las semillas de bajo vigor, o bien semillas que se han deteriorado y han perdido viabilidad, no solo germinan lenta o pobremente, sino que presentan problemas en el establecimiento de los mecanismos proliferativos [76]. Por ejemplo, existe una correlación directa entre el envejecimiento de las semillas y un tiempo prolongado para iniciar la replicación del DNA durante la germinación con el consiguiente retardo, o total inhibición, de la germinación [95-97]. También se ha hecho evidente que la estimulación de la germinación por las hormonas mitogénicas (citocininas), o bien la inhibición de la germinación

por hormonas (ácido abscísico) o por agentes químicos que reducen la proporción de agua útil en el medio de germinación (polietilén glicol), tienen efectos directos sobre el metabolismo del ciclo, afectando fundamentalmente la fase G1 [98]. Recientemente se obtuvo evidencia de la relación molecular entre la germinación y el ciclo celular usando semillas de *Arabidopsis* mutantes en las ciclinas D, de tal forma que la ausencia de las ciclinas provocaba la inhibición de la germinación [99].

Dentro del ciclo celular en la germinación de las semillas, nuestro grupo ha abarcado principalmente eventos moleculares durante G1 y la transición hacia S. Así, hemos demostrado, por primera vez en plantas, la existencia de complejos ciclinaD/CdkA/PCNA con actividad de cinasa. Estos complejos parecen estar presentes y funcionar primordialmente en las etapas tempranas de la germinación, que equivaldrían a G1 y G1/S, para desaparecer posteriormente [48,78, 100]. La identificación de los diferentes actores que participan en estos complejos y su regulación se complica dada la existencia, durante la germinación, de más de una ciclina D (cuatro hasta el momento), más de una proteína CdkA (al menos dos) y dos PCNAs [78,101,105]. Lo anterior sugiere que diferentes complejos con actividad de cinasa podrían actuar en forma redundante durante la germinación, o bien que estos complejos podrían tener diferentes tiempos y lugares de acción. Las cuatro ciclinas D que se han obtenido de maíz exhiben una expresión temporal diferencial durante la germinación [105], e igual parece suceder con la activación de dos Cdks tipo A [78], lo que al menos en forma preliminar sugeriría que la segunda hipótesis es parcialmente cierta. Por cierto, la pérdida de viabilidad de las semillas de maíz trae como consecuencia la disminución, e incluso la desaparición, de proteínas fundamentales para el avance del ciclo [97,102, 103, J. Vázquez-Ramos, resultados no publicados].

La activación del ciclo celular por las citocininas, hormonas mitogénicas, provoca incremento en los niveles de la proteína PCNA [76], incrementa la expresión de las ciclinas D, e incrementa la actividad sintética de DNA y de las DNA polimerasas replicativas [48,105]. La actividad de éstas últimas parece responder a un evento postraduccional, probablemente promovido por las ciclinas/cinasas, que impulsa así la fase S [104].

Todo lo descrito enfatizaría la importancia de los eventos moleculares de la fase G1 en el establecimiento de la germinación, corroborando así que los procesos morfogénicos y de desarrollo en las plantas están ligados a la capacidad proliferativa celular.

Referencias

1. Beach D., Durcakz B. y Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control in budding and fission yeast. *Nature* 300: 706-709.
2. Simanis, V. y Nurse, P. (1986) The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 45: 261-268.
3. Evans, T., Hunt, T. y Youngblom, J. (1982) On the role of maternal mRNA in sea urchins: studies of a protein which appears to be destroyed at a particular point during each division cycle. *Biol. Bull.* 163: 372-378.
4. Nurse, P. (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79, 547-550.
5. Xiong, Y., Zhang, H. y Beach, D. (1992) D-Type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71: 505-514.
6. Matsushime, H., Roussel, M.F., Ashmun, R.A. y Sherr, C.J. (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65: 701-711.
7. Brehm, A. and Kouzarides, T. (1999) Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends in Biochem. Sci.* 24: 142-145.
8. Wiman, K.G. (1993) The retinoblastoma gene: Role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J.* 7: 841-845.
9. Sherr, C. J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551-555.
10. Trimarchi, J.M. y Lees, J.A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 11-20.

11. De Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* 278: 42041-42049.
12. Sherr, C. J. y Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512.
13. Diehl, J.A., Zindy, F. y Sherr, C.J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine 286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11: 957-972.
14. Rechsteiner, M. y Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21: 267-271.
15. Kelman, Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629-640.
16. Black, A. R. y Azizkhan-Clifford, J. (1999) Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 237: 281-302.
17. Takisawa, H., Mimura, S. y Kubota, Y. (2000) Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 690-696.
18. Fujita, M. (1999) Cell cycle regulation of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *Front. Bioscience* 4: 816-823.
19. Kornberg, A. y Baker, T. (1992) *DNA Replication*, 2nd. Edition, W.H. Freeman and Co. New York.
20. Mimura, S. y Takisawa, H. (1998) *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *EMBO J.* 17: 5699-5707.
21. Waga, S. y Stillman, B. (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 67:721-751.
22. Schub, O., Rohaly, G., Smith, R.W.P., Schneider, A., Dehde, S., Dornreiter, I. y Nasheuer, H-P. (2001) Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase α -primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem.* 276: 28076-38083.
23. Morgan, O. D. (1997) Cyclin-Dependent Kinases: Engines, clocks and microprocessors. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 13: 261-291.
24. Smits, V. A. J. y Medema, R. H. (2001) Checking out the G2/M transition. *Bioch. Biop. Acta* 1519: 1-12.
25. Page, A. M. y Hieter, P. (1999) The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 583-609.
26. Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N-H. y Gutierrez, C. (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf Development. *Plant Physiol.* 140: 67-80.
27. John, P.C.L., Sek, F.J. y Lee, M.G. (1989) A homolog of the cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* 1: 1185-1193.
28. Colasanti, J., Tyers, M. y Sundaresan, V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3377-3381.
29. Feiler, H. y Jacobs, T. (1991). Cloning of the pea cdc2 homologue by efficient immunological screening of PCR products. *Plant Mol. Biol.* 17: 321-333.
30. Ferreira, P.C.G., Hermerly, A.S., Villaroel, R., Van Montagu, M. y Inzé, D. (1991) The Arabidopsis functional homolog of the p34^{cdc2} protein kinase. *Plant Cell* 3: 531-540.
31. Miao, G., Hong, Z. y Verma, D. (1991) Two functional soybean genes encoding p34^{cdc2} protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 943-947.
32. Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I. y Hashimoto, J. 1992. Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase delta auxiliary protein. *Eur. J. Biochem.* 203: 367-371.
33. Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V. y Murray, J.A.H. (1996) Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organisation. *Plant Mol. Biol.* 32: 1003-1018.
34. De Veylder, L., Engler, J. D., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G. y Inzé, D. (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordial formation. *Planta* 208: 453-462.
35. Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. y Inés, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 903-916.
36. Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., de Pamphilis, W. y Ma, H. (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* 135: 1084-1099.

37. Reichheld, J.-P., Chaubet, N., Shen, W.H., Renaudin, J.-P. y Gigot, C. (1996) Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 93: 13819-13824.
38. Fuerst, R.A.U., Soni, R., Murray, J.A.H. y Lindsey, K. (1996) Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 112: 1023-1033.
39. Ito, M., Criqui, M.-C., Sakabe, M., Ohno, T., Hata, S., Kouchi, H., Hashimoto, J., Fukuda, H., Komamine, A. y Watanabe, A. (1997) Cell cycle regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant J.* 11: 983-992.
40. Hashimoto, J., Hirabayashi, T., Hayano, Y., Hata, S., Ohashi, Y., Suzuka, I., Utsugi, T., Toh-E, A. y Kikuchi, Y. (1992) Isolation and characterization of cDNA clones encoding *cdc2* homologues from *Oryza sativa*: a functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.* 12: 865-876.
41. Genschik, P., Criqui, M., Parmentier, Y., Derevier, A. y Fleck, J. (1998) Cell cycle dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* 10: 2063-2076.
42. Yanagawa, Y., Kimura, S., Takase, T., Sakaguchi, K., Umeda, M., Komamine, A., Tanaka, K., Hashimoto, J., Sato, T. y Nakagawa, H. (2002) Spatial distribution of the 26S proteasome in meristematic tissues and primordia of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 214: 703-707.
43. Meijer, M. y Murray, J.A.H. (2001) Cell cycle controls and development of plant form. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 44-49.
44. Sorrell, D.A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C. y Murray, J.A.H. (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 119: 343-351.
45. Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H. y Murray, J.A.H. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.
46. Riou-Khamlichi, C., Huntley, R.P., Jacquard, A. y Murray, J.A.H. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544.
47. Hu, Y., Bao, F. y Le, L. (2000) Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24: 693-701.
48. Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F. y Vázquez-Ramos, J.M. (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol.* 46: 166-173.
49. Joubés, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M. y Renaudin, J.P. (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 607-620.
50. Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. y Inzé, D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *Plant Cell* 11: 509-521.
51. Roudier, F., Fedorova, E., Gyorgyey, J., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, A. y Kondorosi, E. (2000) Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J.* 23: 73-83.
52. Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. y Shinmyo, A. (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with *cdc2*/cyclin D in vitro. *Plant J.* 18: 243-252.
53. Healy, S.J.M., Menges, M., Doonan, J.H., y Murray, J. A .H. (2001) The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase *cdc2a* but are differentially controlled. *J. Biol. Chem.* 276: 7041-7047.
54. Zhang, K., Letham, D.S. y John P.C.L. (1996) Cytokinin controls the cell cycle mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like histone H1 kinase. *Planta* 1996: 2-12.
55. Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J. y Larkins, B.A. (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 4180-4185.
56. Zhou, Y., Fowke, L.C. y Wang, H. (2002) Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Rep.* 20: 967-975.
57. Wang, H., Fowke, L.C. y Crosby, W.L. (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 386: 451-452.
58. Wang, H., Qi, Q.G., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. y Fowke, L.C. (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and cycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15: 501-510.
59. Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S. y Fowke, L.C. (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* 24: 613-623.

60. Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolezi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Konez, C. y Dudits, D. (1997) Cell cycle synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9: 223-235.
- Fabian, T., Lorbiecke, R., Umeda, M. and sauter, M. (2000) The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberelin in planta. *Planta* 211: 376-383.
61. Huntley, R.P. y Murray, J.A.H. (1999) The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 440-446.
62. Lapidot-Lifson, Y., Patinkin, D., Prody, C.A., Ehrlich, G., Seidman, S., Ben-Aziz, R., Benseler, F., Eckstein, F., Zakut, H. y Soreq, H. (1992) Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of *cdc2* required in hematopoiesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 579-583.
63. Serizawa, H., Makela, T.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Weinberg, R.A. y Young, R.A. (1995) Association of CDK-activating kinase subunits with transcription factor TFIID. *Nature* 374: 280-282.
64. Xie, Q., Suarez-Lopez, P. y Gutierrez, C.R. (1995) Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* 14: 4073-82.
65. Dahl, M., Meskiene, I., Bögre, L., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H. y Heberle-Bors, E. (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* 7: 1847-1857.
66. Grafi, G., Burnett, R.J. Helentjaris, T., Larkins, B.A., De Caprio, J.A., Sellers, W.R. y Kaelin, W.G. Jr. (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 8962-8967.
67. Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J. y Gutiérrez, C. (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15: 4900-4908.
68. Ach, R., Durfee, T., Miller, A., Taranto, P., Hanley Bowdoin, L., Zambryski, P. y Gruissem, W. (1997) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5077-5086.
69. Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwod, J., Makkerh, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Gutierrez, C., Doonan, J. y Murray, J.A.H. (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRB-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (*cycD*) proteins. *Plant Mol. Biol.* 37: 155-169.
70. Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R. y Albani, D. (2002) The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J. Biol. Chem.* 277: 9911-9919.
71. Kosugi, S. y Ohashi, Y. (2002) Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol.* 128: 833-843.
72. Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. y Gutierrez, C. (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucl. Acids Res.* 27: 3527-3533.
73. Egelkrout, E.M., Robertson, D. y Hanley-Bowdoin, L. (2001) Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through and E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13: 1437-1452.
74. Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D. y De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* 139: 316-328.
75. Vázquez-Ramos, J.M. y Sánchez, M.P. (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13: 113-130.
76. Waga, S. y Stillman, B. (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 721-51.
77. Herrera, I., Sanchez, M.P., Molina, J., Plasencia, J. y Vázquez-Ramos, J.M. (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 110: 127-134.
78. Sánchez, M.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. y Vázquez-Ramos, J.M. (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50: 167-175.
79. Yokoi, M., Ito, M., Izumi, M., Miyazawa, H., Nakai, H. y Hanaoka, F. (1997) Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of plant DNA polymerase alpha and its cell-cycle dependent expression. *Genes to Cells* 2: 695-709.
80. Collins, J.T., Cannon, G.C. y Heinhorst, S. (1998) Nucleotide sequence of a cDNA (Accession No. AF020193) for DNA polymerase δ from soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 117: 333.
81. Castroviejo, M., Gatiu, M.T. y Litvak, S. (1990) A low molecular weight DNA polymerase from wheat embryos. *Plant Mol. Biol.* 15: 383-397.
82. Coello, P., García, E., Rodríguez, R y Vázquez-Ramos, J.M. (1992) A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Mol. Biol.* 20: 1159-1168.

83. Coello, P. y Vázquez-Ramos, J.M. (1995a) Studies on the processivity of maize DNA polymerase 2, an α -type enzyme. *Plant Physiol.* 109: 645-650.
84. Coello, P. y Vázquez-Ramos, J.M. (1995b) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* 231: 99-103.
85. García, E., Orjuela, D., Camacho, Y., Zúñiga, J.J., Plasencia, J. y Vázquez-Ramos, J.M. (1997) Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.* 33: 445-455.
86. Seto, H., Hatanaka, M., Kimura, S., Oshige, M., Tsuya, Y., Mizushina, Y., Sawado, T., Aoyagi, N., Matsumoto, T., Hashimoto, J. y Sakaguchi, K. (1998) Purification and characterization of a 100 kDa DNA polymerase from cauliflower inflorescence. *Biochem. J.* 332: 557-563.
87. Laquel, P., Litvak, S. y Castroviejo, M. (1993) Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerases. *Plant Physiol.* 102: 107-114.
88. Diaz-Trivino, S., Castellano, M.M., Sánchez, M.P., Ramírez-Parra, E., Desvoyes, B. y Gutierrez, C. (2005) The genes encoding Arabidopsis ORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreplicating cells. *Nucl. Acids Res.* 33: 5404-5414.
89. Castellano, M.M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A. y Gutierrez, C. (2004) DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell* 16: 2380-2393.
90. Springer, P.S., McCombie, W.R., Sundaresan, V. y Martienssen, R.A. (1995) Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in Arabidopsis. *Science* 268: 877-880.
91. Holding, D.R. y Springer, P.S. (2002) The Arabidopsis gene PROLIFERA is required for proper cytokinesis during seed development. *Planta* 214: 373-382.
92. Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R. y Bergounioux, C. (2002) Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J. Biol. Chem.* 277: 32978-32984.
93. Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. y Murray, J.A.H. (2002) Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277: 41987-42002.
94. Breyne, P., Dreesen, R., Vandepoele, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., Rombauts, S., Raes, J., Cannoot, B., Engler, G., Inzé, D. y Zabeau, M. (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 12: 14825-14830.
95. Sen, S. y Osborne, D.J. (1974) Germination of rye embryos following hydration-dehydration treatments: enhancement of protein and RNA synthesis and earlier induction of DNA replication. *J. Exp. Bot.* 25: 1010-1019.
96. Elder, R.H., Dell'Aquila, A., Mezzina, M., Sarasin, A. y Osborne, D.J. (1987) DNA ligase in repair and replication in the embryos of rye, *Secale cereale*. *Mutat. Res.* 181: 61-71.
97. Gutiérrez, G., Cruz, F., Moreno, J., González-Hernández, V. y Vázquez-Ramos J.M. (1993) Natural and artificial seed ageing in maize: Germination and DNA metabolism. *Seed Sci. Res.* 3: 279-285.
98. Reyes-Jiménez, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A. y Vázquez-Ramos, J.M. (1991) Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating seeds. *Seed Sci. Res.* 1: 113-117.
99. Masubelele, N.H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., Niewland, J., Scofield, S. y Murray, J.A.H. (2005) D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102: 15694-15699.
100. Sánchez, M.P., Gurusinge, S.H., Bradford, K.J. y Vázquez-Ramos, J.M. (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination". *J. Exp. Bot.* 56: 515-523.
101. López, I., Khan, S., Vázquez, J. y Hussey P.J. (1995) Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochem. Biophys. Acta* 1260: 119-121.
102. Coello, P. y Vázquez-Ramos, J.M. (1996) Maize DNA polymerase 2 (an α -type enzyme) suffers major damage after seed deterioration. *Seed Sci. Res.* 6: 1-7.
103. Vázquez, E., Montiel, F. y Vázquez-Ramos, J.M. (1991) DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Sci. Res.* 1: 269-273.
104. Gómez Roig, E. y Vázquez-Ramos, J.M. 2003. Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/Cdk complex. Effect of benzyladenine. *J. Plant Physiol.* 160: 983-990.
105. Quiroz-Figueroa, F., Lara, A. y Vázquez-Ramos, J.M. Maize D-Type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol. Plant.*, aceptado.

EL CICLO CELULAR: MODELOS ANIMALES Y VEGETALES

Resumen

La proliferación celular es gobernada por una serie de eventos moleculares complejos englobados en lo que se conoce como el ciclo celular. Las cuatro fases clásicas del ciclo, G1, S, G2 y M son en realidad el resultado de la coordinación de múltiples procesos bioquímicos, tendientes a comunicarse con el medio externo, encender los eventos del ciclo, coordinar el ciclo celular con el crecimiento celular, regular la iniciación de la replicación del DNA, percibir que la replicación ha ocurrido en su totalidad y que el DNA no ha experimentado daños o defectos en su estructura, promover que los cromosomas se condensen y se movilicen hacia el plano de metafase, reformando toda la estructuración de las membranas internas y, finalmente, repartir los cromosomas entre las nuevas células nacientes, impidiendo que los eventos bioquímicos puedan tener regresiones. Todos estos procesos ocurren de manera semejante en los eucariotes, sean uni o pluricelulares, animales o plantas, indicando así que los procesos básicos que gobiernan el ciclo celular se conservaron a través de la evolución. En particular, en este capítulo se hace énfasis en las semejanzas y diferencias existentes entre las células animales y vegetales. A diferencia de los animales, las plantas son organismos sésiles, expuestos a las condiciones medioambientales en que se desarrollan sin posibilidad de “escondarse” o moverse. De esta manera, el proceso morfogénico que permite la estructuración de una planta tendrá características sui generis, en donde la proliferación celular tendrá una función esencial. Finalmente, se hace una breve descripción de las características del ciclo celular en un proceso de desarrollo fundamental en la vida de las plantas, la germinación de las semillas, discutiendo algunas de sus particularidades.

Palabras clave: Ciclo celular, regulación, eucariotes, células animales, células vegetales.

Semblanza del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos.



Estudió la carrera de QFB- Alimentos en la Facultad de Química de la UNAM y posteriormente se doctoró en Bioquímica Microbiana en la Universidad de Oxford, UK. Desde 1981 trabaja en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, y en 1984 realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Oxford. Es actualmente Profesor Titular C y es miembro del SNI, nivel III. Ha participado en diferentes cuerpos académicos como: Consejero Técnico de la Facultad de Química, Consejero de la Facultad ante el CAACBYS, Miembro de las Comisiones Dictaminadoras del SNI, Coordinador del Posgrado en Ciencias Bioquímicas y actualmente es Secretario Académico de Investigación y Posgrado de la propia Facultad. Ha graduado cerca de 60 estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado. Su línea de investigación es el ciclo celular y su control en procesos de desarrollo en plantas.



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

MECANISMOS MOLECULARES DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y ANGIOGÉNESIS: PAPEL REGULADOR DE LAS GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho

José Vázquez-Prado, María Luisa Guzmán-Hernández, Jorge Carretero-Ortega, Sandra Sánchez-Barbosa, Ricardo Hernández-García y Guadalupe Reyes-Cruz²
Sección Externa de Farmacología y ²Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN. Av. IPNI 2508 Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Apartado postal 14-740, 07000 México, D.F.
MEXICO. jvazquez@cinvestav.mx <http://www.cinvestav.mx/farmacologia/vazquezp.htm>

Abstract

The identification and characterization of molecular elements having an influence on endothelial cell migration, particularly those involved in the activation of Rho GTPases, is applicable for the design of therapeutic strategies useful to promote beneficial growth of blood vessels or to block tumor progression, by preventing its vascularization.

Keywords: Angiogenesis, endothelial cell migration, Rho GTPases, RhoGEF.

Introducción

La migración celular ocurre en procesos biológicos fundamentales tales como el desarrollo embrionario, la extensión de las proyecciones del sistema nervioso, la defensa del organismo ante los agentes infecciosos, la reparación de las heridas y la generación de los vasos sanguíneos durante el desarrollo y en el organismo adulto [1-5]. Esta amplia gama de situaciones implica un cambio en la forma celular, regido por los eventos de la transducción de señales que provocan cambios en el citoesqueleto, conduciendo al movimiento, individual o en grupo, de muy diversos tipos celulares, incluyendo a las células progenitoras de diversos linajes y a las células diferenciadas que deben localizarse apropiadamente y establecer las interacciones que permiten su funcionamiento en el organismo adulto, o bien desplazarse hacia donde son requeridas para ejercer su función. Tal es el caso de las neuronas que extienden proyecciones celulares, en particular en el extremo de los axones, región denominada como de

crecimiento axonal, hasta establecer las sinapsis apropiadas; las células del sistema inmune como linfocitos, neutrófilos y macrófagos que, durante la respuesta inmune que se establece como mecanismo de defensa ante infecciones, se dirigen a los sitios en que se detecta la presencia de agentes infecciosos; y las células endoteliales, así como otras células componentes y precursores de los vasos sanguíneos, que se dirigen hacia regiones en las que una reducción localizada en los niveles de oxígeno conduce a la expresión de factores angiogénicos, mismos que promueven el movimiento polarizado, para dar lugar a un crecimiento de los vasos sanguíneos existentes, en situaciones tales como la reparación de heridas y el crecimiento tumoral, como parte del proceso conocido como angiogénesis [5-7]

Independientemente del tipo celular que esté sujeto a un proceso de migración, es un hecho que este evento ocurre a raíz de que las señales extracelulares involucradas son identificadas por proteínas, ubicadas en la membrana celular, conocidas como receptores. Los receptores detectan la necesidad de movimiento en una dirección determinada y transfieren la información al espacio intracelular, para que las proteínas efectoras de la transducción de señales generen segundos mensajeros, cambios en la asociación de ligandos que regulan la función de proteínas efectoras y modificaciones postraduccionales que promueven la formación de complejos macromoleculares; todo ello dando como resultado que la célula cambie su forma y se mueva en la dirección de una señal que la atrae [5, 8, 9].

El objetivo central de esta revisión, y de los estudios en nuestro laboratorio, es entender el movimiento de las células, endoteliales y otras que participan en la formación de los vasos sanguíneos. Este proceso requiere de elementos críticos para que una señal angiogénica sea detectada y la célula se mueva en la dirección del estímulo. La identificación y caracterización de tales elementos críticos es relevante para el desarrollo de terapias que impidan que el proceso de angiogénesis ocurra en condiciones patológicas. Para ello, es indispensable la identificación de las proteínas que de forma general contribuyen a la migración celular, y de aquellas que de forma específica se expresan y forman parte del proceso en condiciones patológicas.

El definir criterios moleculares generales, asociados a la función de proteínas promotoras del movimiento celular, permite categorizar familias de proteínas cuyas características estructurales, trasladadas a homologías en secuencia, sirven de punto de partida para identificar elementos equivalentes, expresados de forma particular en las células endoteliales, que pudieran ser estudiados como posibles reguladores del proceso de angiogénesis. Con estos criterios en mente, las bases de datos disponibles públicamente (incluyendo las que reúnen información derivada del proyecto del genoma humano, de la expresión diferencial de genes y de la estructura de proteínas) pueden ser aprovechadas al máximo, restringiendo las búsquedas para identificar, en las células endoteliales, la expresión de los genes y las proteínas que por sus características estructurales y de expresión pudieran estar involucradas en el proceso de angiogénesis, en particular en situaciones patológicas.

Hay que entender cuáles son los elementos generales que determinan la migración celular, de tal forma que se puedan diferenciar de los participantes específicos y, además, permitir el uso de estas definiciones para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Asimismo, es importante la identificación de los elementos moduladores del movimiento endotelial a partir de las proteínas con participación crítica en el proceso; en este caso, la estrategia consiste en identificar, por interacción directa, a aquellos elementos asociados con las proteínas de transducción de señales que, en estudios iniciales, se ha evidenciado su participación en el proceso de migración endotelial. Es importante, en esta situación, hacer un énfasis particular en las consideraciones estructurales (tales como la presencia de dominios que sugieran interacciones proteicas), bajo la premisa de que la interacción específica entre regiones estructuralmente definidas, es fundamental para ensamblar a los complejos macromoleculares requeridos para que la célula responda, moviéndose hacia un estímulo angiogénico.

En términos generales, que se describen en detalle en las siguientes secciones, nuestra área de interés se restringe a las fases iniciales del proceso de migración endotelial, en particular a los receptores que identifican la señal y a las proteínas que, en cascada, la transducen. Es importante que quede asentado con claridad desde este punto que las señales que dan lugar a promover la activación de las GTPasas de la familia de Rho, cuya actividad es crítica para que ocurran los cambios requeridos para que las células se muevan, son integradas por las proteínas con actividad promotora del intercambio de nucleótidos de guanina para GTPasas de la familia de Rho (RhoGEFs), a través del reconocimiento de segundos mensajeros, modificaciones postraduccionales, tales como eventos de fosforilación, y la asociación dinámica entre proteínas (a través de interacciones, en su mayoría, pendientes de ser caracterizadas).

Es imprescindible entender cuáles son las fases iniciales críticas para la detección de la señal angiogénica y el movimiento endotelial, precisamente porque la idea general es bloquear estos eventos antes de que el proceso ocurra y evitar así la formación no deseada de vasos sanguíneos [10, 11]. Considerando los modelos generales de migración celular, es un hecho que para la formación de los vasos sanguíneos nuevos, que resulta de estimular específicamente a los receptores con propiedades angiogénicas, deben ocurrir interacciones dinámicas entre las proteínas, que finalmente dan lugar a la migración de las células endoteliales y sus acompañantes. El proceso requiere, además de interacciones proteicas, de modificaciones postraduccionales (particularmente fosforilaciones), unión de GTP a diversas GTPasas (conduciéndolas al estado activo) y cambios en las concentraciones de los segundos mensajeros. La activación de las GTPasas de la familia de Rho da lugar a modificaciones dinámicas en la forma de la célula y promueven el desplazamiento de la misma.

Las proteínas encargadas de recibir y transmitir la transducción de una señal angiogénica pueden ser reconocidas como blancos terapéuticos [10, 12]. El interés central de nuestros estudios se restringe, precisamente, a la identificación y caracterización funcional de tales proteínas; desde aquellas responsables de la recepción de la señal, a nivel de la membrana, hasta las que establecen interacciones intracelulares que llevan a activar a las GTPasas de la familia de Rho. Así pues, las proteínas, clasificadas por su función, que son relevantes para nuestros estudios (y que serán revisadas en las siguientes secciones), están constituidas por: los receptores con potencial angiogénico, las proteínas intracelulares conocidas como GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina), que integran las señales transmitidas por los receptores para dar lugar a la activación de las GTPasas de la familia de Rho y, por último, cinasas, las cuales, a través de diversas fosforilaciones, regulan la activación de cascadas de transducción y el ensamble de complejos macromoleculares.

Entre la activación de los receptores (por estímulos angiogénicos extracelulares) y la activación de las GTPasas de la familia de Rho (por los GEFs que integran las diversas señales recibidas), existe una ventana en la que ocurren diversas interacciones entre proteínas; éstas pueden ir revelándose, por el sistema de clonación por interacción en levaduras y por los métodos proteómicos, permitiendo resolver el rompecabezas de interacciones fundamentales para el proceso de angiogénesis [13]. De los grupos de proteínas relevantes en el proceso de angiogénesis, tanto los receptores como las cinasas han sido considerados los blancos terapéuticos más prometedores. Sin embargo, teniendo en cuenta el requerimiento de interacciones críticas antes de que la célula incluso active mecanismos efectores que la lleven a cambiar su forma y migrar, consideramos que los GEFs, al ser proteínas con características estructurales complejas que sugieren el establecimiento de tales interacciones, pueden ser también, desde nuestro punto de vista, identificados como blancos terapéuticos interesantes, mismos que, desde luego, deben ser caracterizados desde los aspectos básicos de su función en la célula endotelial y en el proceso de angiogénesis.

Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso que conduce a la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los ya existentes en el organismo [6, 11, 14]. Para dar lugar al proceso macroscópico, deben ocurrir primero una gran cantidad de acontecimientos celulares y moleculares, como son: la producción de factores angiogénicos, el reconocimiento y la transducción de las señales derivadas de la presencia de estos factores angiogénicos, además del movimiento de componentes celulares y de las células mismas y la proliferación de las células endoteliales y de otros constituyentes de los vasos sanguíneos, entre otros procesos celulares [6, 11, 15, 16].

La angiogénesis se considera un proceso fisiológico normal que tiene lugar durante una fracción o la totalidad de diversas etapas del desarrollo de un organismo. En el caso particular del ser humano, se sabe de su participación durante eventos como la embriogénesis, el embarazo o la reparación de los tejidos. Durante la etapa fetal se tienen que crear gran cantidad de vasos sanguíneos. La red original de vasos aparece gracias al evento de la vasculogénesis; después, la angiogénesis permite la remodelación de esa red previamente formada al producir nuevos vasos sanguíneos y capilares que completan el sistema circulatorio del feto. También durante el estado adulto se sabe de la ocurrencia de la angiogénesis cuando se produce alguna herida, este proceso forma parte de la regeneración del tejido dañado. Así mismo, ocurre, en las mujeres, como parte de las modificaciones de la cubierta del útero durante el ciclo menstrual [11].

Aunque se considera un fenómeno normal, la angiogénesis es un proceso que también se ha visto implicado en patologías como el cáncer [17, 18]. La angiogénesis tumoral es la proliferación de una red de vasos sanguíneos que penetra en el tumor en crecimiento. Gracias a ella, los tumores continúan su crecimiento, reciben mayor cantidad de sangre de modo constante, obteniendo así los nutrientes que necesitan para crecer y crea un vínculo para enviar señales que dan continuidad al proceso. La angiogénesis tumoral inicia cuando las células cancerosas liberan moléculas que estimulan al tejido normal que las rodea, entre ellas pueden ir señales angiogénicas que promueven el desarrollo de vasos sanguíneos nuevos (Fig. 1) [19]. Para ello, las células endoteliales (y otras precursoras de los vasos sanguíneos) deben moverse en dirección al tumor, proliferar y organizarse en el espacio de forma coordinada para asegurar el flujo sanguíneo. De lo anterior, surge el interés en establecer estrategias para atacar a los vasos sanguíneos tumorales como terapia contra el cáncer. Existen diversas razones por las cuales esta perspectiva es interesante. En primer lugar, las células endoteliales vasculares están expuestas a la circulación y, por lo tanto, al alcance de cualquier manipulación terapéutica. En segundo lugar, las células endoteliales son más estables comparadas con las células transformadas. Y en tercer lugar, esta terapia se podría aplicar en una amplia variedad de tipos tumorales [12, 17, 20].

El estudio de las bases moleculares de la angiogénesis ha servido para desarrollar terapias orientadas a prevenirla en situaciones patológicas (además de que se está explorando la posibilidad de desarrollar tratamientos que promuevan la angiogénesis con fines terapéuticos, en particular en los casos en los que ocurre un suministro deficiente de sangre al tejido). La mayor atención en la angiogénesis como un blanco terapéutico se ha concentrado al desarrollo de antagonistas de los factores angiogénicos y de los receptores encargados de detectar la presencia de tales factores promotores de la formación de vasos sanguíneos; basándose siempre en la hipótesis de que al interferir con ellos se prevendría el desarrollo no deseado de vasos sanguíneos mediante un mecanismo generalmente asociado al bloqueo de la migración polarizada de las células endoteliales [20-22]. El ejemplo más espectacular que valida esta posibilidad es el desarrollo del Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe al factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), un mediador frecuente de la angiogénesis tumoral (Fig. 2).

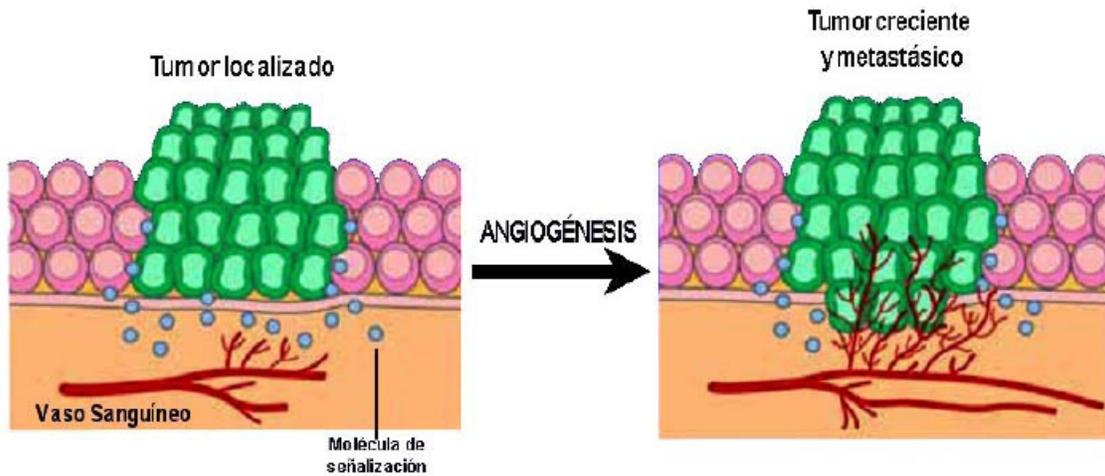


Figura 1. Angiogénesis tumoral. El desarrollo de tumores requiere del suministro apropiado de nutrientes, mismo que se obtiene gracias al proceso de angiogénesis tumoral que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos en respuesta a factores angiogénicos, comúnmente secretados por el tumor mismo.

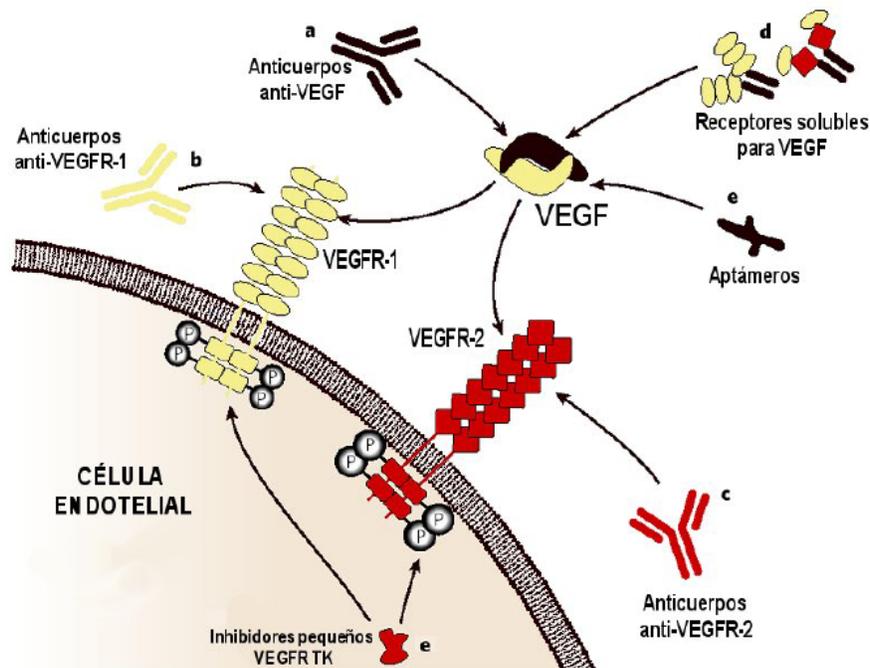


Figura 2. Estrategias terapéuticas para bloquear la angiogénesis dependiente de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Las estrategias incluyen el uso de anticuerpos monoclonales (a), proteínas recombinantes (d) y otros inhibidores extracelulares (e) para atrapar al VEGF y anticuerpos para inhibir a los receptores (b y c), además de moléculas pequeñas como inhibidores de la actividad catalítica de los receptores. Figura modificada de Ferrara, 2005, Nature 438:967.

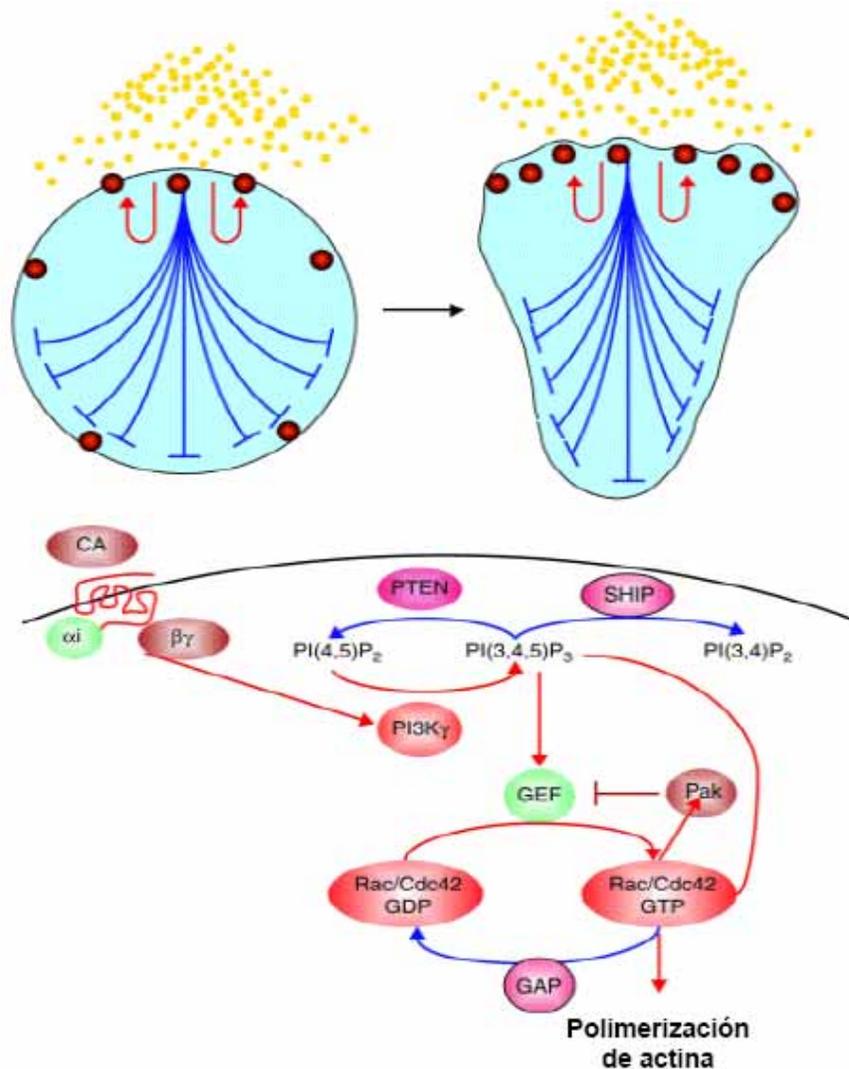


Figura 3. Modelo de transducción de señales por receptores acoplados a proteínas G relevantes para el movimiento celular polarizado. El movimiento celular polarizado depende de que se detecte una señal quimiotáctica extracelular que da lugar a que se genere una cascada de señales intracelulares que es amplificada localmente, induciendo cambios en la forma celular necesarios para la migración. En la parte de abajo se ilustran algunas de las proteínas críticas en la vía de transducción que da lugar a la activación de la GTPasa Rac y consecuente polimerización de actina en el pseudópodo. La figura representa un esquema general basado en sistemas modelo en el que las proteínas mencionadas en realidad corresponden a funciones críticas para que el proceso ocurra, por ejemplo, para que se active Rac y se polimerice la actina se requiere de la participación de un GEF, de los cuales existen alrededor de 70 diferentes, evidenciando la diversidad de posibilidades en cuanto a interacciones y sistemas de regulación que pudieran estar involucrados; el significado de esta diversidad se discute en el texto. Figura modificada de Weiner, 2002, *Curr Op Cell Biol* 14:196.

La terapia con Bevacizumab, combinada con la quimioterapia, ha mostrado efectividad en el tratamiento de los pacientes con cáncer de colon metastásico [20, 23, 24]. Este desarrollo se logró gracias al esfuerzo continuo de un elevado número de grupos de investigación durante los últimos 20 años; y fue posible gracias a múltiples estudios que van desde la identificación y caracterización original del factor, sus receptores y sus efectos a nivel celular, hasta los estudios preclínicos y clínicos que llevaron al desarrollo de las terapias que actualmente son usadas, en combinación con agentes quimioterapéuticos, en el tratamiento del cáncer de colon [20]. Actualmente se encuentran en pruebas clínicas cerca de 80 inhibidores de la angiogénesis, entre los que se incluyen moléculas pequeñas con potencial inhibidor de la actividad catalítica de la cinasa del receptor para factor de crecimiento de endotelio vascular [25, 26]. Por el contrario, aún no se encuentra en el mercado ninguna terapia disponible para promover la angiogénesis con fines terapéuticos; aun cuando, como se mencionó, diversas patologías caracterizadas por una disminución crónica o aguda en el suministro de sangre, serían tratables con tales agentes terapéuticos [27-30].

Migración celular. Mecanismos generales

Es un hecho que todos los tipos celulares requieren del movimiento interno de sus componentes para nutrirse, dividirse, crecer, degradar elementos obsoletos y posicionar apropiadamente a sus diversos componentes macromoleculares. Así mismo, es un hecho común que las células sufren cambios de forma en respuesta a los estímulos externos, que incluso inducen un desplazamiento celular. Aún cuando existe una amplia diversidad de tipos celulares, se han podido identificar mecanismos generales que coordinan el movimiento celular y que pueden servir como modelo para entender este proceso. Los principios comunes y los módulos proteicos participantes pueden ser reconocidos desde organismos unicelulares, como las levaduras, hasta diversos tipos celulares de organismos multicelulares, incluyendo a los mamíferos; pasando por distintos organismos modelo como los hongos, gusanos e insectos, entre otros, cuyo estudio ha permitido el avance del conocimiento en esta área. Al mismo tiempo, existen componentes que se expresan de forma muy particular en algunos tipos celulares y, en ocasiones, solamente en circunstancias patológicas. Así pues, aunque no existe un inventario completo de todos los componentes requeridos para que una célula se mueva y, como se señaló, éstos varían entre distintos tipos celulares y ante distintas circunstancias en un mismo tipo celular, la identificación de las moléculas individuales y de las interacciones que éstas establecen para que una célula decida seguir una señal quimiotáctica, puede ser de vital importancia.

Entender a nivel molecular el movimiento celular significa comprender aspectos fundamentales para la función de una célula viva y es determinante para identificar a los elementos que se ven alterados en situaciones patológicas, mismos que pueden ser aprovechados con fines terapéuticos. En concreto, algunos ejemplos que destacan la importancia de entender, a nivel molecular, cómo se mueven las células incluyen patologías como el cáncer, los procesos inflamatorios crónicos, las respuestas autoinmunes y la formación indeseada de vasos sanguíneos. Es importante dilucidar cómo una célula cancerosa invade nuevos tejidos, para bloquear a las proteínas que permiten que esto ocurra y, de esta manera, detener el avance del cáncer; la migración exacerbada de las células del sistema inmune es comúnmente responsable de procesos inflamatorios que convendría prevenir, de forma específica, bloqueando a los componentes moleculares responsables; así mismo, la formación de vasos sanguíneos que eventualmente conducen nutrientes a los tumores en crecimiento puede, en teoría, bloquearse si se impide el movimiento de las células endoteliales y otros tipos celulares que acompañan el proceso, privando al tumor de elementos necesarios para su desarrollo y sobrevivencia.

La migración celular polarizada depende de la transducción de las señales que se amplifican intracelularmente en forma polarizada, en la dirección en la que la migración ocurre y

requiere de una reorganización continua del citoesqueleto de actina, controlada por GTPasas de la familia de Rho [3, 31, 32]. Las señales extracelulares que inducen la migración celular son detectadas por los receptores que pertenecen a diferentes familias, clasificados de acuerdo a sus características estructurales, determinan las decisiones celulares en cuanto a cambio de forma y movimiento. De interés particular para nosotros son los receptores acoplados a proteínas G cuyo mecanismo de acción describiremos adelante [33-37].

Las células en movimiento comúnmente emiten proyecciones finas y pseudópodos en el frente de migración. Estas extensiones celulares transitorias, conocidas como filopodios y lamelipodios, se forman y extienden gracias a la fuerza que ejerce la polimerización de filamentos de actina, en un proceso que depende de la activación de proteínas intracelulares pequeñas conocidas como GTPasas de la familia de Rho [5, 9, 38]. Estas GTPasas forman parte de una superfamilia de proteínas G, monoméricas y heterotriméricas, cuya actividad depende de la unión de GDP o GTP a su dominio catalítico, siendo los interruptores moleculares más extendidos que determinan la generación y duración de acciones celulares como la transducción de las señales que estimulan la proliferación y el movimiento celular, y de acciones intracelulares como el movimiento de las vesículas de secreción y de los complejos macromoleculares hacia el núcleo de la célula.

Para entender la migración celular es importante conocer cómo se regulan las proteínas G y otras proteínas que coordinan su activación o que son estimuladas por ellas cuando se encuentran en estado activo, unido a GTP. El modelo general considera que en presencia de una señal apropiada, la vía de transducción de las señales que se genera, dependiendo de la naturaleza del receptor específico para la señal, induce la unión de GTP al dominio catalítico de las GTPasas, activándolas; la inactivación ocurre cuando este nucleótido es hidrolizado. La activación de las GTPasas de la familia de Rho, en respuesta a estímulos extracelulares, requiere de la intervención de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (que llamaremos GEFs por sus siglas en inglés, *guanine exchange factors*), los cuales son proteínas complejas que reciben e integran las señales transmitidas por los receptores y promueven el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa de la familia de Rho implicada en el proceso, activándola [9, 38]. Como parte del proceso de migración, la célula se polariza y ensambla estructuras contráctiles en las que filamentos de actina y miosina (uno de los motores celulares) participan en la propulsión de la célula, estas estructuras generalmente se ubican en el extremo posterior de la célula en movimiento (Fig. 3). Durante este proceso, la célula debe reconocer hacia dónde moverse, y también hacia dónde no moverse; es decir, puede estar sujeta a señales atractivas y repulsivas. Así mismo, debe establecer y remover adhesiones con el sustrato constituido por proteínas de la matriz extracelular y con otras células que encuentra en su camino. Todo ello depende de la presencia de diversos receptores de membrana, responsables de detectar el gradiente de estímulos quimioatrayentes y repelentes. Estos estímulos pueden estar presentes en la forma de factores solubles que, al difundirse a partir del sitio en que son secretados, marcan la pauta para la migración celular; y que también pueden estar presentes como proteínas asociadas a la matriz extracelular o bien a la superficie de otras células, coordinando el movimiento celular de acuerdo a la integración de las señales recibidas [5].

GTPasas de la familia de Rho y movimiento celular polarizado

El grupo de GTPasas de la familia de Rho, que incluye alrededor de 20 miembros, son reguladores moleculares que controlan una gran variedad de cascadas de señalización. Ellas son conocidas por su papel central en la regulación del citoesqueleto de actina, por su habilidad en influenciar la polaridad celular, en el dinamismo de los microtúbulos y por su actividad como promotoras de la expresión de genes. Rho, Rac y Cdc42 son las GTPasas de este grupo que han servido como paradigma para entender el funcionamiento de estos reguladores moleculares que se activan cuando tienen GTP asociado y se inactivan cuando éste es hidrolizado [31].

Las GTPasas de la familia de Rho, principalmente RhoA, Rac y Cdc42, pueden inducir cambios en el citoesqueleto de actina para dar lugar a la formación de fibras de estrés, filopodias y lamelipodias, respectivamente. Estas GTPasas desempeñan un papel importante en los procesos que requieren de cambios en la forma celular tales como: motilidad, crecimiento, proliferación y migración polarizada [32, 39].

Se ha demostrado que la activación polarizada, en términos de distribución espacial en la célula, de las GTPasas Rac y Rho es crítica para el movimiento celular. La parte frontal de la célula generalmente emite uno o varios pseudópodos hacia el lugar en que se recibe el estímulo; para que esto ocurra debe activarse la GTPasa Rac, con la finalidad de polimerizar el citoesqueleto de actina. Además, ocurren mecanismos aún no bien caracterizados, que previenen la activación localizada de Rho, o bien promueven la degradación de esta GTPasa, en las regiones en las que Rac es activada. Por otro lado, de forma simultánea puede ocurrir la activación de la GTPasa Rho en la parte de atrás conocida como urópodo. La activación de Rho en esta situación conduce a la formación de fibras de estrés, que en asociación con la activación de la miosina, da lugar a los eventos de contracción que contribuyen al desplazamiento de la célula. Ambas GTPasas, Rac y Rho, al ser activadas de forma polarizada, permiten la migración de la célula en dirección al estímulo recibido. Se cree que uno de los eventos moleculares iniciales, incluso antes de la activación de Rac, es la activación de Cdc42, una GTPasa que ha sido involucrada de forma particular en determinar la polaridad celular (Fig. 4) [32, 40].

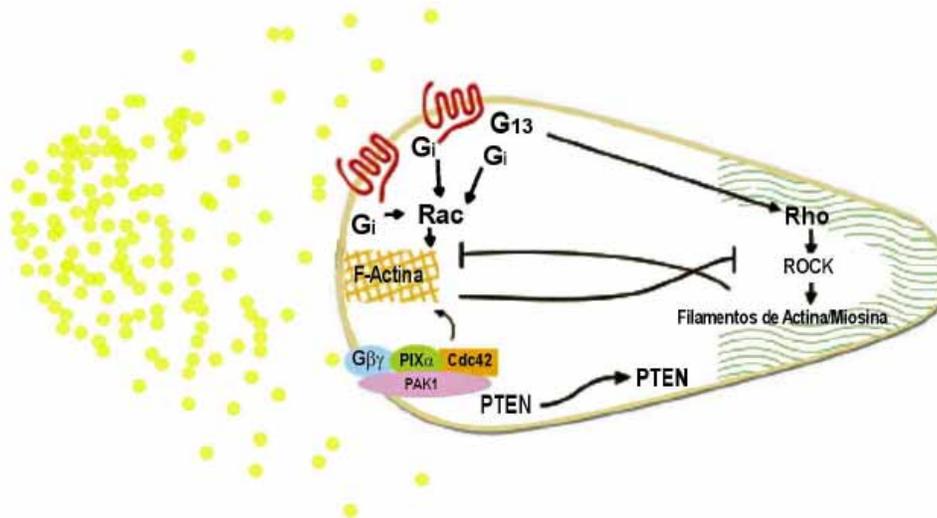


Figura 4. Modelo general de migración celular. El mecanismo general de movimiento en respuesta a agentes quimiotácticos postula que las células que detectan tales estímulos transducen señales que determinan un cambio en la forma celular, dependiente de la activación polarizada de GTPasas de la familia de Rho. La GTPasa Rac se activa en el frente de movimiento induciendo la polimerización de actina que “empuja” al pseudópodo en la dirección del quimioatrayente y Rho se activa en la parte trasera, promoviendo la formación de fibras contráctiles de actina-miosina que contribuyen al movimiento celular. Como se ilustra, existen mecanismos aún no bien definidos que inhiben que las GTPasas de la familia de Rho y las cascadas de transducción de señales asociadas con ellas, se activen en ubicaciones de la célula diferentes a las antes mencionadas. Figura modificada de Meili y Firtel, 2003, Cell, 114: 153–156.

Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina que activan a GTPasas de la familia de Rho (RhoGEFs)

Como ya se mencionó, las GTPasas actúan como reguladores o interruptores moleculares que oscilan entre un estado inactivo (cuando su dominio catalítico está ocupado por GDP) y un estado activo (cuando unen GTP). Este ciclo es principalmente regulado por tres clases de proteínas, las cuales varían en diferente grado de selectividad para las diferentes isoformas de las proteínas de la familia de Rho. La primera clase de estas proteínas está constituida por alrededor de 70 miembros en humanos, conocidas como GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina), los cuales promueven el intercambio de GDP por GTP y consecuentemente activan a estas GTPasas. Las proteínas que promueven el estado inactivo son conocidas como GAPs (proteínas promotoras de la actividad de GTPasa) y GDIs (Proteínas que inhiben la disociación de nucleótidos de guanina) (Fig. 5) [9, 38].

El primer GEF de mamíferos conocido como Dbl (por sus siglas en inglés “diffuse B-cell lymphoma”), fue aislado como un oncogen en 1985 [41]. Dbl mostró la capacidad de catalizar el intercambio de los nucleótidos de Cdc42 *in vitro* [42], además de presentar dos dominios conservados conocidos como DH (homología a Dbl) y PH (homología a plextrina). A la fecha, estas características estructurales han servido para identificar a múltiples proteínas poseedoras de dominios homólogos a Dbl (dominios DH) a las que se les ha atribuido la función de ser GEFs para las GTPasas de la familia de Rho. En la mayoría de los casos el dominio DH debe estar seguido de un dominio PH para promover eficientemente el intercambio de nucleótidos *in vivo* [9, 43].

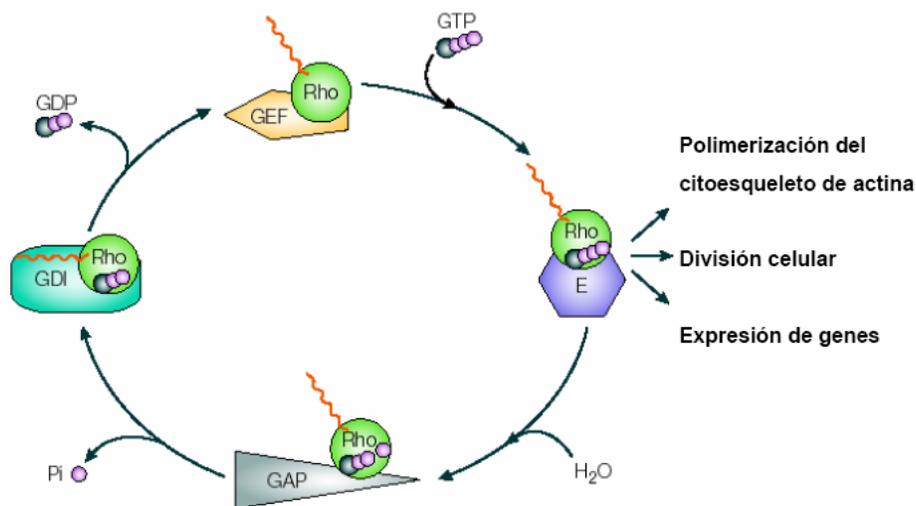


Figura 5. Ciclo de las GTPasas de la familia de Rho. La actividad de las GTPasas de la familia de Rho, y en general de muchas otras GTPasas, depende de que en su sitio catalítico se encuentre presente GTP o GDP. El estado activo corresponde a la GTPasa-GTP y es promovido por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs). El estado activo termina cuando el GTP es hidrolizado, acción promovida por proteínas promotoras de la actividad de GTPasa de las proteínas G (GAPs), el estado inactivo en el que la GTPasa se encuentra unida a GDP permanece es mantenido por proteínas que inhiben la disociación del nucleótido (GDI). El ciclo se ilustra con la GTPasa Rho pero es equivalente para otras GTPasas. Existe una gran diversidad de proteínas con actividad de GEF, GAP y GDI. Figura modificada de Rossman, 2005, Nature Reviews Mol Cell Biol 6:167-180.

La GTPasa Rac puede ser activada por diferentes GEFs entre los que se incluyen Vav (1,2,3), Tiam (1,2), Pix (α,β) y Sos [38, 44]. En el 2002 se identificó un nuevo activador para Rac en los neutrófilos, mismo que fue llamado P-Rex1, (PtdIns(3,4,5)P₃-dependent-Rac-exchanger [45]). Este GEF puede actuar como un detector de transducción de las señales por las proteínas G heterotriméricas (particularmente G $\beta\gamma$) y el segundo mensajero lipídico PIP₃, producto de la actividad de la PI3K, misma que a su vez puede ser estimulada por receptores acoplados a las proteínas G a través de G $\beta\gamma$ [45, 46]. Recientemente participamos en la identificación de un segundo GEF para Rac que responde a G $\beta\gamma$ y PIP₃; este GEF, denominado P-Rex2, es estructuralmente homólogo a P-Rex1, presenta un patrón de expresión en tejidos diferente, y además tiene dos variantes de splicing conocidas como P-Rex2a y P-Rex2b [47]. Estudios recientes sugieren que P-Rex2b participa en la activación de Rac1 y en la migración de las células endoteliales inducida por la esfingosina 1-fosfato, actuando a través de receptores acoplados a las proteínas G [48].

Migración de las células endoteliales y demás precursores de los vasos sanguíneos

Las células endoteliales se encuentran formando el lumen de los vasos sanguíneos y participan activamente en la creación de nuevos vasos. Durante este proceso reciben señales que les indican que deben movilizarse, proliferar y, en ocasiones, producir ellas mismas señales que promueven la angiogénesis. La migración endotelial polarizada es un evento clave en la generación normal y patológica de los vasos sanguíneos (Fig. 6). La migración de las células endoteliales depende de la activación de los receptores con poder angiogénico y de los mecanismos de señalamiento intracelular, responsables de la remodelación continua del citoesqueleto de actina, controlado por GTPasas de la familia de Rho. La participación de las GTPasas de la familia de Rho es un evento constante en la migración celular polarizada inducida por factores angiogénicos diversos [49-54]. En el laboratorio hemos concentrado nuestros esfuerzos en definir los mecanismos moleculares que coordinan la migración polarizada de las células endoteliales, en concreto aquellos tendientes a la activación de las GTPasas de la familia de Rho, tales como Rac y Rho, por un lado para entender los aspectos básicos de este interesante proceso y por otro para caracterizar a las proteínas, y sus determinantes estructurales, que pudieran ser bloqueados con fines terapéuticos [13]. La hipótesis de la que se desprende la importancia de los elementos considerados en esta revisión, establece que las proteínas que transducen las señales promotoras del movimiento de las células endoteliales, establecen interacciones críticas para que el proceso de la angiogénesis ocurra y son, por tanto, blancos terapéuticos potenciales. En particular, los llamados RhoGEFs, activadores directos de las GTPasas Rac y Rho, constituidos por una variedad de dominios estructurales, funcionan como integradores de señales, confiriéndoles características que los ubican como blancos terapéuticos interesantes, ya que al inhibir las interacciones requeridas para el movimiento de las células endoteliales se inhibiría el proceso de la angiogénesis (Fig. 7) [47, 55-58].

En las células endoteliales se ha observado que la microinyección de una forma constitutivamente activa de la GTPasa Rac promueve la formación de capilares, misma que involucra la participación del citoesqueleto de actina y los microtúbulos [51]. La estimulación de la movilidad celular por los factores de crecimiento tales como el VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular) requiere de la activación de las vías de transducción en las que también participan los receptores para la matriz extracelular de la familia de las integrinas. La activación de la GTPasa Rac es un punto de intersección crítico en la respuesta de las células endoteliales a la colágena tipo I y a VEGF durante la estimulación del movimiento de estas células. El desarrollo de estructuras parecidas a tubos por las células endoteliales microvasculares humanas cultivadas en geles de colágena, fue inhibido al bloquear farmacológicamente la isoprenilación de Rho A y por tanto la localización de esta GTPasa en la membrana [59]. Estos efectos fueron también observados *in vivo* en las membranas corioalantoideas de pollo estimuladas con VEGF y en las córneas de ratón tratadas con el factor de crecimiento fibroblástico básico [59].

Además del VEGF, otros agentes moduladores del proceso de la angiogénesis, que actúan a través de los receptores con actividad de cinasa, han sido descritos; entre ellos se incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas y al factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico, al factor de crecimiento transformante. Además, resulta importante señalar que frecuentemente ocurre una comunicación cruzada entre los diversos sistemas de transducción de las señales. De particular interés para nosotros son los factores angiogénicos que son reconocidos por los receptores acoplados a proteínas G [16]. Entre ellos se incluyen a la esfingosina-1-fosfato, al ácido lisofosfatídico, a la interleucina 8, a la quimiocina CXCL12 (SDF-1) y a la trombina, todos los cuales promueven la activación de las GTPasas de la familia de Rho y el movimiento celular [60-64]. A partir de aquí nos concentraremos en los eventos que dependen de la capacidad angiogénica de los factores que actúan a través de los receptores acoplados a proteínas G y aprovecharemos para describir algunas de las estrategias que hemos empleado para nuestros estudios de la migración endotelial.

La migración y proliferación de las células endoteliales, en respuesta a una diversidad de factores angiogénicos, es esencial para la generación de los capilares sanguíneos nuevos y es crítica durante el desarrollo y la generación de tejidos. [65, 66]. Evidencias recientes sugieren que, además de las células endoteliales, existen otros tipos celulares que también deben movilizarse para que el proceso de la angiogénesis sea concretado. Entre ellas cabe destacar a los pericitos (células que se asocian estrechamente a las endoteliales) y a las células progenitoras endoteliales, mismas que se desplazan desde la médula ósea para contribuir a la vascularización que ocurre en el adulto en condiciones fisiológicas y patológicas (Fig. 6) [30]. Buena parte de la atención de las investigaciones recientes se ha enfocado a las células progenitoras endoteliales, ya que podrían representar la base de terapias celulares [67-69].

Células progenitoras endoteliales

Las células progenitoras endoteliales fueron aisladas por primera vez hace casi una década a partir de la sangre de individuos adultos [70]. La existencia de esta población celular, derivada de la médula ósea, y la observación de que contribuye al proceso posnatal de la formación de los vasos sanguíneos, cambió el paradigma clásico de la vascularización en el adulto, mismo que consideraba que la formación de vasos sanguíneos nuevos resultaba exclusivamente de la proliferación, migración y remodelado de las células endoteliales derivadas de los vasos sanguíneos preexistentes, el proceso conocido como angiogénesis [71]. Hasta la fecha existe controversia en cuanto a la definición de los marcadores moleculares característicos de las células progenitoras endoteliales. Incluso, recientemente se ha determinado la existencia de una población celular más amplia, también derivada de la médula ósea, que es enviada a la circulación en respuesta a estímulos angiogénicos y se incorpora a los sitios en que eventualmente ocurrirá la formación de vasos sanguíneos. Entre estas células, aún no completamente caracterizadas a nivel molecular, se encuentran poblaciones promotoras de la formación de los vasos sanguíneos en una etapa en que incluso es imposible detectar la formación de los primeros vasos [72]. Estos hallazgos son particularmente interesantes, ya que abren un mundo de posibilidades para el desarrollo de terapias basadas en la modificación genética de tales células y su uso como “caballos de Troya” para la destrucción del tejido tumoral [30]. Este potencial terapéutico ha sido enfatizado por publicaciones recientes que indican que, en modelos de cáncer, las células progenitoras endoteliales son atraídas a la vasculatura en crecimiento de los tumores en proliferación [73, 74], observación que ha sido confirmada en los vasos sanguíneos de tumores humanos [75]. Otros ejemplos interesantes incluyen la neovascularización de la retina y de un modelo murino de isquemia [68, 69]. Además, como se mencionó, estas células, y los conocimientos derivados de su estudio, podrían usarse para promover la vascularización con fines terapéuticos.

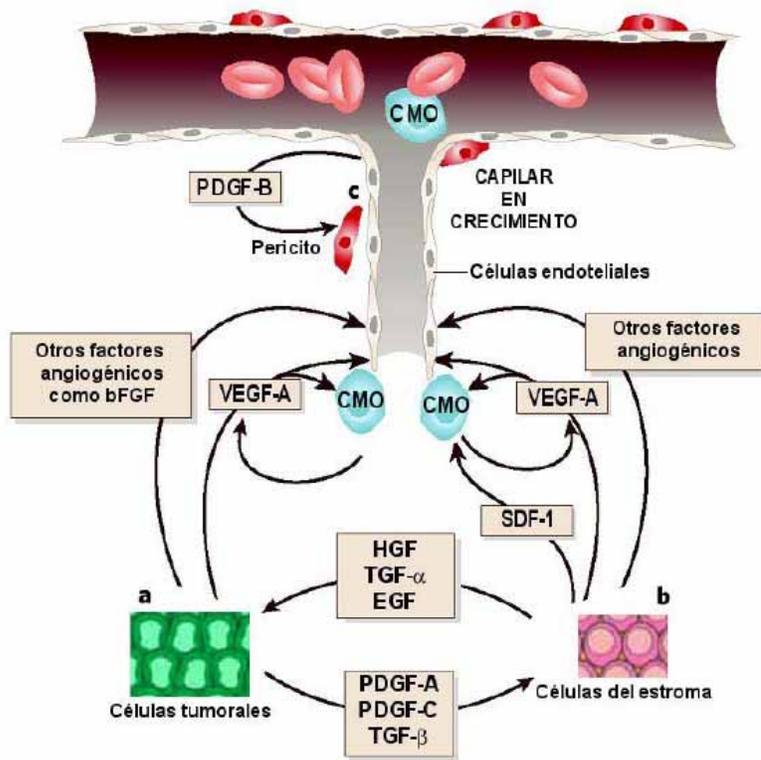
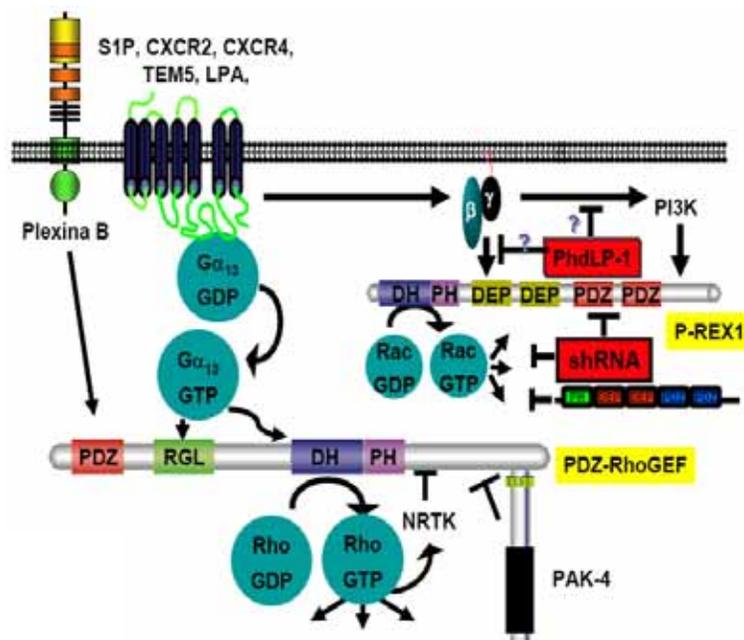


Figura 6. Angiogénesis tumoral, algunos participantes celulares y moleculares. Las células tumorales y del estroma secretan una serie de factores angiogénicos, entre los que destaca el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) promoviendo la migración de células endoteliales y pericitos, a partir de vasos sanguíneos preexistentes y de células progenitoras endoteliales (CMO) que se desplazan desde la médula ósea. Los estímulos angiogénicos se transmiten a través de receptores con actividad de cinasa de tirosina, receptores con actividad de cinasa de serina-treonina o bien receptores acoplados a proteínas G. Figura modificada de Ferrara, 2005, Nature 438:967.

Figura 7. Mecanismos moleculares de activación de GTPasas de la familia de Rho por receptores acoplados a proteínas G. La activación de Rho inducida por receptores acoplados a $G_{12/13}$ requiere de interacciones directas entre $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_{13}$ en estado activo (con GTP en su dominio catalítico) y GEFs de la familia de PDZ-RhoGEF que tienen un dominio específico de reconocimiento para $G\alpha_{12/13}$ -GTP (RGL). Estos y muchos otros GEFs tienen una estructura compuesta por diferentes dominios que pueden estar sujetos a regulación positiva o negativa de su actividad. Los receptores acoplados a proteínas G, a través de $G\beta\gamma$, inducen la activación de Rac; a través de P-REX1 y P-REX2, GEFs activados directamente por $G\beta\gamma$ y por el segundo mensajero PIP3, resultante de la actividad de PI3K, enzima que a su vez puede ser un efector de $G\beta\gamma$.



Receptores acoplados a proteínas G y transducción de señales angiogénicas.

Aspectos generales

Los receptores acoplados a proteínas G constituyen el grupo más abundante de receptores de membrana y se encuentran expresados en prácticamente todos los tipos celulares de los organismos eucariontes. Se les conoce también como receptores en serpentina por estar conformados por siete hélices transmembranales, unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares (Fig. 8) [76-78]. Los receptores acoplados a proteínas G participan en múltiples procesos biológicos fundamentales entre los que se incluyen el movimiento celular polarizado, y la angiogénesis [79]. Alteraciones en la función de estos receptores están asociadas a un gran número de enfermedades humanas. Su relevancia actual en la práctica clínica es reflejada por el hecho que los receptores acoplados a proteínas G son el blanco —directa o indirectamente— del 50 al 60% de todos los agentes terapéuticos en uso [77, 78, 80].

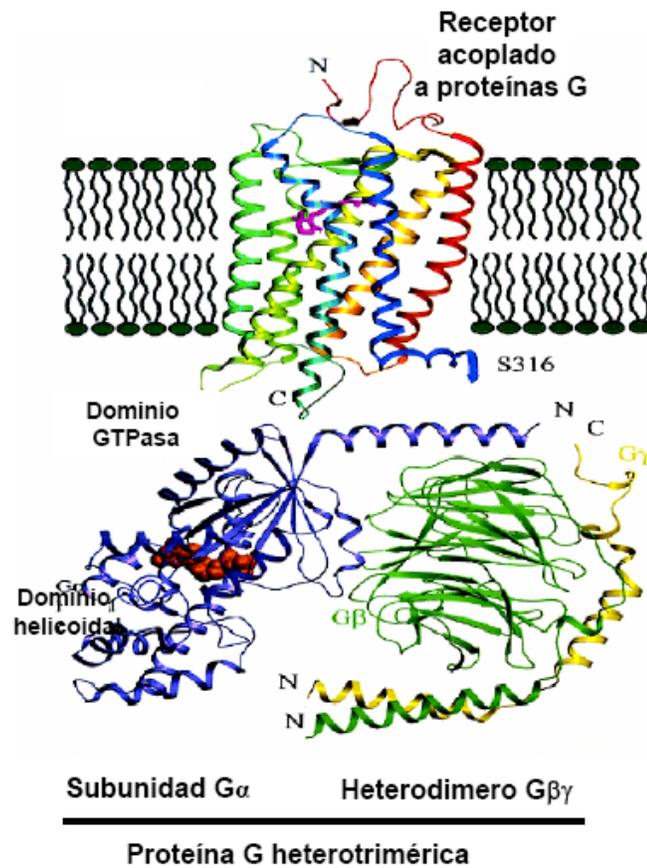


Figura 8. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. El modelo está basado en la estructura de la rodopsina (receptor a estímulos visuales) y del heterotrímico de las proteínas G.

Mecanismos de acción de los receptores acoplados a proteínas G

El mecanismo clásico por el cual los receptores acoplados a proteínas G inducen una respuesta, es a través de la activación de proteínas G. La unión de ligandos específicos tales como las hormonas, los neurotransmisores y los lípidos, activa a estos receptores al inducir en ellos un cambio conformacional que promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ promoviendo, además de la unión de GTP en la subunidad $G\alpha$, la disociación del heterodímero $G\beta\gamma$. Tanto $G\alpha$ -GTP como $G\beta\gamma$ activan a diversos efectores, dependiendo de su identidad, para generar segundos mensajeros que promueven respuestas intracelulares y fisiológicas en los diferentes tejidos, entre ellos la activación de las GTPasas de la familia de Rho y el movimiento celular polarizado, particularmente cuando se activan a los receptores acoplados a G_i y a $G_{12/13}$ (Fig. 9) [81, 82].

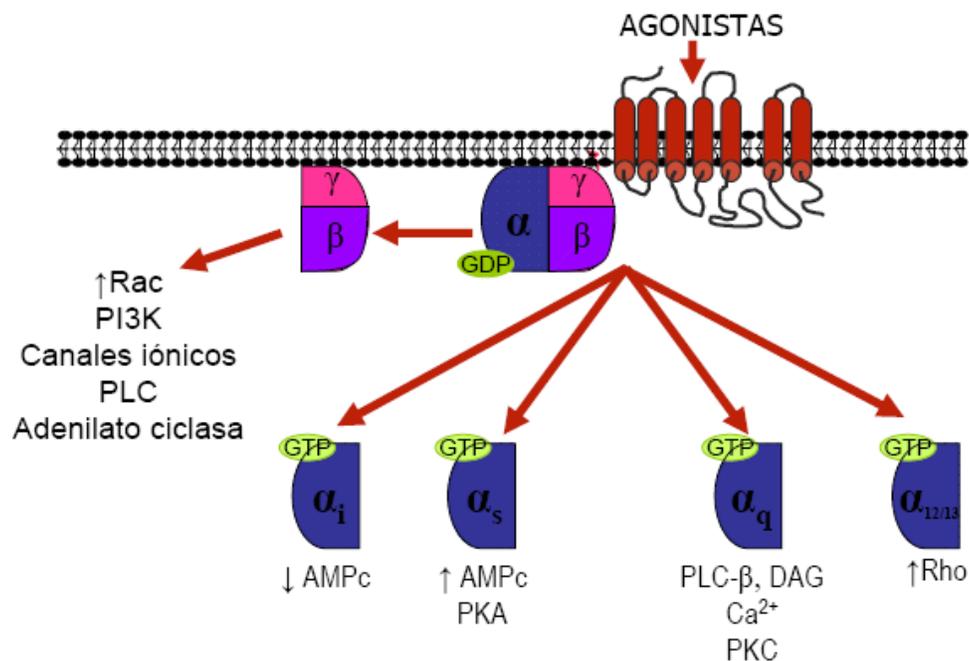


Figura 9. Mecanismo de acción de los receptores acoplados a proteínas G. La presencia de agonistas induce un cambio conformacional que promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, liberándola del heterodímero $G\beta\gamma$. Tanto $G\alpha$ -GTP como $G\beta\gamma$ activan a diversos efectores promoviendo la generación de segundos mensajeros y respuestas celulares particulares, dependiendo de la identidad de los receptores estimulados, las proteínas G a las que estos se acoplan y el repertorio de efectores expresados en la célula que recibió el estímulo.

Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas están conformadas por tres subunidades ($G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$). La subunidad $G\alpha$, de 45 a 47 kDa, posee homología estructural y funcional con las proteínas G monoméricas, superfamilia que incluye a las GTPasas de la familia de Rho y que está representada por Ras. En los mamíferos se han descrito más de veinte subunidades $G\alpha$, que han sido clasificadas de acuerdo a su homología estructural y funcional en cuatro subfamilias ($G\alpha_s$, $G\alpha_i/o$, $G\alpha_q/11$ y $G\alpha_{12/13}$) (Fig. 9) [83, 84].

Las funciones clásicas de las proteínas G están determinadas por la identidad de la subunidad $G\alpha$. La estimulación de la subfamilia $G\alpha_s$ activa a la adenilato ciclasa induciendo un aumento en los niveles intracelulares de AMPc y la consecuente activación de la proteína cinasa A (entre otros efectores), mientras que la estimulación de la subfamilia $G\alpha_i$ lleva al efecto contrario. La estimulación de la subfamilia $G\alpha_q$ activa a la fosfolipasa C (PLC) promoviendo la movilización de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C. Mientras que la subfamilia $G\alpha_{12/13}$ está implicada en la regulación de las GTPasas de la familia de Rho (Fig. 9) [83].

Para transmitir de forma temporal la señal de un receptor que ha sido activado, las proteínas G heterotriméricas están sujetas a ciclos de activación (por unión de GTP) e inactivación (por hidrólisis del GTP), de esta forma, las proteínas G pueden funcionar como un interruptor molecular regulable. En el estado basal inactivo, la subunidad $G\alpha$ y el complejo $G\beta\gamma$ están asociados, la primera conteniendo difosfato de guanosina (GDP) en su dominio catalítico. Este heterotrímero inactivo puede ser reconocido por un receptor que ha sido estimulado por su ligando. Esta interacción resulta en la liberación del GDP presente en $G\alpha$, mismo que es reemplazado por GTP. La unión de GTP a la subunidad $G\alpha$ induce un cambio conformacional, llevando a la disociación del heterotrímero para dar lugar a dos componentes que pueden actuar sobre efectores específicos: la subunidad $G\alpha$ conteniendo GTP y el complejo $G\beta\gamma$ (Fig. 9). La actividad de GTPasa inherente a la subunidad $G\alpha$ contribuye a terminar la activación de la proteína G; esta actividad de GTPasa es promovida por las proteínas conocidas como RGS (o reguladores del señalamiento de las proteínas G, *Regulators of G Protein Signaling*). El GDP resultante de la hidrólisis del GTP permanece unido a la subunidad $G\alpha$, misma que recupera su afinidad por el complejo $G\beta\gamma$, asociándose nuevamente a éste, para completar el ciclo de las proteínas G; al resultar nuevamente un heterotrímero en estado inactivo [85, 86].

El heterodímero $G\beta\gamma$

Las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas, de 35 kDa y 7 a 9 kDa respectivamente, forman un complejo no dissociable que representa una unidad funcional. En los mamíferos, dicho complejo está formado por la combinación de diferentes subunidades $G\beta$ y $G\gamma$. El análisis estructural de este complejo mostró que la subunidad $G\beta$ tiene una forma de propela constituida por siete hojas beta plegada, mientras que la subunidad $G\gamma$ está localizada en uno de los costados de la propela y se asocia a la subunidad $G\beta$ a través de un dominio súper enrollado (Fig. 8). El heterodímero $G\beta\gamma$ desempeña un papel importante en la regulación de varios efectores. Los mejores ejemplos de efectores regulados por $G\beta\gamma$ son los canales de K^+ rectificadores entrantes (GIRKs), algunas isoformas de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C, así como algunos subtipos de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje e isoformas de la PI3K (cinasa que fosforila fosfoinosítidos en la posición 3) tales como la $PI3K\beta$ y la $PI3K\gamma$ (Fig 9) [86]. Como se mencionó, recientemente Sidote ha demostrado que el heterodímero $G\beta\gamma$ activa a los factores intercambiadores de los nucleótidos de guanina P-Rex1 y P-Rex2; mismos que están involucrados en la activación de la GTPasa Rac y que son parte central de los estudios de nuestro laboratorio. Consideramos que por su naturaleza estructural, estos intercambiadores pudieran ser críticos en las conexiones moleculares relevantes para que los receptores acoplados a proteínas G con actividad quimiotáctica, ya que podrían coordinar estímulos de forma polarizada que lleve a las células a moverse en la dirección a un quimioatrayente y, en el caso de células endoteliales, hacia un estímulo angiogénico transmitido por receptores acoplados a las proteínas G heterotriméricas (Fig. 7) [45, 47].

El heterodímero $G\beta\gamma$ promueve la activación de diversas vías de transducción gracias a que su estructura presenta diversas áreas de contacto con los efectores. Esta situación abre la posibilidad de que péptidos capaces de interactuar con distintas regiones del heterodímero $G\beta\gamma$ pudieran bloquear diferencialmente la activación de vías de transducción que dependen de

este heterodímero. De particular interés para nosotros son aquellas vías relevantes para la activación de la GTPasa Rac y la migración celular polarizada. En este sentido, hemos analizado en detalle la estructura, disponible en la página de PubMed, del complejo $G\beta\gamma$ con diversas proteínas. En particular, hemos centrado nuestro interés en la fosducina y proteínas homólogas a ésta, ya que muestran amplias zonas de interacción con el heterodímero $G\beta\gamma$. Los aspectos estructurales de la interacción entre la fosducina y el heterodímero $G\beta\gamma$ fueron revelados por estudios de cristalografía [87]. La organización estructural del complejo sugiere que péptidos derivados de la fosducina pudieran ser capaces de bloquear distintas regiones de $G\beta\gamma$ e impedir diferencialmente la activación de efectores y, para lo que nos ocupa, inhibir diferencialmente la migración endotelial dependiente de $G\beta\gamma$ y por ende la angiogénesis inducida por receptores acoplados a las proteínas G. La fosducina al unirse al heterodímero $G\beta\gamma$ modula su actividad, ya sea inhibiendo su interacción con distintos efectores como tradicionalmente se cree, o incluso conectando al heterodímero hacia nuevas cascadas de señalización. Adicionalmente, se ha propuesto que la interacción de la fosducina con el heterodímero $G\beta\gamma$ induce que éste se desprenda de la membrana plasmática [88]. Considerando que la proteína parecida a la fosducina muestra una alta homología con la fosducina y su distribución es mucho más amplia, estudios en nuestro laboratorio se han orientado a determinar el posible papel regulador de las distintas regiones de su estructura en la activación de vías de transducción dependientes de $G\beta\gamma$ en las células endoteliales (Fig. 7).

$G\beta\gamma$ y movimiento celular polarizado

Dentro de la superfamilia de los receptores acoplados a las proteínas G se encuentran aquellos que tienen actividad quimiotáctica. Se sabe que el movimiento celular polarizado que depende de la activación de receptores acoplados a proteínas G da lugar a la activación de la GTPasa Rac, a través de la liberación del heterodímero $G\beta\gamma$, promoviendo la polimerización de la actina en el frente de movimiento, y dando lugar al desplazamiento de la célula en dirección del estímulo quimiotáctico. Ejemplos concretos de los receptores acoplados a proteínas G que promueven cambios en la forma y movimiento celular son el receptor para el péptido N-formilado. En un modelo de células endoteliales la transfección con este receptor, induce la reorganización del citoesqueleto de actina dependiente de $G\beta\gamma$, que actúa sobre PI3K, y promueve la activación de Rac [89]; el receptor para trombina, que induce la activación de la PI3K y la AKT de una manera dependiente de $G\beta\gamma$; además de los receptores CXCR y S1P que resultan de particular interés por sus propiedades angiogénicas [90]. Como se mencionó, se ha sugerido que la activación de Rac desencadena una cascada de señalización que promueve la remodelación continua del citoesqueleto de actina, provocando una migración celular polarizada. La GTPasa Rac puede ser activada por el heterodímero $G\beta\gamma$ derivado de la estimulación de los receptores acoplados a G_i , a través de los GEFs conocidos como P-REX1 y P-REX2, sugiriendo una posible conexión entre la activación de los receptores acoplados a proteínas G con propiedades angiogénicas y el movimiento endotelial dependiente de la activación de Rac estimulada en la cascada de transducción de señales generadas por tales receptores (Fig. 7) [45, 47].

Receptores acoplados a proteínas G y angiogénesis

Existe un grupo de receptores acoplados a proteínas G que sin lugar a dudas induce migración polarizada en células endoteliales y promueve la formación de los vasos sanguíneos. Este grupo incluye a los receptores EDG-1 para esfingosina-1-fosfato [91-94], a los receptores PAR activados por la trombina [16, 95], a los receptores CXCR1 y CXCR2 para la IL-8, [96, 97]. Así mismo, se ha demostrado que los receptores CXCR4 son esenciales para la vascularización del tracto gastrointestinal [98]. La activación de los receptores acoplados a proteínas G puede además inducir la secreción de factores de crecimiento de endotelio vascular [16]. Frecuentemente los receptores acoplados a proteínas G con propiedades angiogénicas inducen

una reorganización del citoesqueleto y quimiotaxis en las células endoteliales humanas a través de una vía sensible a la toxina pertusis, indicando que la proteína G_i , muy probablemente a través del heterodímero $G\beta\gamma$, participa en esta respuesta biológica. El repertorio completo de receptores acoplados a proteínas G que se expresan de forma endógena en las células endoteliales, progenitoras endoteliales, pericitos, células de músculo liso vascular y otros tipos celulares involucrados en la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos es desconocido; sin embargo, resulta interesante que algunos marcadores de endotelio tumoral corresponden a secuencias con un alto grado de homología con receptores acoplados a proteínas G y con los GEFs para GTPasas de la familia de Rho tales como TEM5 y TEM4 respectivamente [99]. Estudios en nuestro laboratorio están orientados a determinar la participación de estos marcadores de endotelio tumoral en procesos de activación de las GTPasas de la familia de Rho, el movimiento celular y la angiogénesis.

Receptores CXCR4 y angiogénesis

La quimiocina SDF-1 (CXCL-12) es un factor proangiogénico que estimula diversas vías de transducción de señales a raíz de la interacción con su receptor, el CXCR4. Este complejo de ligando receptor ha recibido atención como un blanco para inhibir algunos procesos de la angiogénesis, entre otras razones debido a que la quimiocina SDF-1 se ha encontrado muy expresada en tumores, en particular siendo secretada por las células del estroma tumoral, y se ha determinado que atrae a las células progenitoras endoteliales, mismas que son reclutadas desde la médula ósea. Los fibroblastos del estroma de carcinomas invasores de mama de origen humano secretan SDF-1, atrayendo a las células progenitoras endoteliales que expresan el receptor CXCR4 (Fig. 6) [100]. También se ha visto que al bloquear el sistema SDF1/CXCR4 se atenúa el crecimiento de tumores gastrointestinales al inhibir la angiogénesis [101]. Por otro lado, se ha visto que SDF-1 se secreta en tejidos isquémicos y que el receptor CXCR4 se expresa en las células progenitoras endoteliales [102]. Además, se sabe que el bloqueo de los genes que codifican para CXCR4 y SDF-1 da lugar a muerte durante el desarrollo embrionario en ratones modelo en los que el fenotipo letal coincide con una falta en el desarrollo de la vasculatura [98, 103].

Las células progenitoras endoteliales expresan al receptor acoplado a las proteínas G, conocido como CXCR4; su ligando, la quimiocina conocida como SDF-1 o CXCL12, se expresa en tejidos isquémicos y su presencia promueve la activación de vías de transducción que dan lugar a la migración de las células progenitoras endoteliales [102]. La expresión del receptor CXCR4 en las células progenitoras endoteliales y la expresión local de su ligando (SDF-1) en la médula ósea, mantiene a éstas células atrapadas en las regiones donde el SDF-1 se encuentra. Al antagonizar la función del receptor CXCR4 se contribuye a liberar a las células progenitoras endoteliales hacia la circulación sanguínea, un evento que tiene un interés práctico, ya que facilita la recuperación de estas células con fines terapéuticos [104, 105]. Las interacciones entre proteínas intracelulares y las vías de transducción de señales que son esenciales para la migración de las células precursoras de los vasos sanguíneos no han sido completamente reveladas y son motivo de estudios en nuestro laboratorio.

Las GTPasas de Rho en la migración endotelial y angiogénesis

La participación de las GTPasas de la familia de Rho en la migración de las células endoteliales y en la angiogénesis ha sido sugerida por experimentos en los que GTPasas mutantes, que actúan como dominantes negativas, previenen la morfogénesis vascular *in vitro* y la vascularización en modelos animales [106-109]. Efectos similares fueron observados en las células endoteliales en las que se impidió la expresión de un regulador específico de la función de las GTPasas de Rho, conocido como p73RhoGAP. Este regulador se encontró expresado de forma restringida al endotelio y su función normal sería el llevar a las GTPasas a un estado

inactivo [110]. Puesto que la activación de las GTPasas de la familia de Rho es crítica para que ocurran los cambios en la forma celular que son necesarios para el movimiento [5, 111], la participación de las proteínas que actúan como los promotores de la activación de estas GTPasas es requerida para que el movimiento ocurra [30, 112]. Y en el caso del movimiento de las células endoteliales y otros precursores de los vasos sanguíneos, sería esperada la participación de estas proteínas en el proceso de angiogénesis, representando un paso crítico inicial, que pudiera ser blanco de la terapia antiangiogénica.

En el laboratorio estamos estudiando la posibilidad de que P-REX1, un factor intercambiador de los nucleótidos de guanina que responde a los receptores acoplados a proteínas G y conduce a la activación de la GTPasa Rac, constituya un elemento crítico para la migración de las células endoteliales en respuesta a estímulos angiogénicos detectados por los receptores acoplados a proteínas G. Asimismo, estamos investigando el efecto de las proteínas que establecen interacciones directas con este GEF. Así mismo, exploramos la posibilidad de que otros GEFs, expresados endógenamente en las células endoteliales, pudieran tener participación en el proceso de migración endotelial y la angiogénesis (Fig. 10).

Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina y angiogénesis

A pesar de la importancia del movimiento celular en el proceso de la angiogénesis, del requerimiento de las GTPasas de la familia de Rho en este proceso y del papel crítico de los factores intercambiadores de los nucleótidos de guanina específicos por estas GTPasas, el papel que estos GEFs pudieran tener en el proceso de la angiogénesis no ha sido estudiado a profundidad y es el motivo de las investigaciones en nuestro laboratorio. Los factores intercambiadores de los nucleótidos de guanina para las GTPasas de la familia de Rho desempeñan un papel central en el proceso de la motilidad celular. Su participación sobresaliente se intuye a partir de su diversidad, ya que se conoce de la existencia de cerca de setenta miembros, algunos de los cuales a la fecha son simplemente secuencias cuyas homologías permiten predecir su función como activadores de las GTPasas de la familia de Rho [9, 38]. Actualmente se desconoce qué factores intercambiadores de los nucleótidos de guanina integran las señales angiogénicas que resultan en la activación de Rac, Rho y el movimiento celular. Es de suponerse que la naturaleza estructural de los distintos factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, constituida por una variedad de dominios que sugieren el establecimiento de interacciones proteicas y la regulación por segundos mensajeros, permita una amplia versatilidad en la capacidad de estas proteínas para integrar señales angiogénicas. Un ejemplo interesante de esta posibilidad está representado por la familia de los GEFs que responden directamente a la activación de los receptores acoplados a proteínas G13, de los cuales, PDZ-RhoGEF y LARG también pueden ser activados por las plexinas, mismas que interaccionan directamente con el dominio PDZ localizado en el extremo amino terminal de estos GEFs para Rho (Fig. 7) [13, 57]. La arquitectura modular del GEF P-REX1, y de su homólogo P-REX2, sugieren fuertemente que estos activadores de Rac pudieran ser modulados por interacciones proteicas y segundos mensajeros adicionales a la regulación ejercida por Gβγ y PIP3 (Fig. 10) [45, 47, 113].

Análisis del transcriptoma de células endoteliales. Identificación de los marcadores de endotelio tumoral y posibles reguladores del movimiento endotelial

Las células en estado patológico expresan proteínas que no poseen normalmente, o bien manifiestan cambios importantes en sus niveles de expresión. Las células endoteliales no son la excepción, de forma tal que estudios recientes han permitido determinar diferencias entre las células endoteliales provenientes de tejido normal y de tejido tumoral.

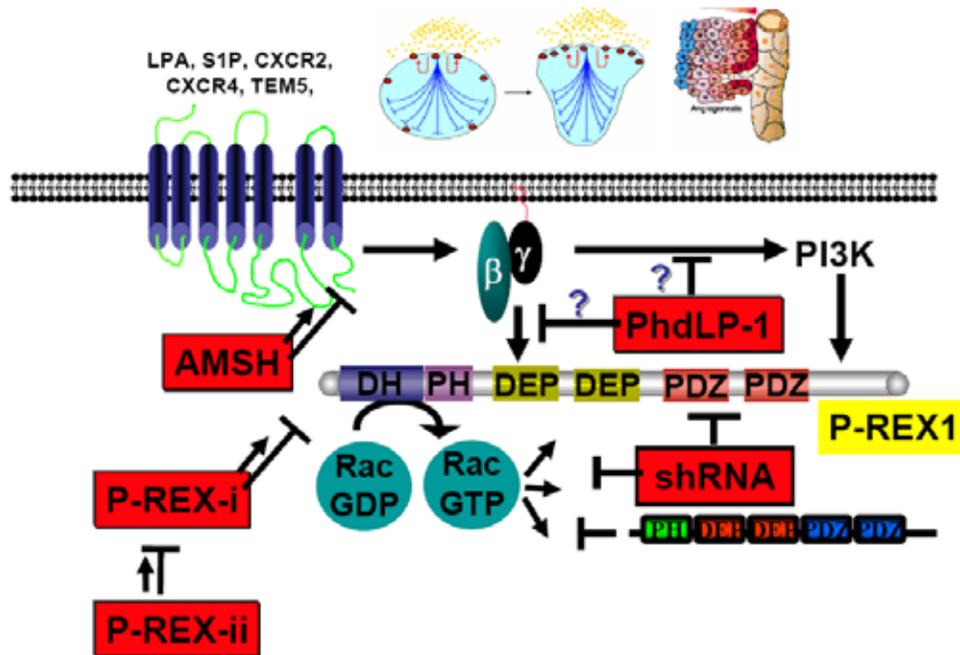


Figura 10. Mecanismos moleculares de migración endotelial dependientes de la activación de receptores acoplados a proteínas G. El modelo ilustra los posibles mecanismos moleculares responsables del proceso de angiogénesis inducida por receptores acoplados a proteínas G. Corresponde a las hipótesis establecidas en nuestro laboratorio y se ilustran algunas de las proteínas que estudiamos como posibles participantes del proceso de migración endotelial y angiogénesis.

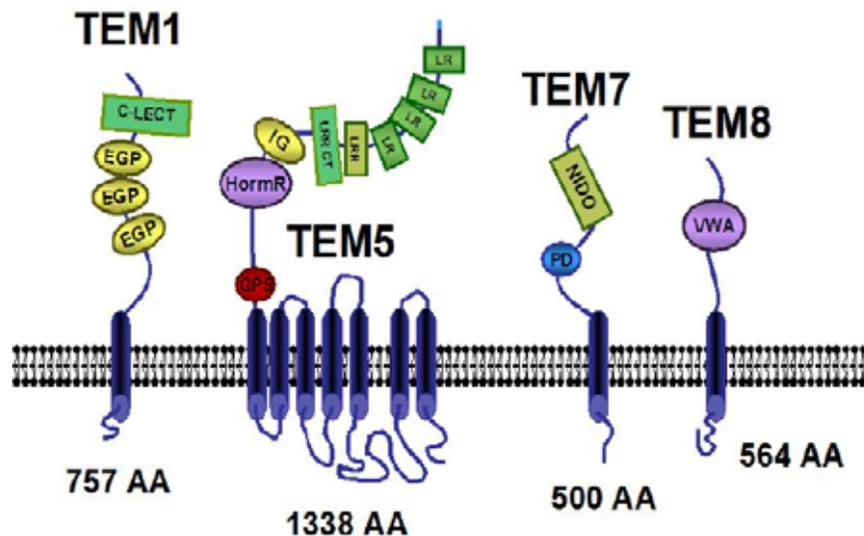


Figura 11. Estructura hipotética de algunos marcadores de endotelio tumoral. Los marcadores de endotelio tumoral fueron identificados como genes sobreexpresados en endotelio de origen tumoral en comparación con endotelio normal. La secuencia de algunos de ellos permite predecir que corresponden a proteínas insertadas en la membrana que pudieran ser blancos terapéuticos ideales, precisamente por estar expuestos a la circulación sanguínea. Figura modificada de Nanda y St Croix, 2004, *Curr Opin Oncol.* 16:44-9.

Se ha supuesto que la mayoría de los genes que son regulados a la alza en el endotelio tumoral, lo son probablemente porque participan en el proceso de la angiogénesis. Por lo que caracterizar sus funciones puede dar pistas acerca de cómo utilizarlos como blanco farmacológico. Estos estudios permitieron la identificación de marcadores del endotelio tumoral (TEM, por sus siglas en inglés, Tumor Endothelial Markers), que son aquellos genes que presentan una expresión muy elevada en el endotelio tumoral comparado con el normal [114].

El análisis de la secuencia de los marcadores de endotelio tumoral sugirió que algunos de ellos pudieran ser receptores o bien proteínas participantes en las cascadas de transducción de señales. En particular, TEM4 y TEM5, que estudiamos en el laboratorio, parecen ser respectivamente un GEF para Rho y un receptor acoplado a las proteínas G, del cual su ligando es, desde luego, desconocido. Existe un interés especial en aquellos marcadores del endotelio tumoral cuya secuencia sugiere que se trata de proteínas transmembranales que, al exponerse al exterior de la célula resultarían muy interesantes desde el punto de vista de la terapéutica; ya que su localización directa hacia el lumen del vaso sanguíneo y el haberlos encontrado en células endoteliales de vasos sanguíneos de tumores, es probable que participen en alguna forma en el proceso de vascularización tumoral, ya sea de forma directa, al permitir la respuesta a estímulos provenientes de las células transformadas, o indirecta, como respuesta de adaptación por causa de la hipoxia o la falta de nutrientes (Fig.11) [115, 116].

Como una estrategia para lograr la identificación de proteínas involucradas en el proceso de la angiogénesis, a raíz de regular la actividad de las GTPasas de la familia de Rho en células endoteliales, hemos recurrido a la información disponible públicamente, derivada de los proyectos de análisis serial de la expresión de genes para diferentes tipos de células endoteliales. Con esta información hemos obtenido una base de datos en la que las proteínas que hemos considerado posibles reguladores de la actividad de las GTPasas de la familia de Rho han sido clasificados por función. Esta base de datos permite realizar búsquedas dirigidas a la identificación de las proteínas de nuestro interés, tales como los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina y receptores acoplados a proteínas G, por citar un par de ejemplos. Además, esta base de datos nos ha permitido identificar a elementos reguladores de las GTPasas de la familia de Rho, presentes en las células endoteliales, algunos de los cuales hemos incluido en nuestros estudios moleculares para identificar a las interacciones proteína-proteína relevantes en el proceso de la angiogénesis.

Estrategias experimentales

Para identificar a los GEFs y otras proteínas de transducción de señales que pudieran ser relevantes en procesos de la angiogénesis, empleamos rutinariamente herramientas bioinformáticas, genéticas, bioquímicas y celulares. Algunos elementos que forman parte de nuestros estudios son los GEFs moduladores de la actividad de las GTPasas de la familia de Rho, así como proteínas involucradas en la transducción de señales de los receptores acoplados a proteínas G con potencial angiogénico, incluyendo proteínas de transducción que han sido identificadas como marcadores del endotelio tumoral. Nuestro trabajo cotidiano en el laboratorio involucra el empleo de técnicas de cultivo celular, análisis de proteínas por electroforesis e inmunodetección, análisis de segundos mensajeros; aislamiento, análisis y manipulación de ácidos nucleicos, particularmente amplificación y clonación de DNA y su uso para la transfección de las células endoteliales y otras células de mamífero que utilizamos como modelo; además de la transformación de bacterias y levaduras. Empleamos métodos genéticos y proteómicos para aislar elementos moduladores de la migración endotelial y de los procesos de la angiogénesis. Hacemos un uso extensivo del sistema de doble híbrido en levaduras, mismo que ofrece un enorme potencial para la identificación y aislamiento de elementos funcionales directamente por interacción molecular. Así mismo, producimos proteínas recombinantes en bacterias para determinar interacciones proteicas *in vitro* y evaluamos la migración polarizada de las células endoteliales y la angiogénesis *in vitro* en respuesta a estímulos con actividad angiogénica. Así

pues, el objetivo a largo plazo de nuestro laboratorio es entender los mecanismos moleculares que coordinan el proceso de la angiogénesis, con particular énfasis en el estudio de las proteínas que transducen las señales que dan lugar a la migración polarizada de las células endoteliales con el fin de identificar a los elementos moleculares cuya función pudiera ser inhibida para impedir la angiogénesis patológica.

Conclusiones

El área de investigación acerca de la angiogénesis y el movimiento celular polarizado ha crecido enormemente en los últimos años, gracias a las expectativas que se han gestado a raíz de su posible participación en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades de origen vascular. El descubrimiento de elementos moleculares que participan en la migración endotelial polarizada promete proveer información relevante para el diseño de agentes terapéuticos útiles como antiangiogénicos, anti metastáticos o anti-inflamatorios, que pudieran prevenir la migración no deseada de las células endoteliales.

Agradecimientos

El trabajo en nuestros laboratorios es apoyado por donativos de CONACyT (43970-Q, JVP y 45957, GRC), del Fogarty International Center, National Institutes of Health Research Grant R01TW006664 y de la fundación Miguel Alemán. MLGH, JCO, SSB y RHG son becarios de posgrado del CONACyT. Agradecemos al apoyo técnico brindado por Estanislao Escobar Islas, Margarita Valadez y Oscar Casa Mejía.

Referencias

1. Parent CA, B.B., Froehlich WM, Murphy DB, Devreotes PN (1998). G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95, 81-91.
2. Parent CA, D.P.S. (1999). A cell's sense of direction. 284, 765-770.
3. Jin T, Z.N., Long Y, Parent CA, Devreotes PN (2000). Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. *Science* 287, 1034-1036.
4. Fenteany G, Z.S. (2003). Small-molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility. *Curr Top Med Chem* 3, 593-616.
5. Ridley AJ, S.M., Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
6. Munoz-Chapuli, R., Quesada, A.R., and Angel Medina, M. (2004). Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61, 2224-2243.
7. van Nieuw Amerongen, G.P., and van Hinsbergh, V.W. (2001). Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 300-311.
8. Weiner, O.D. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr Opin Cell Biol* 14, 196-202.
9. Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
10. Folkman, J. (2004). Endogenous angiogenesis inhibitors. *Apmis* 112, 496-507.
11. Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
12. Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2, 727-739.
13. Vazquez-Prado, J., Basile, J., and Gutkind, J.S. (2004). Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. *Methods Enzymol* 390, 259-285.
14. Iruela-Arispe, M.L., and Dvorak, H.F. (1997). Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 78, 672-677.
15. Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.

16. Richard, D.E., Vouret-Craviari, V., and Pouyssegur, J. (2001). Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Oncogene* 20, 1556-1562.
17. Nanda A, B.S.C. (2004). Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Current Opinion in Oncology* 16, 44-49.
18. Zhang, H.T., and Harris, A.L. (1998). Anti-angiogenic therapies in cancer clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 7, 1629-1655.
19. Ferrara, N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29, 10-14.
20. Ferrara N, H.K., Gerber HP, Novotny W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3, 391-400.
21. Carmeliet P, J.R. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
22. Cristofanilli M, C.C., Hortobagyi GN (2002). Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* , 1, 415-426.
23. Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Chen, H.X., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y., and Jain, R.K. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10, 145-147.
24. Hurwitz H, F.L., Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.
25. Eskens, F. (2004). Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer*. 90, 1-7.
26. Mazitschek R, G.A. (2004). Inhibitors of angiogenesis and cancer-related receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Chem Biol*. 8, 432-441.
27. Rafii S, L.D. (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 9, 702-712.
28. Yla-Herttuala S, A.K. (2003). Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 9, 694-701.
29. Simons M, W.J. (2003). Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2, 863-871.
30. Khakoo AY, F.T. (2005). Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med*. 56, 79-101.
31. Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
32. Etienne-Manneville S, H.A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
33. Comer FI, P.C. (2002). PI 3-kinases and PTEN: how opposites chemoattract. *Cell* 109, 541-544.
34. Funamoto S, M.R., Lee S, Parry L, Firtel RA: , (2002). Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*, 611-623.
35. Iijima M, D.P. (2002). Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* 109, 599-610.
36. Wang F, H.P., Weiner OD, Srinivasan S, Servant G, Bourne HR (2002). Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol* 4, 513-518.
37. Weiner OD, N.P., Prestwich GD, Kirschner MW, Cantley LC, Bourne HR (2002). A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol* 4, 509-513.
38. Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.
39. Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
40. Wang, H.R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A.A., Alexandrova, E., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775-1779.
41. Eva, A., and Aaronson, S.A. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 316, 273-275.
42. Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A., and Cerione, R.A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354, 311-314.
43. Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A., and Zheng, Y. (1994). Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem* 269, 62-65.

44. Hill, K., Krugmann, S., Andrews, S.R., Coadwell, W.J., Finan, P., Welch, H.C., Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. (2005). Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma subunits. *J Biol Chem* 280, 4166-4173.
45. Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* 108, 809-821.
46. Weiner, O.D. (2002). Rac activation: P-Rex1 - a convergence point for PIP(3) and Gbetagamma? *Curr Biol* 12, R429-431.
47. Rosenfeldt, H., Vazquez-Prado, J., and Gutkind, J.S. (2004). P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett* 572, 167-171.
48. Li Z, P.J., Wang Z, Hla T, Wu D. (2005). Role of guanine nucleotide exchange factor P-Rex-2b in sphingosine 1-phosphate-induced Rac1 activation and cell migration in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 76, 95-104.
49. Soga, N., Namba, N., McAllister, S., Cornelius, L., Teitelbaum, S.L., Dowdy, S.F., Kawamura, J., and Hruska, K.A. (2001). Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility. *Exp Cell Res* 269, 73-87.
50. Soga, N., Connolly, J.O., Chellaiah, M., Kawamura, J., and Hruska, K.A. (2001). Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility. *Cell Commun Adhes* 8, 1-13.
51. Connolly, J.O., Simpson, N., Hewlett, L., and Hall, A. (2002). Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol Biol Cell* 13, 2474-2485.
52. Tzima, E., del Pozo, M.A., Shattil, S.J., Chien, S., and Schwartz, M.A. (2001). Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *Embo J* 20, 4639-4647.
53. Tzima, E., Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Mohamed, S.A., Li, S., Chien, S., and Schwartz, M.A. (2002). Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *Embo J* 21, 6791-6800.
54. Zeng, H., Zhao, D., and Mukhopadhyay, D. (2002). KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem* 277, 46791-46798.
55. Vazquez-Prado, J., Miyazaki, H., Castellone, M.D., Teramoto, H., and Gutkind, J.S. (2004). Chimeric G alpha i2/G alpha 13 proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by G alpha 13. *J Biol Chem* 279, 54283-54290.
56. Barac, A., Basile, J., Vazquez-Prado, J., Gao, Y., Zheng, Y., and Gutkind, J.S. (2004). Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor. *J Biol Chem* 279, 6182-6189.
57. Perrot, V., Vazquez-Prado, J., and Gutkind, J.S. (2002). Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors Leukemia-associated RhoGEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J Biol Chem*.
58. Chikumi, H., Vazquez-Prado, J., Servitja, J.M., Miyazaki, H., and Gutkind, J.S. (2002). Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. *J Biol Chem* 277, 27130-27134.
59. Park, H.J., Kong, D., Iruela-Arispe, L., Begley, U., Tang, D., and Galper, J.B. (2002). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res* 91, 143-150.
60. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.
61. Carmeliet P, C.D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci.* 902, 249-262.
62. Javerzat S, A.P., Bikfalvi A. (2002). The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* 8, 483-489.
63. Jones N, I.K., Dumont DJ, Alitalo K. (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 257-267.
64. Yancopoulos GD, D.S., Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
65. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
66. Carmeliet (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.
67. Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-438.

68. Grant, M.B., May, W.S., Caballero, S., Brown, G.A., Guthrie, S.M., Mames, R.N., Byrne, B.J., Vaught, T., Spoerri, P.E., Peck, A.B., and Scott, E.W. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8, 607-612.
69. Tepper OM, C.J., Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gartner GC. (2005). Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 105, 1068-1077.
70. Asahara T, M.T., Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
71. Folkman J, S.Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267, 10931-10934.
72. Ruiz de Almodovar, C., Lutun, A., and Carmeliet, P. (2006). An SDF-1 trap for myeloid cells stimulates angiogenesis. *Cell* 124, 18-21.
73. Wei J, B.S., Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, Vlastos GA, Chan G, Fischer KD, Rattat D, Debatin KM, Hatzopoulos AK, Beltinger C. (2004). Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell.* 5, 477-488.
74. De Palma M, V.M., Roca C, Naldini L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 9, 789-795.
75. Peters BA, D.L., Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C (2005). Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med.* 11, 261-262.
76. Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18, 1723-1729.
77. Sodhi, A., Montaner, S., and Gutkind, J.S. (2004). Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 998-1012.
78. Lefkowitz, R.J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25, 413-422.
79. Van Leeuwen, F.N., Olivo, C., Grivell, S., Giepmans, B.N., Collard, J.G., and Moolenaar, W.H. (2003). Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem* 278, 400-406.
80. Hamm, H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4819-4821.
81. Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L., and Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274, 768-770.
82. Kostenis, E., Conklin, B.R., and Wess, J. (1997). Molecular basis of receptor/G protein coupling selectivity studied by coexpression of wild type and mutant m2 muscarinic receptors with mutant G alpha(q) subunits. *Biochemistry* 36, 1487-1495.
83. Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204.
84. Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
85. Hur, E.M., and Kim, K.T. (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 14, 397-405.
86. Offermanns, S.G.-p.a.t.i.t.s. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol.* 83, 101-130.
87. Gaudet, R., Bohm, A., and Sigler, P.B. (1996). Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin. *Cell* 87, 577-588.
88. Lukov, G.L., Myung, C.S., McIntire, W.E., Shao, J., Zimmerman, S.S., Garrison, J.C., and Willardson, B.M. (2004). Role of the isoprenyl pocket of the G protein betagamma subunit complex in the binding of phosducin and phosducin-like protein. *Biochemistry* 43, 5651-5660.
89. Belisle, B., and Abo, A. (2000). N-Formyl peptide receptor ligation induces rac-dependent actin reorganization through Gbeta gamma subunits and class Ia phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* 275, 26225-26232.
90. Goel, R., Phillips-Mason, P.J., Gardner, A., Raben, D.M., and Baldassare, J.J. (2004). Alpha-thrombin-mediated phosphatidylinositol 3-kinase activation through release of Gbetagamma dimers from Galphaq and Galphai2. *J Biol Chem* 279, 6701-6710.
91. Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Barak, L.S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M.G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800-1803.
92. Paik, J.H., Chae, S., Lee, M.J., Thangada, S., and Hla, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and

- Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem* 276, 11830-11837.
93. Lee, M.J., Thangada, S., Paik, J.H., Sapkota, G.P., Ancellin, N., Chae, S.S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., Alessi, D.R., and Hla, T. (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 8, 693-704.
 94. Wang F, V.B.J., Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S (1999). Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 274, 35343-35350.
 95. Griffin, C.T., Srinivasan, Y., Zheng, Y.W., Huang, W., and Coughlin, S.R. (2001). A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science* 293, 1666-1670.
 96. Schraufstatter, I.U., Chung, J., and Burger, M. (2001). IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1094-1103.
 97. Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R.M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 165, 5269-5277.
 98. Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.
 99. Carson-Walter EB, W.D., Nanda A, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B (2001). Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res* , 61, 6649-6655.
 100. Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
 101. Guleng, B., Tateishi, K., Ohta, M., Kanai, F., Jazag, A., Ijichi, H., Tanaka, Y., Washida, M., Morikane, K., Fukushima, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Kawabe, T., Miyagishi, M., Taira, K., Sata, M., and Omata, M. (2005). Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res* 65, 5864-5871.
 102. Ceradini DJ, K.A., Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864.
 103. Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.
 104. Flomenberg, N., Devine, S.M., Dipersio, J.F., Liesveld, J.L., McCarty, J.M., Rowley, S.D., Vesole, D.H., Badel, K., and Calandra, G. (2005). The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867-1874.
 105. Devine, S.M., Flomenberg, N., Vesole, D.H., Liesveld, J., Weisdorf, D., Badel, K., Calandra, G., and DiPersio, J.F. (2004). Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 22, 1095-1102.
 106. Connolly JO, S.N., Hewlett L, Hall A. (2002). Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol Biol Cell* 13, 2474-2485.
 107. Cascone Ilaria, E.G., Francesca Caccavari, Lucia Napione, Elisa Bertotti, John G. Collard, Guido Serini, and Federico Bussolino, and , D. (2003). Temporal and Spatial Modulation of Rho GTPases during in Vitro Formation of Capillary Vascular Network: ADHERENS JUNCTIONS AND MYOSIN LIGHT CHAIN AS TARGETS OF Rac1 AND RhoA. *J. Biol. Chem.* 278, 50702 - 50713.
 108. Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., and Hla, T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301-312.
 109. Hoang MV, W.M., Senger DR. (2004). Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1874-1879.
 110. Su ZJ, H.C., Goodall GJ, Reck NM, Leske AF, Davy A, Kremmidiotis G, Vadas MA, Gamble JR. (2004). A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 12212-12217.
 111. Burrige K, W.K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.

112. Hristov M, E.W., Weber PC. (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23, 1185-1189.
113. Donald, S., Hill, K., Lecureuil, C., Barnouin, R., Krugmann, S., John Coadwell, W., Andrews, S.R., Walker, S.A., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., and Welch, H.C. (2004). P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett* 572, 172-176.
114. St. Croix B, C.R., Victor Velculescu, Giovanni Traverso, Katherine E. Romans, Elizabeth Montgomery, Anita Lal, Gregory J. Riggins, Christoph Lengauer, Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler (2000). Genes Expressed in Human Tumor Endothelium. *Science* 289, 1197-1202.
115. St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K.E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G.J., Lengauer, C., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289, 1197-1202.
116. Nanda, A., and St Croix, B. (2004). Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 16, 44-49.

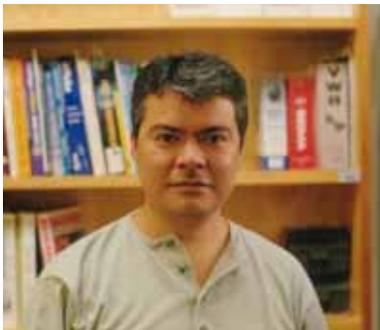
MECANISMOS MOLECULARES DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y ANGIOGÉNESIS: PAPEL REGULADOR DE LAS GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho

Resumen

La identificación y caracterización molecular de los elementos reguladores de la migración endotelial, particularmente aquellos involucrados en la activación de las GTPasas de Rho, es relevante para el diseño de estrategias terapéuticas útiles para promover un crecimiento benéfico de vasos sanguíneos o para bloquear el desarrollo de tumores, al bloquear su vascularización.

Palabras clave: Angiogénesis, migración endotelial, GTPasas Rho, RhoGEFs.

Semblanza del Dr. José Vázquez Prado.



El Dr. José Vázquez Prado es Biólogo, por la ENEP-Iztacala UNAM (1989). Maestro en Ciencias, Biología Celular, por parte del CINVESTAV-IPN (1993). Doctor en Investigación Biomédica Básica, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM (1996). Investigador Asociado Posdoctoral en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM (1996-1999). Posdoctoral Fellow. National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda MD, USA (1999-2002). Actualmente es Investigador 3^a, Sección Externa de farmacología, CINVESTAV-IPN y miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel II. Mención honorífica en la obtención del grado de Doctor en

Investigación Biomédica Básica. 15 de Noviembre de 1996. Mención honorífica en el premio Weizmann 1997 en el área de Ciencias Naturales. Receptor de la medalla Alfonso Caso por la UNAM, aprobado por el consejo Universitario el 2 de diciembre de 1997.

Líneas de Investigación:

Caracterización de los elementos moleculares que coordinan la migración polarizada de células endoteliales como parte del proceso de formación de vasos sanguíneos. Énfasis en la transducción de señales angiogénicas y en el estudio de las interacciones establecidas por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, mismos que, a través de diversos dominios estructurales, son capaces de ensamblar complejos de transducción responsables de coordinar

la activación de las GTPasas de la familia de Rho, induciendo cambios en el comportamiento celular que favorecen el movimiento polarizado en dirección al gradiente de factores angiogénicos. Ha publicado 7 artículos internacionales en los últimos 3 años.

Algunas de sus publicaciones:

- Vázquez-Prado J, Basile J, Gutkind JS. (2004). Modular Architecture and Novel Protein-Protein Interactions Regulating RGS-Containing RhoGEFs. *Methods in Enzymology* 390:259-85.
- Rosenfeldt H, Vázquez-Prado J, Gutkind JS. (2004) P-Rex2, a novel PI-3-Kinase sensitive Rac Exchange Factor. *FEBS-Letters*. 572(1-3):167-71.
- Barac A, Basile J, Vázquez-Prado J, Gao Y, Zheng Y, Gutkind JS (2004). Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor. *J Biol Chem*. 279(7):6182-9
- Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., and García-Sáinz, JA. (2003). G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cellular Signaling* 15(6):549-557.
- Perrot, V., J. Vázquez-Prado, and J.S. Gutkind. (2002). Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors Leukemia-associated RhoGEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J Biol Chem*. 277, 43115-43120.
- Chikumi, H., J. Vázquez-Prado, J.M. Servitja, H. Miyazaki, and J.S. Gutkind. (2002). Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. *J Biol Chem*. 277:27130-4.