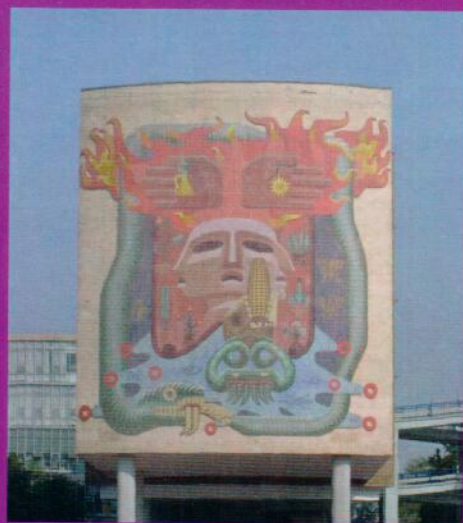




*Facultad de Medicina, UNAM  
Departamento de Bioquímica*



# ***MENSAJE BIOQUÍMICO***

***EDITORES: H. RIVEROS ROSAS; O. FLORES HERRERA;  
A. SOSA PEINADO; E. VÁZQUEZ CONTRERAS; E. RENDÓN  
HUERTA; I. VELÁZQUEZ LÓPEZ.***



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## Editorial

### LAS NOVEDADES EN EL “TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA” Y EL LIBRO “MENSAJE BIOQUÍMICO” (2002-2005).

En esta ocasión presentamos la edición XXIX del Libro “Mensaje Bioquímico” que publica la Facultad de Medicina de la UNAM desde hace más de tres décadas. En los últimos 4 años el comité editorial ha dado un giro a la edición de este material. En primer lugar el formato del libro cambió, anteriormente se publicaba en un formato francés y ahora lo hacemos con un formato tamaño carta; este cambio a redituado en la calidad y resolución de las figuras que se pueden incluir por cada hoja. También cambiamos el tipo de papel, ahora utilizamos uno de mejor calidad. La portada y contraportada de nuestro libro es ahora plastificada, lo que se ve directamente relacionado con la vida útil de los ejemplares. Otro cambio muy importante que incluimos en las nuevas ediciones del libro es la presencia de figuras a color, directamente impresas por inyección de tinta. Todos estos cambios en el formato hacen a los ejemplares del “Mensaje Bioquímico” un libro enormemente atractivo. Aún así, no todos los cambios son de esta índole, también incluimos otras modificaciones en cuanto al tipo de información que contienen los capítulos que ahí se presentan. Por ejemplo ahora incluimos un resumen del capítulo, un abstract del mismo y una semblanza que incluye la foto del autor principal del capítulo así como su dirección electrónica y postal.

Los autores del “Mensaje Bioquímico”, son los personajes centrales de estas actividades docentes pues también son los invitados como expositores en el “Taller de Actualización Bioquímica”, de tal forma que son las estrellas principales de estas actividades, ya que dictan conferencias de gran calidad en español sobre temas de vanguardia y al mismo

tiempo le entregan a los participantes del “Taller de Actualización Bioquímica” y a muchas otras personas que no asisten directamente a su plática, un capítulo en el libro “Mensaje Bioquímico”, que resume las generalidades del tema tratado en la conferencia. En esta ocasión contamos con la colaboración del **Dr. Julio Sotelo** del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, del cual es Director, quien nos platica sobre el uso de los factores de crecimiento en tumores cerebrales, como interesantes blancos terapéuticos”, este tema es muy llamativo pues está relacionado directamente con el estudio del origen y la posible regulación de procesos celulares anómalos que están involucrados con padecimientos que forman parte de los problemas actuales de salud pública mundial como lo es el cáncer. La Dra. **Ana María López Colomé** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, nos lleva por el camino de los mecanismos moleculares que controlan la función de los transportadores y receptores en la retina, esto interesantes procesos bioquímicos que ocurren para que la visión se lleve a cabo, son descritos con gran detalle y actualidad por esta entusiasta autora, quien además en el pasado colaboró activamente con el Comité Editorial para la elaboración de varios de los volúmenes anteriores de este libro. El interesante capítulo del **Dr. Víctor E. Márquez** del Laboratory of Medicinal Chemistry, Center for Cancer Research, USA, versa sobre el diseño molecular de diacilglicerol lactonas, que son compuestos químicos que funcionan como activadores específicos de isómeros de la proteína cinasa c (PKC) y de otras proteínas que poseen receptores similares. El papel central que desempeña la PKC en los circuitos de información celular la señala entre otras proteínas, como un blanco terapéutico importante para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades por lo que los procesos relacionados con esta proteína se estudian con gran detalle, de aquí la actualidad del tema presentado en este capítulo. La **Dra. Claudia González Espinosa** del Centro de Estudios Avanzados del IPN, Sede Sur escribió un interesante capítulo sobre las citocinas, que son el conjunto de proteínas que secretan diferentes tipos celulares, fundamentalmente del sistema inmune, como respuesta a una estimulación inmunológica o como señal intercelular tras la activación de una de ellas. Las citocinas presentan gran variedad de funciones y son de gran importancia en la respuesta inmune, tanto natural o innata como adquirida, en particular el artículo de esta autora se centra en la transducción de señales en las células cebadas y los mecanismos que controlan la desgranulación y la síntesis diferencial de este tipo particular de biomoléculas. El **Dr. Juan Riesgo Escovar** del Instituto de Neurobiología de la UNAM, con sede en Juriquilla, Qro. (Premio Universidad Nacional para Jóvenes Académicos 2004) escribió un muy interesante capítulo denominado “Nanahuatzin y la neurogenética: relación con el metabolismo de los fosfolípidos”; en este capítulo de alguna forma describe la evolución del estudio de los lípidos, de cómo pasaron de ser vistos únicamente como moléculas de reserva o almacenamiento de energía celular, a importantes moléculas de señalización celular. Los trabajos del autor se caracterizan además de ser muy interesantes, por utilizar a la mosca de la fruta como modelo de estudio. Por otra parte, el capítulo que nos regala el **Dr. Rafael Villalobos Molina** de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM trata sobre los adrenorreceptores  $\alpha_1$  vasculares y su participación en la hipertensión, que es el término que se refiere al viaje de la sangre por las arterias a una presión mayor que la deseable para mantener en buen estado la salud; la hipertensión aqueja a muchas personas en el mundo y está relacionada con otros procesos cardiacos, describir el funcionamiento de todo tipo de receptores en estos procesos vasculares es un tema de mucha actualidad. En otro orden de ideas, el **Dr. Gerardo R. Vasta** del Center of Marine Biotechnology University of Maryland

Biotechnology Institute nos informa sobre los aspectos moleculares, estructurales y evolutivos de las interacciones proteína-carbohidrato en la inmunidad innata; en la actualidad una de las preguntas centrales de la bioquímica es cómo se pliegan las proteínas para realizar su función, un interesante tópico que está relacionado con esta situación, es la unión de moléculas específicas por las enzimas. Las interacciones proteína-carbohidrato gobiernan muchos procesos de reconocimiento celular, de ahí los estudios relacionados con la inmunidad innata que desarrolla este autor. El capítulo que escribió el **Dr. Jesús Chimal Monroy** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (Premio Jorge Rosenkranz 2004) trata sobre la apoptosis, que no es otra cosa que la muerte celular programada, en un principio este evento sorprendió mucho a los científicos cuando lo observaron en el gusano *C. elegans*, pero con el tiempo se encontró que es común para muchos eventos y organismos; en este capítulo se describe el control molecular de éste proceso durante la morfogénesis de la mano. Después de la fecundación, durante muchas generaciones, las células que ahí se forman son clones, muchos eventos bioquímicos han de suceder para que estas células idénticas se diferencien, un proceso que es incluso una variedad muy interesante son los sexos masculino y femenino, en este sentido, la **Dra. Susana Kofman** de la Facultad de Medicina, UNAM escribió un capítulo para nosotros, en el cual relata los avances en el conocimiento de la diferenciación sexual normal y patológica en el humano. El metabolismo también puede verse como una serie de tuberías que se conectan unas con otras a través de ciertas válvulas que vendrían a ser las enzimas; las tuberías pueden entonces, dependiendo de las necesidades corpóreas del momento ensancharse o adelgazarse, dependiendo del trabajo ejercido por ciertas enzimas en la vía para aumentar o disminuir el flujo de metabolitos, el Dr. **Rafael Moreno Sánchez** del Instituto Nacional de Cardiología nos cuenta sobre el análisis de control de flujo como una herramienta para la manipulación de ciertas vías metabólicas. El genoma es el generador en última instancia de proteínas, entendidas éstas como cadenas de residuos de aminoácidos con una estructura tridimensional particular que les dicta una función particular, pero muchas veces se olvida que el metabolismo en realidad está compuesto de la combinación de estas biomoléculas con los otros tipos existentes, de ahí que el capítulo que escribió el **Dr. Jaime Mas Oliva** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Programa Universitario de Investigación en Salud) trata sobre la correlación estructura / función de apolipoproteínas humanas que están involucradas en muchos procesos metabólicos, incluso algunas de ellas relacionadas con padecimientos muy actuales como las lipoidosis. Para todos los entendidos de la Bioquímica es bien claro que el proceso enseñanza-aprendizaje de esta disciplina científica es muy complejo, la combinación de los eventos puramente químicos de la materia en combinación con la inmensa cantidad de información biológica que poseemos, hace que esta disciplina científica sea constantemente retada en ese sentido, de ahí que la **Dra. Gloria Gutiérrez Venegas** de la División de Estudios de Posgrado e Investigación Facultad de Odontología, UNAM (XV Premio Nacional de Investigación de la Fundación Glaxo Smith Kline) nos relata sobre los eventos y herramientas que han desarrollado en la Facultad de Odontología para el mejoramiento de la enseñanza de la Bioquímica. Muy relacionado con el capítulo anterior, está el que desarrolla el **Dr. Héctor G. Riveros Rotge** del Instituto de Física, UNAM (Premio Universidad Nacional 2000) quién dejó plasmadas sus vivencias como destacado investigador, en un texto que describe el placer que produce investigar y la innegable satisfacción que causa el entender fenómenos complejos; preocupado por transmitir sus experiencias a otros colegas, el autor describe en este texto sus ideas y experiencias para incentivar la investigación y la didáctica.



Los **Doctores Alejandro Sosa Peinado y Edgar Vázquez Contreras** de la Facultad de Medicina e Instituto de Química de la UNAM respectivamente, impartirán un curso taller denominado "Taller sobre estructura y visualización de proteínas". Estos autores junto con sus alumnos escribieron el manual para tal curso que también se encuentra dentro de los capítulos del Mensaje Bioquímico 2005 y en donde describen de manera muy clara cómo se puede utilizar un programa de visualización molecular, así como los principios básicos que hoy se deben tomar en cuenta para la obtención y el análisis de la estructura tridimensional de las biomoléculas, en particular las proteínas. Vayan nuestros más sinceros agradecimientos a todos estos destacados científicos que participaron en esta ocasión como ponentes en el "Taller de actualización bioquímica" 2005 y a los autores y colaboradores de los capítulos del "Mensaje Bioquímico" XXIX. Gracias nuevamente.

Otro cambio que hemos realizado en la edición del libro "Mensaje Bioquímico", es incrementar el número de editores que participan en este arduo trabajo. Para la edición del volumen XXIX se sumaron a la labor que ya se venía desarrollando las **Doctoras Isabel Velázquez López y Erika P. Rendón Huerta**, ambas profesoras del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y quienes con su feminidad y simpatía, trajeron mejores momentos editoriales. Es importante destacar que actualmente el libro y la organización del "taller de actualización bioquímica" demandan muchas actividades, por lo que para el 2005 el comité editorial y organizador está formado por seis profesores. Este crecimiento está justificado por los resultados de asistencia que se han presentado en el evento pues en los últimos tres años, el número de asistentes al "taller de actualización bioquímica" está entre 350 y 400, cifras históricas que se han podido alcanzar básicamente al abrir las posibilidades de inscripción.

La inscripción al evento es ahora de dos formas, originalmente el "Taller de actualización bioquímica" era accesible únicamente por medio de una cuota de recuperación, misma que es necesaria para retribuirle a nuestra *alma mater* la elaboración de los materiales impresos y el uso de sus instalaciones para tal fin; pero desde hace cuatro años, hay dos modalidades. La primera es gratuita, permite la asistencia a las conferencias y es meritoria de una constancia oficial. Para asistir de esta forma al "Taller de actualización bioquímica" es necesario inscribirse electrónicamente en una página que diseñamos anualmente para ello (<http://laguna.fmedic.unam.mx/~comitetab/historicoTAB.html>), el promedio de inscripción por esta vía para el evento del año 2003 y 2004 es de 275 personas. La otra modalidad es como antaño, con cuota de recuperación, e incluye al igual que la modalidad gratuita, la asistencia a las conferencias y es meritoria de una constancia oficial, pero además incluye un ejemplar del "Mensaje Bioquímico" del año en turno, así como la versión CD del material electrónico disponible para cada ocasión, como lo fue la "guía interactiva de química" por **Fernando Basurto** de la UAEM y el Ensayo didáctico de la glucólisis del **Dr Gustavo Viniegra** de la UAM-I en el 2004. Ese mismo año, conseguimos la donación del material electrónico sobre la mitocondria y el ciclo de Krebs desarrollados magistralmente por el **Dr Leopoldo De Meis** de la Universidad Federal de Rio de Janeiro en Brasil.

Durante estos años hemos realizado las gestiones económicas necesarias para traer por lo menos a un científico de renombre que radique en el extranjero y que pueda impartir una

conferencia en idioma español. En el 2002 se trató de la **Dra. Nancy Carrasco** del Albert Einstein College of Medicine, el **Dr. Salomón Bartnicki García**, profesor Emérito por la University of California y actualmente Director del CICESE, en Ensenada, Baja California: En el 2003 nuestra seleccionada fue la **Dra. Bertha González Pedrajo** de Yale University, y actualmente Investigadora del Inst. Fisiología Celular de la UNAM. En el 2004 rompimos el récord y conseguimos la participación del **Dr. Leopoldo De Meis** Investigador Emérito de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil, el **Dr Gutember G. Alvez** también de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil y el **Dr. Alfredo Saavedra Molina**, Investigador del Inst. Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana. Este año contamos con la presencia del **Dr. Víctor E. Márquez** del Laboratory of Medicinal Chemistry, Center for Cancer Research, USA. y con la visita del **Dr. Gerardo R. Vasta** del Center of Marine Biotechnology University of Maryland Biotechnology Institute, USA. Los recursos para estos fines los hemos obtenido de diversas instancias y aparecen enlistados en la sección de agradecimientos para esta ocasión, aunque mención especial merece el decidido apoyo que el **Dr. Edgar Zenteno Galindo**, jefe del Depto. Bioquímica, Fac. Medicina nos ha brindado en los dos últimos años.

La innovación electrónica más importante que hemos realizado para el libro “Mensaje Bioquímico” es diseñarle una versión electrónica, misma que existe desde el año 2002 y que es administrada por el **Dr. Edgar Vázquez Contreras**. Esta versión en línea es muy conveniente para aprovechar la difusión obtenida a través de la inclusión del “Mensaje Bioquímico” en las bases de datos **periodica** (<http://dgb.unam.mx/periodica.html>) y **latindex** ([www.latindex.org](http://www.latindex.org)). Dada la difusión y la vanguardia de los temas que se tratan en el libro y la excelente calidad de los capítulos magistralmente escritos por nuestros invitados, en la actualidad este libro cuenta con más de **3,300** visitas desde el 26 de febrero de 2004. Estas cifras indican que mensualmente más de 220 personas buscan información en nuestras páginas. Además una versión ejecutable del libro y diversos materiales electrónicos proporcionados por nuestros invitados han sido incluidos en un CD interactivo que se entrega a los asistentes del “Taller de actualización bioquímica”.

La información anteriormente descrita hace del “Taller de actualización bioquímica” (TAB) un curso anual que profesores, investigadores y alumnos de nivel superior, seleccionan como una actividad para actualizarse en los temas de vanguardia de la Bioquímica y compartirlos con especialistas que imparten conferencias en idioma español.

Junio 2005

Edgar Vázquez Contreras



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## HITOS EN LA HISTORIA DE LA BIOQUÍMICA

Hace . . . 5, 10, 15, 20, . . . y más años

En el año	Hace	
2000	5 años	J. Craig <b>Venter</b> y sus colegas publican la secuencia completa del genoma de <i>Drosophila melanogaster</i> .
2000	5 años	André <b>Rosenthal</b> y Yoshiyuki <b>Sakaki</b> , quienes encabezan el Proyecto del Genoma Humano, mapean la secuencia completa del cromosoma 21, el más pequeño de los cromosomas humanos.
2000	5 años	Thomas A. <b>Steitz</b> , Nenad <b>Ban</b> , Paul <b>Nissen</b> y colegas resuelven mediante cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de la subunidad mayor del ribosoma.
2000	5 años	Arvid <b>Carlsson</b> , Paul <b>Greengard</b> y Eric <b>Kandel</b> reciben el premio Nobel por sus descubrimientos sobre la transducción de señales en el sistema nervioso y en especial por la caracterización de la transmisión sináptica lenta y la memoria de corto plazo a través de fosforilación y defosforilación de proteínas.
1995	10 años	J. Craig <b>Venter</b> y sus colegas publican la primera secuencia completa del genoma de un organismo de vida libre: <i>Haemophilus influenzae</i> .
1995 <sup>1</sup>	10 años	Edward <b>Lewis</b> , Christiane <b>Nüsslein-Volhard</b> y Eric <b>Wieschaus</b> reciben el premio Nobel por sus descubrimientos concernientes al control genético de las etapas tempranas del desarrollo embrionario.
1990	15 años	Andrew Simon <b>Bell</b> , David <b>Brown</b> y Nicholas Kenneth <b>Terrett</b> patentan un compuesto dilatador de los vasos sanguíneos, el sildenafil citrato, comercializado con el nombre de <i>Viagra</i> , que es empleado para tratar la disfunción eréctil.

---

<sup>1</sup> Es difícil dejar de hacer mención que hace 10 años, también en 1995 el mexicano Mario **Molina**, junto con Sherwood **Rowland** y Paul **Crutzen** recibieron el premio Nobel por su trabajo en el área de química atmosférica y en particular por su contribución a la dilucidación de los mecanismos que participan en la formación y descomposición del ozono en la estratosfera.

En el año	Hace	
1990	15 años	French <b>Anderson</b> encabeza el primer protocolo de terapia génica aprobado en humanos para tratar de reparar una deficiencia del sistema inmune de un niño de 4 años de edad.
1985	20 años	Kary Banks <b>Mullis</b> y colaboradores desarrollan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), método que permite clonar rápidamente secuencias específicas de DNA sin necesidad de una célula viva.
1985	20 años	Michael S. <b>Brown</b> y Joseph L. <b>Goldstein</b> reciben el premio Nobel por sus contribuciones al conocimiento sobre la regulación del metabolismo del colesterol y la descripción de los receptores que participan en la internalización de las lipoproteínas.
1985	20 años	Herbert <b>Hauptman</b> y Jerome <b>Karle</b> reciben el premio Nobel por el desarrollo de métodos directos para la determinación de la estructura tridimensional de moléculas cristalizadas.
1980	25 años	Paul <b>Berg</b> recibe el premio Nobel por sus estudios sobre la Bioquímica de los ácidos nucleicos y el desarrollo de las técnicas sobre DNA-recombinante. Dicho premio lo comparte con Walter <b>Gilbert</b> y Frederick <b>Sanger</b> quienes son galardonados por sus contribuciones a la secuenciación de ácidos nucleicos.
1975	30 años	Bruce <b>Ames</b> desarrolla un método para examinar la capacidad mutagénica de diversos compuestos químicos (el ensayo de Ames).
1975	30 años	John Warcup <b>Cronforth</b> y Vladimir <b>Prelog</b> reciben el premio Nobel por sus investigaciones sobre la estereoquímica de las moléculas orgánicas y las reacciones catalizadas por enzimas.
1975	30 años	David <b>Baltimore</b> , Renato <b>Dulbecco</b> y Howard <b>Temin</b> recibieron el premio Nobel por sus descubrimientos relativos a la interacción entre los virus que producen tumores y el material genético de las células.
1970	35 años	Susumu <b>Ohno</b> publica <i>Evolution by Gene Duplication</i> , libro que describe las bases moleculares de la evolución.
1970	35 años	Mort <b>Mandel</b> demuestra que <i>Escherichia coli</i> , en presencia de CaCl <sub>2</sub> es permeable a los ácidos nucleicos. Este hallazgo será básico para el desarrollo de la ingeniería genética.
1970	35 años	El argentino Luis <b>Leloir</b> recibe el premio Nobel por el descubrimiento de los azúcares de nucleótidos y su papel en la biosíntesis de carbohidratos.
1965	40 años	Francois <b>Jacob</b> , André <b>Lwoff</b> y Jacques <b>Monod</b> reciben el premio Nobel por sus contribuciones concernientes al control genético de las enzimas y la síntesis de virus.
1965	40 años	Jacques <b>Monod</b> , Jeffries <b>Wyman</b> y Jean-Pierre <b>Changeux</b> proponen su modelo de transición alostérica de proteínas.
1965	40 años	Se terminó de elucidar el código genético, en un trabajo conjunto de los laboratorios de los doctores Marshall W. <b>Nirenberg</b> , Har G. <b>Khorana</b> y Severo <b>Ochoa</b> .



En el año	Hace	
1960	45 años	Francis <b>Crick</b> , Sydney <b>Brenner</b> y Francois <b>Jacob</b> predicen la existencia del RNA mensajero. Dos años después la predicción sería confirmada.
1960	45 años	R. <b>Hill</b> y F. <b>Bendall</b> postulan el esquema en Z de la fotosíntesis.
1960	45 años	Max <b>Perutz</b> y John <b>Kendrew</b> reportaron por primera vez la estructura cristalográfica de una proteína, la hemoglobina y mioglobina (un trabajo que Perutz inició 23 años antes).
1960	45 años	Francois <b>Jacob</b> , David <b>Perrin</b> , Carmen <b>Sánchez</b> y Jacques <b>Monod</b> proponen por primera vez la hipótesis del operón.
1955	50 años	Christian René <b>de Duvé</b> y sus colegas aíslan un nuevo organelo celular, el lisosoma.
1955	50 años	S. <b>Benzer</b> concluye que un gen tiene muchos sitios mutables.
1950	55 años	E. <b>Chargaff</b> demuestra que la relación del contenido timina/adenina y guanina/citosina en el DNA es siempre uno.
1950	55 años	Linus <b>Pauling</b> y Robert <b>Corey</b> proponen la estructura de hélice $\alpha$ para las $\alpha$ -queratinas.
1950	55 años	Barbara <b>McClintock</b> muestra evidencia sobre la existencia de elementos génicos móviles en maíz, que posteriormente serán denominados transposones.
1950	55 años	Eugene P. <b>Kennedy</b> y Albert L. <b>Lehninger</b> demuestran que dentro de la mitocondria se efectúan el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa.
1945	60 años	Erwin Rudolf Josef Alexander <b>Schrödinger</b> publica la obra <i>¿Qué es la vida?</i> libro que se convertiría en una agenda para la bioquímica durante los siguientes 30 años.
1940	65 años	George W. <b>Beadle</b> y Edward L. <b>Tatum</b> deducen la relación un gen – una enzima.
1940	65 años	Ernst B. <b>Chain</b> y Howard W. <b>Florey</b> extraen y purifican penicilina, dando inicio a su aplicación terapéutica.
1940	65 años	Herman Moritz <b>Kalckar</b> esclarece la formación de ATP en la fosforilación oxidativa.
1935	70 años	Hugh <b>Davson</b> y James Frederick <b>Danielli</b> postularon un modelo para la estructura de la membrana celular (el “sándwich” lípido-proteína).
1935	70 años	Wendell M. <b>Stanley</b> es el primero en cristalizar un virus, el del mosaico del tabaco.
1935	70 años	William Cumming <b>Rose</b> descubre la treonina, el último aminoácido esencial en ser identificado.
1935	70 años	Roger J. <b>Williams</b> y sus colegas deducen la estructura de la vitamina B <sub>1</sub> .
1935	70 años	John Tileston <b>Edsall</b> y A. <b>von Muralet</b> completan el aislamiento de la miosina del músculo.

<b>En el año</b>	<b>Hace</b>	
1930	75 años	Phoebus Aaron <b>Levene</b> elucida la estructura de los mononucleótidos y muestran que son las unidades estructurales que conforman los ácidos nucleicos.
1930	75 años	Theodor <b>Svedberg</b> inventa la ultracentrífuga y demuestra que las proteínas son macromoléculas de muy alto peso molecular.
1925	80 años	G. E. <b>Briggs</b> y J. B. S. <b>Haldane</b> elaboran importantes refinamientos a la teoría de la cinética enzimática, postulando el estado estacionario o equilibrio dinámico.
1910	95 años	P. <b>Boysen-Jensen</b> prueba la existencia de <i>auxinas</i> en plantas, hormonas que controlan el crecimiento en vegetales.
1905	100 años	<b>Metchnikoff</b> propone la teoría de que los glóbulos blancos de la sangre son capaces de engullir y matar a las bacterias.
1905	100 años	F. <b>Knoop</b> deduce la b-oxidación de los ácidos grasos.
1905	100 años	A. <b>Harden</b> y W. <b>Young</b> muestran que la fermentación alcohólica requiere fosfatos.
1890	115 años	Richard <b>Altmann</b> describe un procedimiento para teñir mitocondrias, analiza su distribución y postula que poseen autonomía genética y metabólica.
1885	120 años	Oscar <b>Hertwig</b> y Eduard <b>Strasburger</b> desarrollan la idea de que en el núcleo se localiza la base de la herencia.
1855	150 años	Claude <b>Bernard</b> aísla glucógeno del hígado, muestra que se convierte en glucosa y descubre el proceso de gluconeogénesis.
1815	190 años	Jean-Baptiste <b>Biot</b> descubre la actividad óptica de poseen algunos compuestos orgánicos.
1810	195 años	Louis Joseph <b>Gay-Lussac</b> deduce la ecuación de la fermentación alcohólica.

Información recopilada de diversas fuentes por:  
Héctor Riveros Rosas  
Adriana Julián Sánchez



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bg.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## MECANISMOS DE CONTROL TRADUCCIONAL EN LA GERMINACIÓN DE MAÍZ

Estela Sánchez de Jiménez, Tzvetanka D. Dinkova y Homero Reyes de la Cruz  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Facultad de Química, UNAM,  
Ciudad Universitaria 04510, México, D.F. México

### MECHANISMS OF TRANSLATIONAL CONTROL IN THE MAIZE GERMINATION

#### Abstract

*Eukaryotic gene expression is regulated, both at transcriptional and translational levels. The distinctive temporal and spatial distribution of transcription and translation in these organisms has evolved in multiple mechanisms of translational control to modulate the efficiency of mRNA translation in the absence of changes in transcript cellular levels. This kind of regulation allows a precise, immediate, and energetically favorable way to induce protein pattern changes in response to specific environmental conditions, i.e. during development, hormone stimulation, nutrient availability, stress, and others. Much of the translational regulation occurs at the level of initiation. During this step, the mRNA must be recognized by the translational machinery, and an active initiation complex between mRNA, initiator-tRNA, and the 40S small ribosomal subunit should be formed. This process requires the participation of multiple protein factors and specific sequences at the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of the mRNA, as well. Our research has focused on the study of different mechanisms of translational control at the level of initiation during the process of maize germination. These include the regulation by the mRNA cap (<sup>7</sup>mGpppN)-binding initiation factor, the role of specific sequences termed internal ribosomal entry sites (IRES) in the 5'UTR of mRNAs, and the relevance of ribosomal protein S6 phosphorylation on the 40S ribosomal subunit. On the other hand, a specific signal transduction pathway leading to translational control exerted by these mechanisms in response to hormone stimuli, during maize germination, is under study.*

**Keywords:** translational control; maize germination.

## **Introducción**

Una de las áreas de mayor importancia para comprender el funcionamiento de los seres vivos es la regulación de la expresión de sus genes. El DNA es la molécula universal que contiene la información genética en los organismos y su expresión implica la transcripción de esta información a moléculas de RNA, en donde se conserva fielmente la secuencia nucleotídica original. Posteriormente, esta información es decodificada a moléculas de proteínas, las cuales llevan a cabo la función del gen correspondiente. Este último proceso consiste en traducir el lenguaje genético codificado en 4 letras (A, T, G, C) en otro diferente basado en 20 letras, el cual conforma el alfabeto de las proteínas en términos de aminoácidos. La combinación de los procesos de transcripción y traducción, está fuertemente regulada, ya que de ambos procesos depende el desarrollo y la sobrevivencia de los organismos.

En los años recientes, se ha incrementado la investigación en relación a los mecanismos que regulan la expresión genética de los organismos a nivel traduccional. Al conjunto de estos mecanismos se les ha denominado en forma genérica Control Traduccional, y su regulación tiene especial relevancia ya que controla la expresión de la función genética. En eucariotes los procesos de transcripción y traducción están temporal y espacialmente separados, lo cual ha generado que, a través de la evolución, estos organismos hayan desarrollado múltiples mecanismos de control traduccional.

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares más complejos, que involucra la acción concertada de moléculas de RNA y proteínas en múltiples pasos secuenciales. Es también uno de los procesos de mayor consumo de energía, por lo que su regulación está finamente acoplada al estado metabólico de las células. Por tanto, antes de discutir los mecanismos que regulan la síntesis de proteínas, es necesario puntualizar algunos de los pasos esenciales de este proceso.

## **Proceso de traducción**

En el proceso de traducción se han identificado tres etapas fundamentales con características particulares conocidas: la iniciación, la elongación y la terminación. Para que la iniciación de la traducción sea exitosa, es indispensable que ocurran algunos eventos básicos en las células, tales como: la unión de factores de iniciación a la subunidad pequeña del ribosoma, el reclutamiento del mRNA por esta subunidad, el cargado del tRNA de iniciación con metionina, la localización del sitio P del ribosoma, la identificación del codón de iniciación y finalmente, la unión de las dos subunidades del ribosoma para formar el complejo activo de iniciación. Aunque estos eventos deben ocurrir tanto en organismos procariotes como en eucariotes, existen variaciones importantes en el mecanismo de iniciación, acorde a la mecánica del proceso en cada uno de ellos.

En procariotes la traducción está acoplada a la transcripción, lo que permite que la síntesis de proteínas se inicie en los mRNAs que aún están siendo transcritos (Fig. 1). Más aún, puesto que, en términos generales, estos mRNAs son policistrónicos, el aparato traductor tiene que reconocer las señales específicas de inicio y final de la lectura en varias posiciones a lo

largo del mRNA. De aquí que existen secuencias tanto en los mRNAs como en el rRNA (Shine Dalgarno) que coadyuvan a la localización correcta del codón de iniciación.

En eucariotes, por el contrario, la síntesis de proteínas se lleva a cabo en el citoplasma celular, lo que hace que este proceso esté desacoplado temporal y espacialmente de la transcripción. Así, antes de iniciar la traducción, es necesario previamente que el transcrito se sintetice en el núcleo, y se procese a través de una serie de reacciones que finalmente producen un mRNA maduro con Cap en el extremo 5' y una cola de poly (A) en el 3'. Este mRNA es exportado al citoplasma asociado con proteínas (mRNP) y, en un momento y condición determinados, podrá ser reconocido por la maquinaria de traducción para decodificarse y producir la proteína correspondiente.

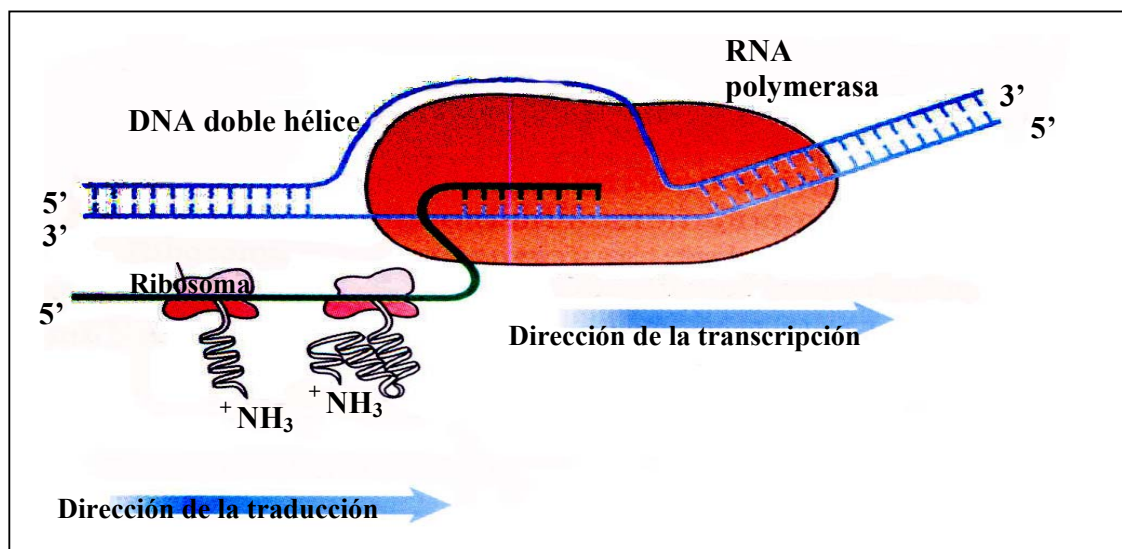


Figura 1. Esquema del proceso de transcripción y traducción en procariotes.

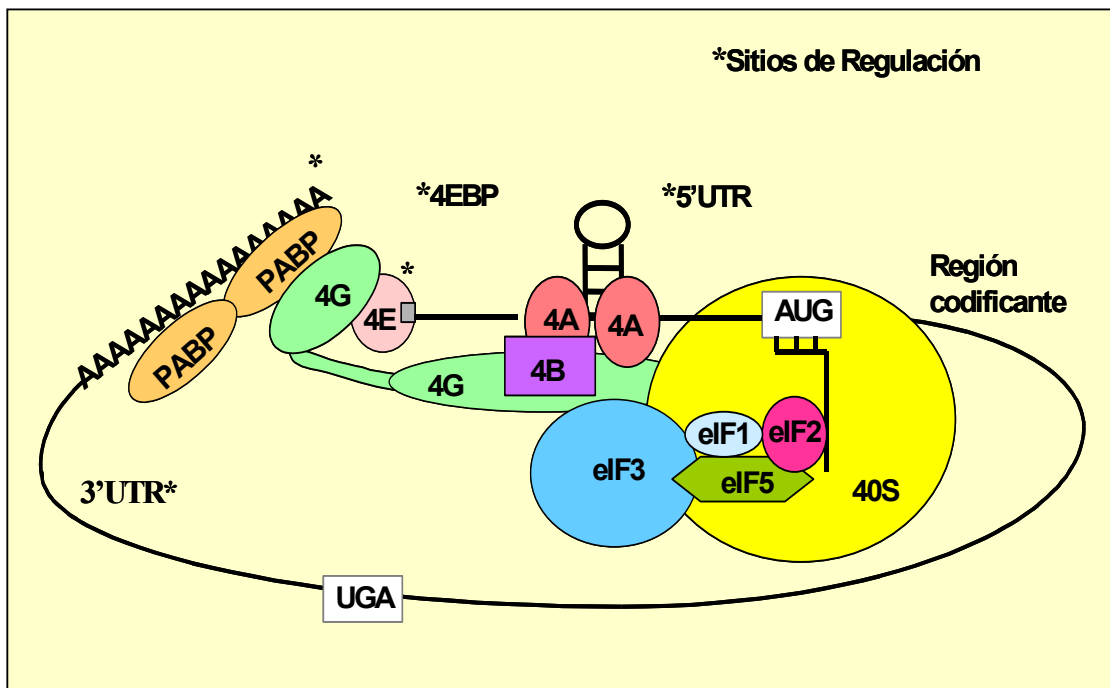
### Iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotes

Con objeto de discutir algunos de los mecanismos de Control Traduccional a nivel de la iniciación, a continuación se hace una breve descripción de los eventos a nivel molecular que participan en esta etapa de la síntesis de proteínas en eucariotes.

La base de la maquinaria de traducción la componen los ribosomas, complejos ribonucleoproteicos con un coeficiente de sedimentación 80S, en eucariotes formados por dos subunidades: 60S (subunidad grande) y 40S (subunidad pequeña). En todos los organismos, la síntesis de proteínas inicia con las subunidades ribosomales separadas, liberadas después de terminar la traducción de un mRNA (1). El mRNA maduro es monocistrónico, pero contiene dos regiones importantes que no son traducibles (UTRs) y que están a cada extremo de la molécula: 5'UTR y 3'UTR, flanqueando la región codificadora del mRNA (ORF).



Durante la etapa de iniciación de la traducción en eucariotes, el reclutamiento de un mRNA hacia el ribosoma es mediado por más factores de iniciación (eIFs) que los requeridos en los procariotes. Estos factores corresponden a la proteína eIF4E, que reconoce la estructura 5'Cap (7-metil GpppN en el extremo 5' del mRNA) la cual, mediante su interacción con el factor eIF4G, una molécula de anclaje, posibilita el reclutamiento de otros factores y la subunidad ribosomal 40S. Los factores eIF4A y eIF4B reclutados por eIF4G, funcionan como helicasas, desenrollando las estructuras secundarias en la región 5' no traducible (5'UTR) del mRNA, mediante su actividad de ATPasa. El tRNA de iniciación ya metilado forma, un complejo ternario con eIF-2 y GTP, antes de unirse a la subunidad 40S en el sitio P. El tRNA iniciador tiene una secuencia y características estructurales únicas que no se encuentran en los tRNAs elongadores, algunas de las cuales determinan su interacción con eIF-2 (2). El factor eIF3 forma un complejo multimérico con eIF4G, eIF1A, eIF2-tRNA<sup>met</sup> y eIF5 para el escaneo de la región 5'UTR del mRNA hasta encontrar el codón de inicio AUG. Por su parte, la proteína PABP (*Poly A binding protein*) es la que reconoce específicamente la región final de poli (A) del mRNA y mediante su interacción con eIF4G, circulariza al mRNA, lo que permite incrementar la estabilidad y la eficiencia traduccional de los mensajes (Fig. 2). Este complejo de iniciación activado permite la interacción del factor eIF5 con el factor eIF2 y se activa la hidrólisis del GTP intrínsecamente unido a este último factor. La hidrólisis de GTP promueve la liberación de algunos de los factores de iniciación y permite la unión de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S.



**Figura 2.** Interacción entre los factores de iniciación de la traducción, el mRNA y la subunidad ribosomal 40S durante la fase de iniciación de la traducción. La proteína eIF4G actúa como punto de anclaje para los factores que reconocen el extremo 5'UTR del mRNA, la subunidad ribosomal 40S y las proteínas que unen a la cola de poli (A).

En la regulación de la traducción también intervienen las dos regiones no traducibles del mRNA. En la región 5'UTR, los elementos importantes son la estructura <sup>7</sup>mGpppN (Cap) (3), la presencia de estructuras secundarias y la longitud de esta región, así como la presencia de codones de iniciación "río arriba" de la región codificante (uORF) (4). Existen estructuras específicas en esta región conocidas como sitios de entrada interna al ribosoma (IRES: *internal ribosomal entry site*) que son capaces de hacer ingresar al mRNA que las contiene al ribosoma y lograr una traducción independiente de Cap. En la región 3'UTR se han encontrado también elementos de regulación que participan en la estabilidad y localización citoplásmica de los mRNAs (5).

### **Importancia del control traduccional**

En los últimos años se han logrado grandes avances en el entendimiento del control de la traducción de los mRNAs, ya sea a través de la regulación de las proteínas que se unen a mRNAs específicos y regulan su traducción; o a través del control de las actividades de los componentes de la maquinaria traduccional.

El control de la expresión genética a nivel traduccional presenta grandes ventajas: es un control de respuesta rápida, reversible, específica, y de ajuste fino para la concentración de proteínas. Estos mecanismos permiten una regulación coordinada en la producción de familias de proteínas, tienen además potencial para llevar a cabo control espacial y son eficaces en sistemas que carecen de control transcripcional, especialmente en células sin núcleo. Además, el control de la síntesis específica de proteínas en eucariontes tiene papeles críticos en el desarrollo, diferenciación, progresión del ciclo celular y apoptosis (5).

En diferentes organismos se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con los eventos que controlan la síntesis de proteínas confirmándose la relevancia de este nivel de regulación de expresión genética. Dado que el proceso de traducción es sumamente costoso desde el punto de vista energético, las células mantienen muy regulado el paso de iniciación de la síntesis de proteínas. Es así que los reportes más abundantes se refieren a investigaciones en esta etapa, la cual permite regular no solo el proceso cinético en su conjunto, sino que en forma selectiva puede controlar la traducción de mRNAs específicos, en concordancia con las necesidades de las células, especialmente en etapas determinadas de desarrollo, o como respuesta a señales internas o ambientales que las afecta, permitiendo así la adaptación y sobrevivencia de los organismos.

### **Regulación de la traducción en plantas**

Las plantas, al igual que otros eucariotes, sintetizan sus proteínas por un proceso similar al aquí descrito. Existen, sin embargo, algunas diferencias mecanísticas y de regulación como respuesta a los efectores específicos de luz, hidratación, cambios de temperatura, etcétera, que les ha permitido desarrollar adaptaciones específicas a los efectos ambientales. En relación a esta circunstancia a continuación plantearémos la investigación realizada en nuestro departamento en un modelo vegetal específico.

### **Modelo de estudio: ejes de maíz en la germinación**

La germinación de las semillas puede definirse como la serie de cambios morfológicos y bioquímicos que conllevan a la transformación de un embrión en plántula (Figura 3).

Las semillas maduras, sin germinar, poseen un mínimo de agua (aproximadamente un 15%) y se encuentran en un estado metabólico prácticamente inactivo. Cuando ocurre la imbibición, la semilla se rehidrata rápidamente y se activa el metabolismo celular que permitirá llevar a cabo la elongación del eje embrionario, la protrusión de la radícula y el posterior establecimiento de la planta. En una etapa temprana de la germinación, inmediata a la imbibición, se detecta la síntesis de proteínas. Este es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de las semillas (6). En los embriones de semillas maduras se encuentran todos los componentes requeridos para el proceso de síntesis de proteínas (7) incluyendo un grupo de mRNAs muy específicos, almacenados en el eje embrionario en estado quiescente. Sin embargo, no hay polisomas formados. La traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial, ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación, mientras que otros se traducen en etapas más tardías a pesar de estar presentes desde el inicio del proceso (6).

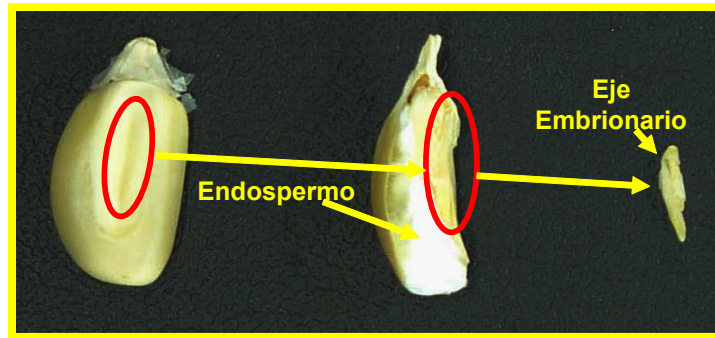
La transcripción de genes, se observa en una etapa posterior a la del inicio de la traducción, (7). Se considera que a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción *de novo* de mRNAs. Algunos de estos nuevos mensajes codifican para proteínas ya contenidas en los mensajes almacenados, pero muchos codifican para productos diferentes, probablemente esenciales para la división celular y el crecimiento posterior de la plántula. En las semillas de maíz la síntesis replicativa de DNA inicia alrededor de las 15 horas de germinación, y precede a la protrusión de la radícula, sin embargo la germinación no es producto de la división celular, sino de la elongación celular de la radícula, la cual causa la ruptura de la testa. Finalmente la división celular es el evento más tardío de la germinación. El reinicio de la proliferación celular se presenta únicamente en las zonas meristemáticas del embrión, y constituye un evento tardío (8) que ocurre normalmente en maíz alrededor de 24 – 36 horas de germinación.

### **Regulación de la traducción a nivel de iniciación durante la germinación**

Los ribosomas de las plantas tienen una arquitectura similar a la de los mamíferos (9), así como las proteínas ribosomales mantienen un alto grado de identidad con las de otros organismos eucariotes (10). Sin embargo, la regulación de la traducción a través de los factores de iniciación en eucariotes puede presentar diferentes estrategias en los distintos organismos. En nuestro laboratorio la investigación sobre el control traduccional durante la etapa de iniciación se ha enfocado en dos grandes aspectos:

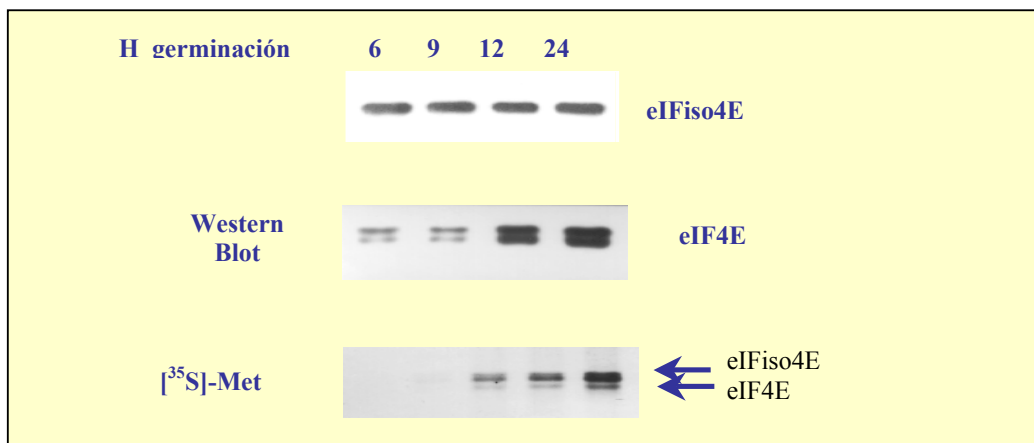
*a) Dependencia de la traducción de mRNAs de ejes de maíz de los factores de iniciación.* Una de las características más distintivas en plantas, con respecto al complejo eIF4F (eIF4E + eIF4G) de mamíferos, es el descubrimiento de dos isoformas antigénicamente distintas, pero funcionalmente similares, denominadas eIFiso4F y eIF4F (11). Cada uno de estos complejos tiene componentes eIF4E y eIF4G diferentes, por lo cual en plantas hay dos isoformas eIF4E/eIFiso4E y dos isoformas eIF4G/eIFiso4G. Por otro lado, en plantas no se han encontrado

homólogos funcionales de las proteínas de unión al factor eIF4E de animales, denominadas 4EBP, aunque aparentemente existen algunas proteínas capaces de unirse a las isoformas de este factor.



**Figura 3.** Semilla de maíz (*Zea mays* L.) mostrando la sección que constituye el eje embrionario. Estos tejidos son los que durante la germinación se desarrollan para dar lugar a la nueva planta.

Reportes recientes sugieren que la regulación de la actividad de los factores eIF4E y eIFiso4E de plantas podría presentar diferencias importantes con respecto a la que se describe para mamíferos (12), en base a su distribución y a los niveles de cada isoforma presentes en diferentes tejidos. En nuestro laboratorio se ha encontrado que las isoformas eIF4E y eIFiso4E se expresan diferencialmente durante la germinación (13). En los ejes de semillas quiescentes la isoforma eIFiso4E es mucho más abundante que la eIF4E y mantiene así sus niveles durante toda la germinación. En cambio la isoforma eIF4E incrementa su concentración (tanto de la proteína, como del mensaje) hacia el final de la germinación (Figura 4).



**Figura 4.** Expresión de los factores de iniciación 4E durante la germinación. eIFiso4E mantiene niveles altos y constantes durante la germinación mediante síntesis de novo activa de su proteína. eIF4E incrementa sus niveles hacia el final de la germinación y el recambio de su proteína es más lento, aumentando su síntesis de novo sólo a 24 h de germinación.

Mediante ensayos de traducción *in vitro* de los mensajes almacenados de maíz se demostró que este grupo de mensajes sintetiza diferentes patrones de proteínas dependiendo de la presencia de uno u otro de los factores eIF4E o eIFiso4E en el sistema. Tomando en cuenta los datos sobre la proporción relativa de eIF4E/eIFiso4E durante la germinación y los resultados de traducción diferencial se concluyó que estos factores juegan un papel fundamental para definir el patrón de proteínas sintetizadas durante la germinación de maíz (12). Así mismo, en estas investigaciones se encontró que existen algunos mRNAs en los ejes de maíz que se traducen aún en ausencia de ambos factores de iniciación, 4E o iso4E, es decir que su traducción es Cap-independiente, sugiriendo que las plantas también utilizan el mecanismo IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) para traducir específicamente algunos de sus mRNAs.

*b) Dependencia de la traducción de la función IRES en mRNAs de ejes de maíz* En los virus de la poliomielitis y de la encéfalo-miocarditis fueron descritos por primera vez elementos que permitían una traducción cap-independiente mediada por IRES (14). En su mecanismo de iniciación de la traducción no se requiere la participación del factor eIF4E. Muchos de estos virus utilizan la digestión proteolítica del factor de anclaje eIF4G para separar la porción que interacciona con eIF4E de la que recluta a eIF3, eIF4A y a la subunidad ribosomal 40S para inhibir la traducción cap-dependiente de mRNAs celulares y traducir preferentemente la IRES-dependiente de los virales. La subunidad ribosomal 40S es reclutada al mRNA directamente o por medio de otros factores de iniciación como eIF4G, eIF4A, eIF3 y/o proteínas celulares específicas que interaccionan con los elementos IRES (15). Los estudios con picornavirus han sido esenciales para caracterizar las secuencias dentro de los IRES y los factores de traducción que los unen.

Actualmente se conoce que muchos mRNAs celulares de animales también contienen IRES y pueden iniciar su traducción de manera cap-independiente (revisado en 16). Estos mRNAs inician su traducción mediada por IRES en condiciones específicas de la célula donde la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida (una fase determinada del ciclo celular, infección viral, estrés por calor, muerte celular programada y otros). Los estudios sobre la estructura y función de los IRES han determinado que mas que la secuencia, es una estructura secundaria compleja la que es vital para la función del IRES. Hasta el momento no existe una conservación universal de los motivos estructurales en los elementos IRES. En cambio, se ha determinado la existencia de varias familias de IRES, cada una de las cuales utiliza una estrategia diferente para reclutar la maquinaria de traducción (16).

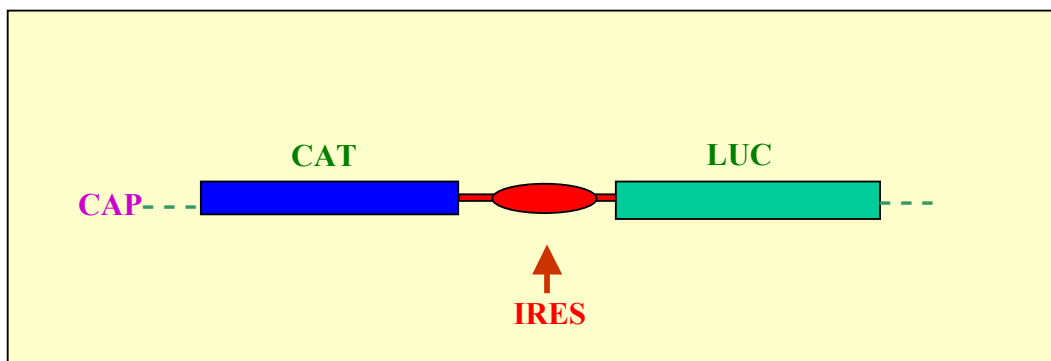


Figura 5. Construcción Bicistónica de pBIC.



Además de algunas secuencias involucradas en las interacciones RNA-proteína, los “pseudoknots”, motivos GNRA, estructuras tipo tRNA, elementos de cuartetos G y dominios ricos en purinas son algunos de los elementos estructurales relevantes para la función de los IRES (17). Sin embargo, existen IRES, tanto virales, como celulares que no presentan ninguno de estos elementos. Por ello, hasta este momento para definir un IRES se utiliza el ensayo de promover la traducción de un gen reportero colocado como segundo cistrón en una construcción bi-cistrónica (Figura 5), en condiciones donde la traducción cap-dependiente está completamente inhibida.

En plantas, se ha demostrado que puede darse la traducción cap-independiente o mediada por IRES, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han encontrado IRES en algunos virus de plantas y se han propuesto elementos de mRNAs celulares que pueden funcionar como IRES (17). Recientemente, en nuestro laboratorio se describió la traducción cap-independiente mediada por IRES para el mRNA correspondiente a la proteína de choque térmico HSP101 de maíz (18). Esta proteína es relevante para la termotolerancia en las plantas (19) y su mRNA se encuentra entre los mRNAs almacenados en semillas de maíz. Durante el estrés por calor se activa tanto la transcripción, como la traducción del mRNA *Hsp101*. Sin embargo, durante las horas tempranas de germinación (hasta 24 horas después de la imbibición) existe un estímulo de la traducción independientemente de la transcripción. Durante el estrés por calor, la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida, por lo que las proteínas HSP que se traducen preferencialmente bajo estas condiciones presentan traducción cap-independiente ó IRES-dependiente en muchos organismos (18). El IRES de *Hsp101* de maíz presenta una estructura secundaria estable y funciona eficientemente en una traducción *in vitro* cap-independiente del segundo cistrón (Luc) de una construcción bi-cistrónica (Figura 6). La caracterización de este IRES celular propio de plantas permitirá conocer el mecanismo de iniciación cap-independiente en estos organismos y los factores que participan en el mismo.

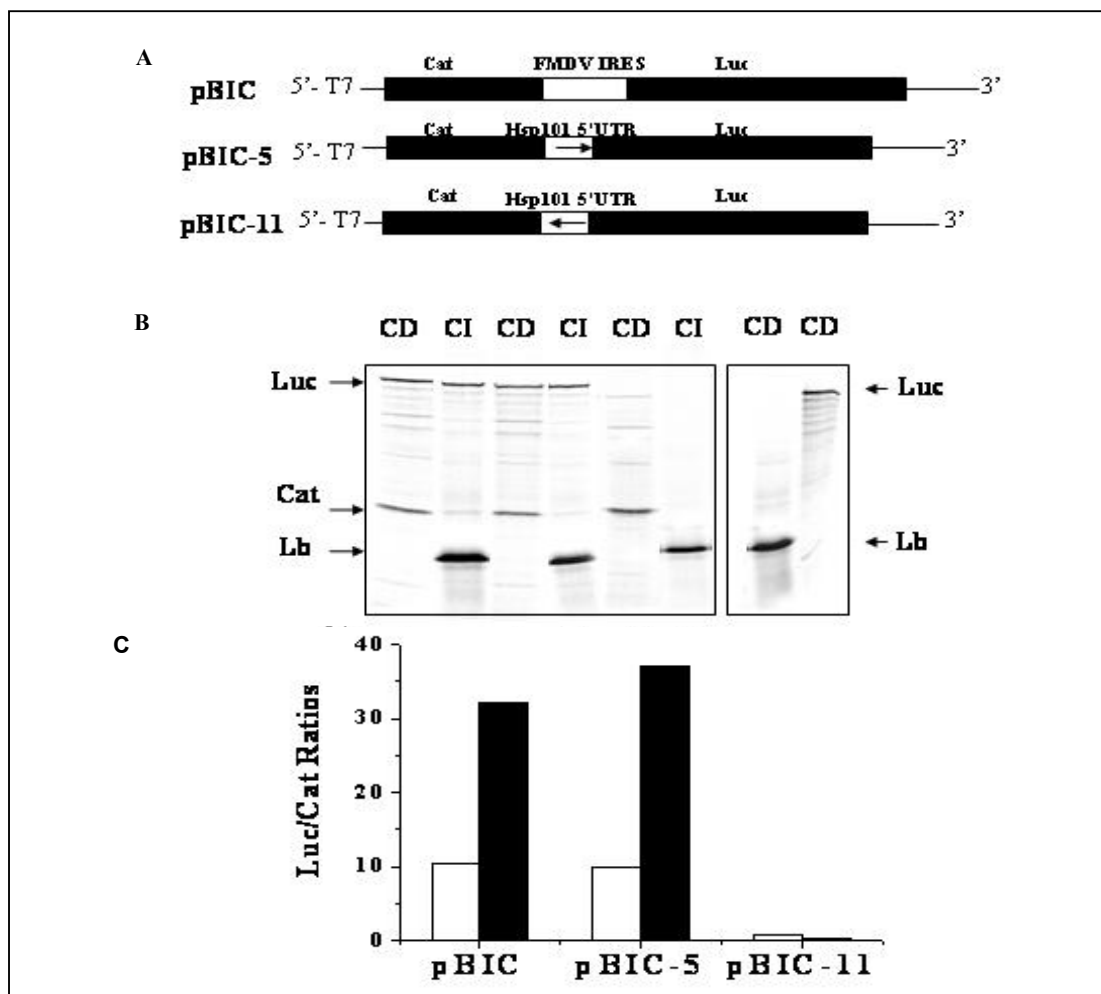
### **Rutas de señalización que regulan el crecimiento y la proliferación celular**

Existen sistemas de señalización tanto en animales como en plantas, que permiten a las células percibir cambios hormonales o de condiciones ambientales, e interiorizar la señal a través de reacciones en cadena para responder bioquímicamente a dicho estímulo.

La insulina y los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) en mamíferos, son hasta ahora los sistemas mejor caracterizados como efectores de la regulación de la síntesis de proteínas a través de mecanismos de transducción de señales. Estudios extensos en este campo han mostrado que el sistema insulina/IGF está compuesto de dos subsistemas complementarios e interactuantes que gobiernan el metabolismo y el crecimiento celular, por una parte, y la división celular y la longevidad por la otra (20) (Figura 7).

Los receptores para la insulina y los IGFs se encuentran en las membranas de las células blanco, y al ser activados inducen al interior la actividad intrínseca de tirosina cinasa que inicia una cascada de reacciones en varias rutas de señalización, tales como las rutas de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) y las MAPK, responsables de los diversos efectos de estos factores de crecimiento. Estas rutas de señalización se han estudiado a gran detalle en los últimos años y se han elucidado gran parte de sus componentes en el sistema de mamíferos. Entre las proteínas activadas de la ruta se encuentra la cinasa TOR (*target of rapamycin*), la cual

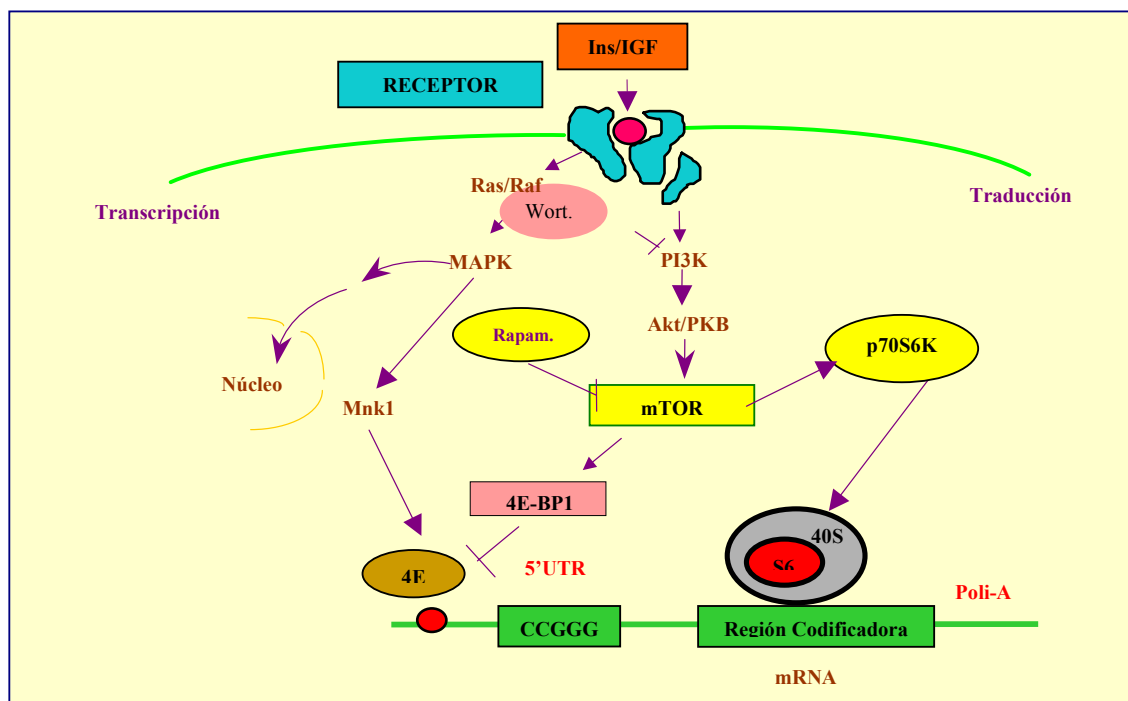
a su vez induce por una parte la fosforilación de las proteínas de unión al factor de iniciación 4E (4EBP) liberándolo de éstas, y por otra, activa por fosforilación a la cinasa S6K que fosforila a la proteína ribosomal S6. Ambos eventos resultan en una regulación selectiva de la traducción, produciendo proteínas específicas requeridas por la célula para crecer y/o iniciar la división celular (21). Entre los mensajes cuya traducción es selectivamente regulada por esta vía de señalización se encuentran los que codifican para las proteínas ribosomales y algunos factores de traducción. Estos mensajes tienen una característica estructural común que consiste en una secuencia rica en pirimidinas en su región 5'UTR. Esta firma de nucleótidos, designada TOP, (del inglés, *tract of oligopyrimidine*), confiere selectividad traduccional a los mensajes, en células inducidas por estímulos mitogénicos y/o nutricionales (22) (Figura 7).



**Figura 6.** Actividad IRES de la región 5'UTR de Hsp101 de maíz. La secuencia 5'UTR de Hsp101 colocada en una construcción bi-cistrónica (pBIC-5) es capaz de estimular la traducción cap-independiente (CI) del segundo cistrón (luc) en un sistema de traducción in vitro de manera similar a el IRES viral (pBIC) control. La inversión de la secuencia 5'UTR en el pBIC elimina por completo la actividad IRES (pBIC-11) CD Cap-dependiente.

### Regulación de la traducción en maíz vía señalizaciones externas

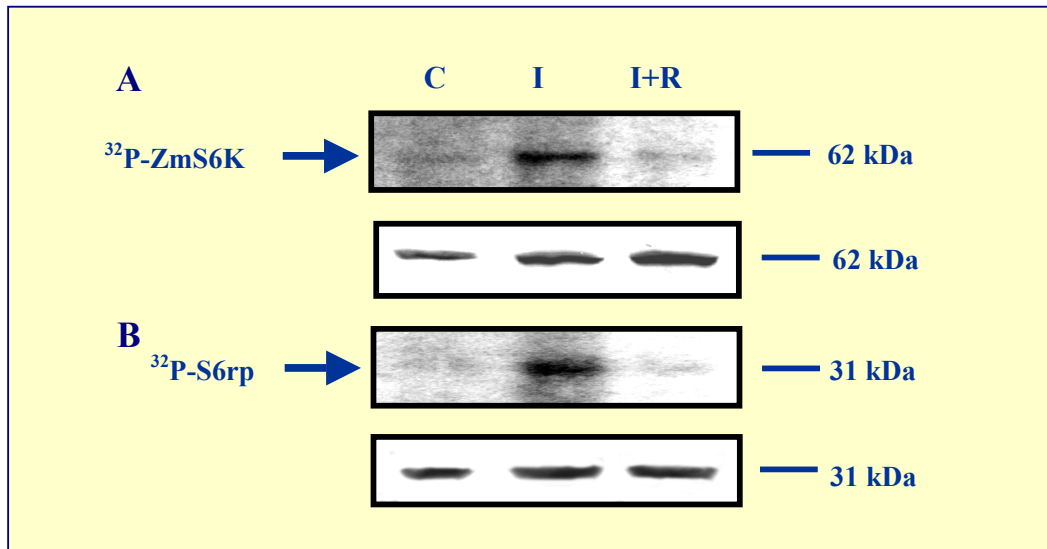
Desde hace más de 30 años se encuentran en la literatura reportes acerca de péptidos semejantes a insulina (llamados "insulina-like" o "leg-insulina") cuya función en las plantas no ha sido determinada, sin embargo, todavía está en investigación. Así mismo, el efecto de insulina como acelerador de la germinación de semillas diversas como calabaza, melón, girasol (23) y en maíz (24) ha sido reconocido. Siguiendo esta línea de pensamiento, hemos purificado un péptido de ejes embrionarios de maíz, reconocido por anticuerpos contra insulina (ZmIGF) (24). Así mismo se había encontrado que insulina, regula el crecimiento de la plántula al término de la germinación e induce preferencialmente la fosforilación de la proteína S6 ribosomal y la síntesis de proteínas ribosomales (25).



**Figura 7.** Representación simplificada de la vía de transducción de señales inducida por insulina/IGF en mamíferos.

Con base a estos resultados se procedió a identificar a la proteína cinasa responsable de fosforilar a la proteína ribosomal S6 (S6rp) y verificar si esta cinasa es a su vez activada por insulina y/o el péptido ZmIGF. Con este propósito se purificó de ejes embrionarios de maíz una proteína de 62 kDa (ZmS6K) precipitable con anticuerpos contra la p70<sup>S6K</sup>, la protein cinasa equivalente de humanos (26). El péptido ZmS6K demostró tener actividad de protein cinasa sobre la proteína ribosomal S6 tanto *in vitro* como *in vivo* y sobre un péptido sintético que contiene los sitios fosforilables de la S6rp, con parámetros cinéticos similares a los de la p70<sup>S6K</sup> (Figura 8).

Esta actividad se incrementa por la fosforilación de la ZmS6K inducida por insulina o ZmIGF. El tratamiento de los ejes embrionarios con rapamicina, un inhibidor de la ruta de señalización que conduce a la fosforilación de la S6rp en mamíferos a nivel de la cinasa mTOR, inhibe también la fosforilación y la actividad de la ZmS6K en maíz (Figura 8).



**Figura 8.** Activación in vivo de ZmS6K por Insulina. **A)** Autoradiografía de la ZmS6K de extractos de ejes embrionarios estimulados con agua (C), Insulina 200  $\mu$ U/mL en ausencia (I) y en presencia de rapamicina 100 nM (I+R). La ZmS6K fue inmunoprecipitada y separada por SDS-PAGE (Panel superior). Western blot de los extractos crudos utilizando el anticuerpo anti-p70S6K (panel inferior). **B)** Autoradiografía de las proteínas ribosomales extraídas de un "set" de ejes embrionarios tratados como en A) analizadas por SDS-PAGE (panel superior). Western blot de las proteínas ribosomales utilizando el anticuerpo anti-rpS6 (panel inferior).

Con el estímulo de insulina/ZmIGF se encontró además expresión diferencial de los mRNAs que codifican para los factores de iniciación 4E, puesto que estimula la traducción del mensaje de la isoforma eIFiso4E (12) y no así la de eIF4E. El mecanismo involucrado en la estimulación de esta síntesis correlaciona con la fosforilación de S6rp así como con la movilización selectiva a polisomas, tanto del mensaje para proteínas ribosomales, en este caso la S6rp, como para el factor iso4E que se comportan como mRNAs 5'TOP (Figura 9).

Todos estos resultados son consistentes con la hipótesis planteada en relación con la presencia de una vía de transducción de señales en plantas, semejante a la vía de insulina/IGF en animales (Figura 7), y nos lleva a concluir que la regulación del crecimiento y probablemente también de la proliferación celular en plantas sigue patrones similares a los de animales. Estos hallazgos sugirieron así mismo, que el desarrollo por evolución de estas vías de transducción de señales tienen un origen muy antiguo, antes de la bifurcación de los reinos animal y vegetal.





8. Cruz-García F, Zúñiga-Aguilar JJ and Vázquez Ramos J (1998). Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 102: 573-581.
9. Montesano L and Glitz DG (1988). Wheat germ cytoplasmic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 263: 4932-4938.
10. Sánchez de Jiménez E (2003). El Ribosoma. Estructura y Función. En: *Biología Celular y Molecular.* (Jiménez, L.F., y Merchant Larios, H. Eds.) Pearson Educación, México pp 395-409.
11. Gallie DR, Browning KS (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276: 36951-26960.
12. Dinkova TD, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E (2000). Expression of maize initiation factor eIFiso4E is regulated at translational level. *Biochem. J.* 351: 825-883.
13. Dinkova TD, Sánchez de Jiménez E (1999). Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol. Plant.* 107: 419-4425.
14. Pelletier J, Sonenberg N (1998). Internal initiation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.
15. Jan E, Sarnow P (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J. Mol. Biol.* 324: 889-902.
16. Stoneley M, Willis AE (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, transacting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23: 3200-3207.
17. Dorokhov YL, Skulachev MV, Ivanov PA, Zvereva SD, Tjulkina LG, Meriths A, Gleba YY, Hohn T, Atabekov JG (2002). Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5301-5306.
18. Dinkova TD, Zepeda H, Martínez-Salas E, Martínez LM, Sotelo-Nieto J, Sánchez de Jiménez E (2005). Cap-independent Translation of Maize *Hsp101*. *Plant J.* 41: 722-731.
19. Nieto-Sotelo J, Martínez LM, Ponce G, Cassab GI, Alagón A, Meeley RB, Ribaut JM, Yang R (2002). Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *The Plant Cell* 14: 1621-1633.
20. Oldham S and Hafen E (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling a TOR force in growth control. *Trends in Cell Biol.* 13: 79-85
21. Fumagalli S, Thomas G (2000) S6 rp phosphorylation and signal transduction. En: *Translational control of gene expression.* Hershey JWB, Mathews, M.B., Sonenberg, N. (eds) CSHL Press N.Y. pp 695-717.
22. Proud CG (2002). Regulation of mammalian translation factors by nutrients, *Eur. J. Biochem.* 269: 5338-5349.
23. Goodman DB and Davis WL (1993). Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 440-446.
24. García-Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M, Sánchez de Jiménez E (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* 358: 95-100.
25. Sánchez de Jiménez E, Beltrán-Peña E, Ortiz-López A (1999). Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 105: 148-155.
26. Reyes de la Cruz H, Aguilar R and Sánchez de Jiménez E (2004). Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70<sup>S6K</sup>. *Biochemistry* 43: 533-539.

## MECANISMOS DE CONTROL TRADUCCIONAL EN LA GERMINACIÓN DE MAÍZ

### Resúmen.

La expresión de genes en eucariontes se encuentra regulada tanto a nivel de transcripción como de traducción. La división temporal-espacial de los procesos de transcripción y traducción en estos organismos ha permitido desarrollar múltiples mecanismos de control traduccional para regular la eficiencia de traducción de los mRNAs en ausencia de cambios en los niveles celulares de transcrito. Este tipo de regulación proporciona una vía precisa, inmediata y energéticamente eficiente para inducir cambios en el patrón de síntesis de proteínas celulares en respuesta a condiciones específicas del desarrollo, estrés, cambios hormonales, nutricionales y otros. La mayoría de los procesos de regulación se dan a nivel de la etapa de iniciación de la traducción. Durante esta etapa el mRNA debe ser reconocido por la maquinaria de traducción para formar un complejo de iniciación activo que consiste del mRNA, tRNA iniciador y la subunidad pequeña 40S del ribosoma. En este proceso de reconocimiento participan múltiples factores proteicos y secuencias específicas de las regiones 5' y 3' no traducibles (UTRs) del mRNA. Nuestra investigación se ha enfocado al estudio de diferentes mecanismos que regulan la traducción de mRNAs a nivel de iniciación, durante el proceso de germinación de maíz. Entre estos mecanismos se ha abordado la actividad del factor de inicio de la traducción que reconoce la estructura 5' cap ( $^7\text{mGpppN}$ ) en los mRNAs, la influencia de secuencias específicas en la región 5'UTR denominadas sitio de entrada interna del ribosoma (IRES), y la relevancia de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S del ribosoma. Por otro lado también se estudia la ruta de transducción de señales que conduce a una modulación de estos mecanismos en respuesta estímulos hormonales durante la germinación de maíz.

### Semblanza de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

La doctora Estela Sánchez de Jiménez es QFB por la Facultad de Química, UNAM, obtuvo su Doctorado en Bioquímica, (Ph.D.) en la University of Wisconsin, Madison, Wis. USA. y realizó una estancia Posdoctoral en el Molecular Biology Laboratory, University of Wisconsin, Madison, Wis., USA. Ha sido profesor visitante en: Centro de Genética, Colegio de Posgraduados de Chapingo; Protein Chemistry and Enzymology Department, University of California, Davies, USA., Molecular Biology Laboratory, University of Wisconsin, Madison, Wis. USA., Laboratorio de Biología Molecular "Dr. Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, España. Actualmente es Profesor Emérito de la Facultad de Química, UNAM e Investigador Nacional Nivel 3. La Dra. Sánchez de Jiménez Es miembro de Asociaciones Científicas como la Academia Mexicana de Ciencias, la Sociedad Mexicana de Bioquímica, American Society for Plant Physiologist; Scandinavia Society of Plant Physiologists, RNA Society, International Society for Seed Science, entre otras, y ha recibido premios como el Premio Nacional de Química "Andrés del Río" y el Corresponding Member de la American Society for Plant Physiologists, USA. Su área de investigación actual es sobre los mecanismos de control traduccional y la regulación de la expresión genética en plantas superiores. Ha dirigido 53 tesis de Licenciatura, 26 de Maestría y 16 de Doctorado. Tiene más de 100 artículos científicos publicados, ha participado en múltiples congresos y ofrecido múltiples conferencias en el país y en el extranjero.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN

Juan Carlos Corona y Ricardo Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510-México D.F.

[rtapia@ifc.unam.mx](mailto:rtapia@ifc.unam.mx)

### NEURODEGENERATION MECHANISMS

#### Abstract.

*The mechanisms of the neuronal death characteristic of various types of neurodegenerative diseases of unknown causes are intriguing. One of the proposed mechanisms is an increment in the function of excitatory glutamatergic synaptic neurotransmission, leading to overactivation of ionotropic glutamate receptors which constitute  $Ca^{2+}$ -permeable channels. Here we review the experimental bases of this mechanism, called excitotoxicity, including data from our laboratory in models of epilepsy and neurodegeneration in the rat hippocampus. As a more detailed example, we describe recent experiments in which we tested the possible correlation between the increment in the extracellular concentration of glutamate and the damage of the motor neurons in the spinal cord of rats in vivo, as well as the vulnerability of these neurons to the overactivation of glutamate receptors induced by microdialysis perfusion of different agonists. We found that perfusion of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate (AMPA) by microdialysis in the rat lumbar spinal cord produced intense muscular spasms, followed by ipsilateral permanent paralysis and a remarkable loss of spinal motor neurons, thus generating a model of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. These results suggest that spinal motor neurons are highly vulnerable to the excitotoxicity produced by overactivation of AMPA receptors, which was confirmed by the finding that the antagonist of AMPA receptors 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) prevented the behavioral changes, the paralysis and the neurodegeneration of the motor neurons produced by AMPA*

**Keywords:** neuronal death; neurodegenerative diseases; synaptic transmission; glutamate receptors; spinal cord; amyotrophic lateral sclerosis.

## Introducción

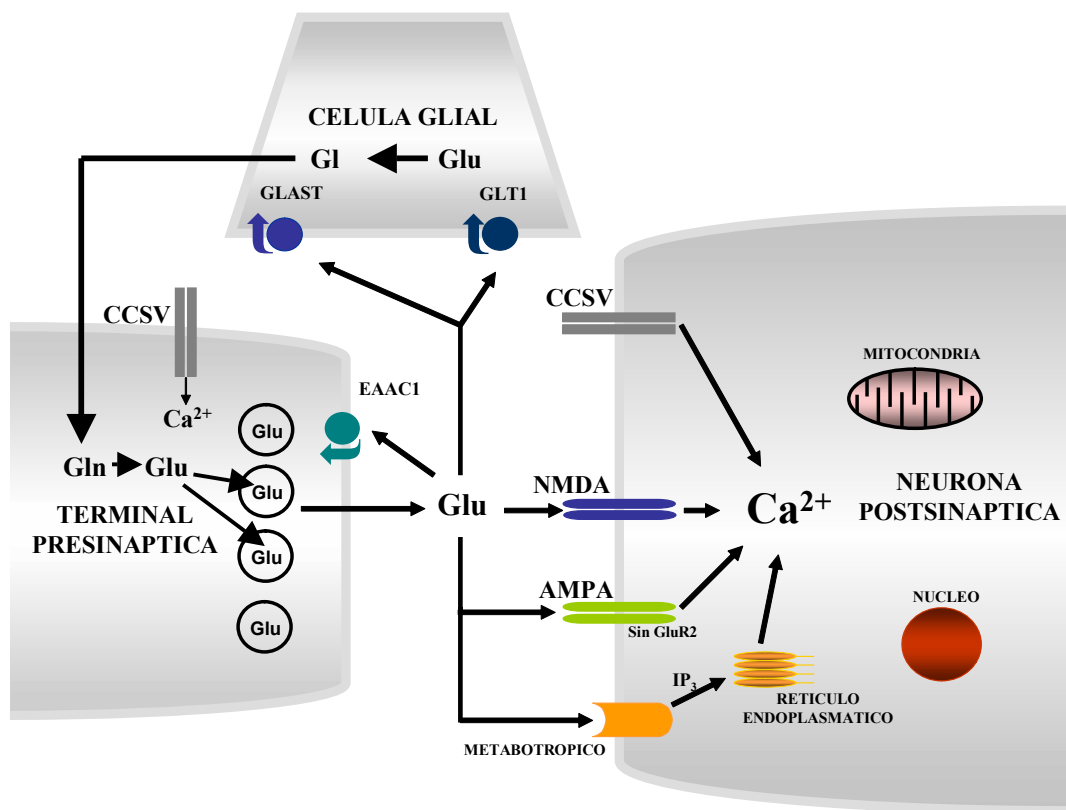
En los últimos años se ha generado un gran interés por conocer los mecanismos de degeneración celular, incluyendo la llamada muerte fisiológica o programada (apoptosis) y la muerte por necrosis. Este tópico de investigación es especialmente importante en el sistema nervioso central (SNC), ya que la muerte o degeneración neuronal es un fenómeno central durante el envejecimiento, y ocurre de manera prematura en el curso de numerosos padecimientos agudos y crónicos que afectan el cerebro y la médula espinal. Entre los más frecuentes y graves de estos padecimientos se encuentran los accidentes vasculares cerebrales (isquemia-anoxia), los traumatismos craneoencefálicos y de la médula espinal, la epilepsia, y las devastadoras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington y la enfermedad de Alzheimer.

Las causas y los mecanismos de la muerte neuronal en estas enfermedades se desconocen. Sin embargo, tres factores relacionados entre sí parecen jugar un papel importante: la generación de especies reactivas de oxígeno, la sobreactivación de receptores a aminoácidos excitadores, y un incremento en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las relaciones entre estos tres factores son múltiples, de modo que una alteración inicial puede generar una cascada de cambios convergentes hacia la muerte neuronal por destrucción de las membranas [1-3].

## Las sinapsis glutamatérgicas

El glutamato es considerado el principal mediador de las señales excitatorias en el SNC de los mamíferos, incluyendo la médula espinal, desde la década de los sesenta [4]. Numerosos trabajos publicados en las tres siguientes décadas sentaron las bases para reconocer que el glutamato juega un papel fisiológico fundamental en muchos aspectos de la función cerebral normal, como la cognición, la memoria, el aprendizaje, el desarrollo del sistema nervioso, la migración celular, la diferenciación y la muerte neuronal. El glutamato es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica por lo que tiene que ser sintetizado en el SNC a partir de la glucosa y de otros precursores. Las enzimas del metabolismo del glutamato se han localizado tanto en las neuronas como en las células gliales. Aunque su interconversión con el ácido  $\alpha$ -cetoglutarico es muy rápida, mediante la acción de las transaminasas glutámico-pirúvica y glutámico-oxaloacética, la poza metabólica de glutamato que funciona como neurotransmisor se sintetiza a partir de la glutamina, en una reacción catalizada por la glutaminasa, enzima presente en las terminales sinápticas. Cuando el glutamato es transportado a las células gliales (astrocitos) por sus acarreadores específicos, como se describe más adelante, es convertido en glutamina por la glutamino sintasa, enzima concentrada en los astrocitos, constituyendo así un interesante ciclo metabólico-funcional que involucra a dos estructuras celulares, las terminales sinápticas glutamatérgicas y las células gliales [5].

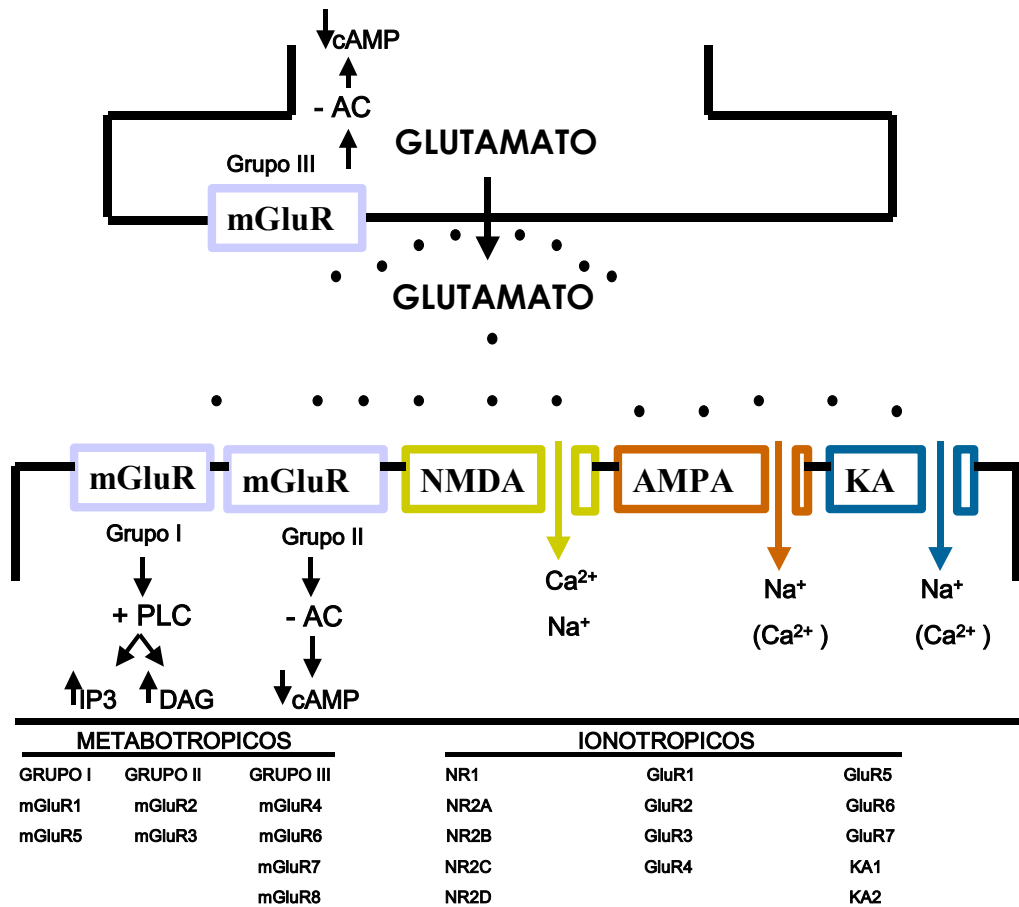
En las sinapsis glutamatérgicas, el glutamato es liberado de las terminales presinápticas cuando, al llegar un potencial de acción, se despolariza la membrana. Esto causa la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, y al aumentar la concentración de este catión se desencadena la fusión de las vesículas sinápticas (que almacenan al glutamato en concentraciones tan altas como 100 mM) con la membrana presináptica, produciéndose la liberación del aminoácido por exocitosis (Figura 1).



**Figura 1.** En las sinapsis glutamatérgicas, el glutamato (Glu) es liberado de las terminales presinápticas por exocitosis, en un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$ , el cual entra a la terminal por canales sensibles a voltaje (CCSV), de un tipo distinto de los CCSV presentes en la membrana somática de la neurona postsináptica. Una vez en el espacio sináptico las moléculas de glutamato difunden hasta unirse a sus distintos receptores específicos, localizados tanto en la membrana postsináptica como la presináptica. El glutamato es después eliminado del espacio extracelular por los transportadores gliales (GLT1 y GLAST), y convertido en glutamina (Gln) por la glutamina sintasa. La glutamina es transportada a la terminal sináptica, y el glutamato es sintetizado a partir de ella por la glutaminasa. Algunas terminales nerviosas glutamatérgicas también poseen transportadores (EAAC1).

Una vez en el espacio sináptico, las moléculas de glutamato difunden a través de los 20-30 nm que separan las membranas pre y postsináptica, hasta unirse a sus receptores específicos localizados en esta última. Una vez que el glutamato activa a sus receptores debe ser eliminado del espacio sináptico. De los tres mecanismos conocidos de eliminación de neurotransmisores, difusión, degradación enzimática y recaptura, esta última es el mecanismo más importante en la remoción del glutamato y cumple una doble función: por un lado termina con la acción sináptica del glutamato y por el otro permite su recuperación para que esta molécula pueda ser eventualmente reutilizada [5]. La recaptura del glutamato al interior de las células se lleva a cabo por proteínas específicas llamadas transportadores, las cuales utilizan los gradientes iónicos de sodio y potasio para transportar al glutamato desde el espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y las células gliales (Figura 1).





**Figura 2.** Familia de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Cada uno de los dos principales tipos de receptores de glutamato comprende tres subtipos de receptores funcionales. Los receptores ionotrópicos forman canales permeables a los iones señalados, mientras que los metabotrópicos están acoplados a la producción (+) o inhibición (-) de las enzimas y segundos mensajeros que se indican, mediante su interacción con proteínas G. Los receptores están formados por varias subunidades proteicas, que se señalan en la parte inferior, cada una codificada por un diferente gene. PLC, fosfolipasa C; AC, adenilato ciclasa; IP3, inositol-(1,4,5)-trifosfato; DAG, diacilglicerol; cAMP, adenosín monofosfato cíclico.

### Receptores al glutamate

Con los avances en técnicas de biología molecular se han clonado y caracterizado varias clases de receptores de glutamato, tres del tipo ionotrópico y tres de tipo metabotrópico [6, 7] (Figura 2). Entre los ionotrópicos se conocen dos subtipos: los que reconocen al N-metil-D-aspartato (receptores tipo NMDA), y aquellos que no responden al NMDA (tipo no-NMDA), a su vez divididos en los que son activados por ácido kaínico o por  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA). Tanto los receptores NMDA como los no-NMDA son receptores ionotrópicos que constituyen canales en el seno de la membrana plasmática. Ambos son permeables al Na<sup>+</sup> pero difieren en que los primeros son permeables también al Ca<sup>2+</sup> mientras que los segundos en general no, aunque esto puede variar según las subunidades que lo componen [8, 9]. Se conocen también varios subtipos de receptores metabotrópicos (mGluR).

Los subtipos I y II son predominantemente postinápticos, mientras que los del subtipo III son autorreceptores presinápticos y parecen jugar un papel importante en la regulación de la liberación de glutamato [6, 10]. Estos receptores no forman canales iónicos sino que están acoplados a proteínas G y al ser activados generan segundos mensajeros intracelulares, como se describe en la Figura 2.

### **El glutamato y las enfermedades neurodegenerativas**

Varias enfermedades neurológicas, colectivamente referidas como enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas, entre las que están los accidentes vasculares cerebrales (isquemia/anoxia), hipoglicemia, epilepsia y las enfermedades de Huntington, de Parkinson, de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), comparten características patológicas de una gradual y selectiva pérdida neuronal. Aunque los grupos neuronales primordialmente afectados varían según la enfermedad, y las causas de la muerte neuronal se desconocen, los tres factores mencionados en la Introducción, la sobreactivación de los receptores al glutamato, un incremento en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  y la generación de especies reactivas de oxígeno, parecen jugar un papel relevante en los mecanismos de la neurodegeneración en estos padecimientos [1-3, 11]. Al mecanismo de la neurodegeneración originada por la sobreactivación de los receptores al glutamato, lo cual ocurre por una excesiva excitación sináptica mediada por este aminoácido, se le llama excitotoxicidad [12]. Como resultado de esta sobreactivación, particularmente de los receptores tipo NMDA y los de tipo AMPA que carecen de la subunidad GluR2, hay una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  que resulta en un incremento en la concentración de este catión en el citoplasma neuronal y esto, probablemente en combinación con una excesiva producción de radicales libres y alteraciones del metabolismo energético mitocondrial, resulta en la activación de enzimas líticas y en la oxidación de fosfolípidos de la membrana plasmática, todo lo cual lleva a la destrucción celular. Este mecanismo se autoalimenta, pues las deficiencias en la función mitocondrial disminuyen la capacidad de producir ATP, por lo que decrece la actividad de la bomba de sodio-potasio. El resultado es que disminuye la extrusión de  $\text{Na}^+$ , alterándose el gradiente de concentración de este catión, despolarizándose la membrana neuronal y facilitándose la respuesta de los receptores tipo NMDA, que además de ser sensibles a su agonista son sensibles al voltaje [6, 7]. Además de los receptores NMDA, muchas regiones del SNC, incluyendo la médula espinal, son ricos en receptores tipo AMPA, los cuales se caracterizan por ser mucho más permeables al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$  que al  $\text{Ca}^{2+}$ , excepto cuando el receptor carece de la subunidad GluR2, ya que esta condición resulta en que el receptor AMPA sí es permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  [8, 9].

La posible participación de los mecanismos excitotóxicos en las enfermedades neurodegenerativas se apoya en numerosos datos *in vitro*, en cultivos neuronales, que demuestran un notable efecto neurotóxico del glutamato y de agonistas del receptor NMDA, que es bloqueado por antagonistas del mismo [3, 12]. Sin embargo, los datos *in vivo* no han demostrado contundentemente que al aumentar la concentración de glutamato extracelular se produzca la excitotoxicidad [12]. Por el contrario, en nuestro laboratorio hemos demostrado, mediante experimentos de microdiálisis *in vivo*, que la administración de inhibidores del transportador de glutamato, fundamentalmente el ácido 2,4-pirrolidindicarboxílico (PDC), tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo, produce un notable incremento en dicha concentración de glutamato pero ninguna lesión, mientras que si se administran agonistas de los receptores al glutamato sí se produce neurodegeneración [13, 14]. Además, tampoco se produce

hiperexcitación neuronal cuando aumenta el glutamato extracelular por inhibición de su transporte con PDC *in vivo* [15; G. Vera y R. Tapia, resultados no publicados]. En contraste, también hemos demostrado que si en el hipocampo se estimula la liberación de glutamato desde terminales sinápticas con el bloqueador de canales de K<sup>+</sup> 4-aminopiridina (4-AP), se producen intensas convulsiones de tipo epiléptico y neurodegeneración, efectos que fueron antagonizados por antagonistas del receptor tipo NMDA [16-18]. Estos resultados nos han permitido concluir que la disminución de la recaptura del glutamato no causa un incremento en su concentración en el espacio sináptico, y por lo tanto no tiene acceso a sus receptores postsinápticos, mientras que cuando se estimula su liberación esto sí ocurre y se sobreactivan dichos receptores. Más recientemente, siguiendo el mismo enfoque experimental, hemos estudiado el posible papel de la excitotoxicidad en la muerte de las motoneuronas que caracteriza a la ALS. En la siguiente sección describiremos estos experimentos.

### **Pérdida de motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica**

La ALS es una enfermedad que se caracteriza por la degeneración selectiva de las motoneuronas, principalmente de las porciones inferiores de la médula espinal y el tallo cerebral. Esta degeneración causa una parálisis progresiva, que comienza en las extremidades inferiores y resulta en una atrofia de los músculos esqueléticos, sin que se produzca disminución en la capacidad mental de los enfermos. La ALS es de relativamente larga duración (aproximadamente 5 años) y la muerte ocurre generalmente por paro respiratorio, al afectarse las neuronas del tallo cerebral y de los músculos respiratorios [19, 20].

Se han descrito dos tipos de ALS, que tienen los mismos síntomas y patología. La primera es la ALS familiar (FALS), que representa un 5-10% de los casos; tiene un patrón de herencia autosómica dominante y aproximadamente el 20% se ha asociado con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) [21, 22]. El segundo tipo es la ALS esporádica (SALS) que tiene una mucho mayor frecuencia (90-95%) y no se ha logrado identificar el factor que la produce.

Se han postulado varias hipótesis sobre la posible generación de esta enfermedad. Las más citadas son: excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA, y toxicidad causada por una ganancia de función de la SOD1 mutada, que la convierte en generadora de especies reactivas de oxígeno [19, 20].

Diversos estudios han postulado la hipótesis excitotóxica de la SALS, según la cual la posible causa de la enfermedad es un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica en la médula espinal, que causaría excitotoxicidad. Esta hipótesis se basa en que los niveles extracelulares de glutamato, tanto en plasma [23] como en líquido cefalorraquídeo [24-26] se encuentran aumentados en los pacientes con SALS, y en el hallazgo de que la actividad del transportador glial de glutamato (llamado EAAT2 o GLT1) tiene una menor actividad en la médula espinal, y en la corteza motora, en los pacientes con SALS [27, 28]. Esta deficiencia provocaría una disminución en la recaptura del glutamato del espacio sináptico, lo cual generaría excitotoxicidad. En apoyo a esta hipótesis, otros estudios demostraron que la inhibición farmacológica del transporte de glutamato en cultivos organotípicos de médula espinal [29], así como el bloqueo de la expresión del transportador GLT1 con oligonucleótidos antisentido *in vivo* [30], causaron muerte selectiva de las motoneuronas.

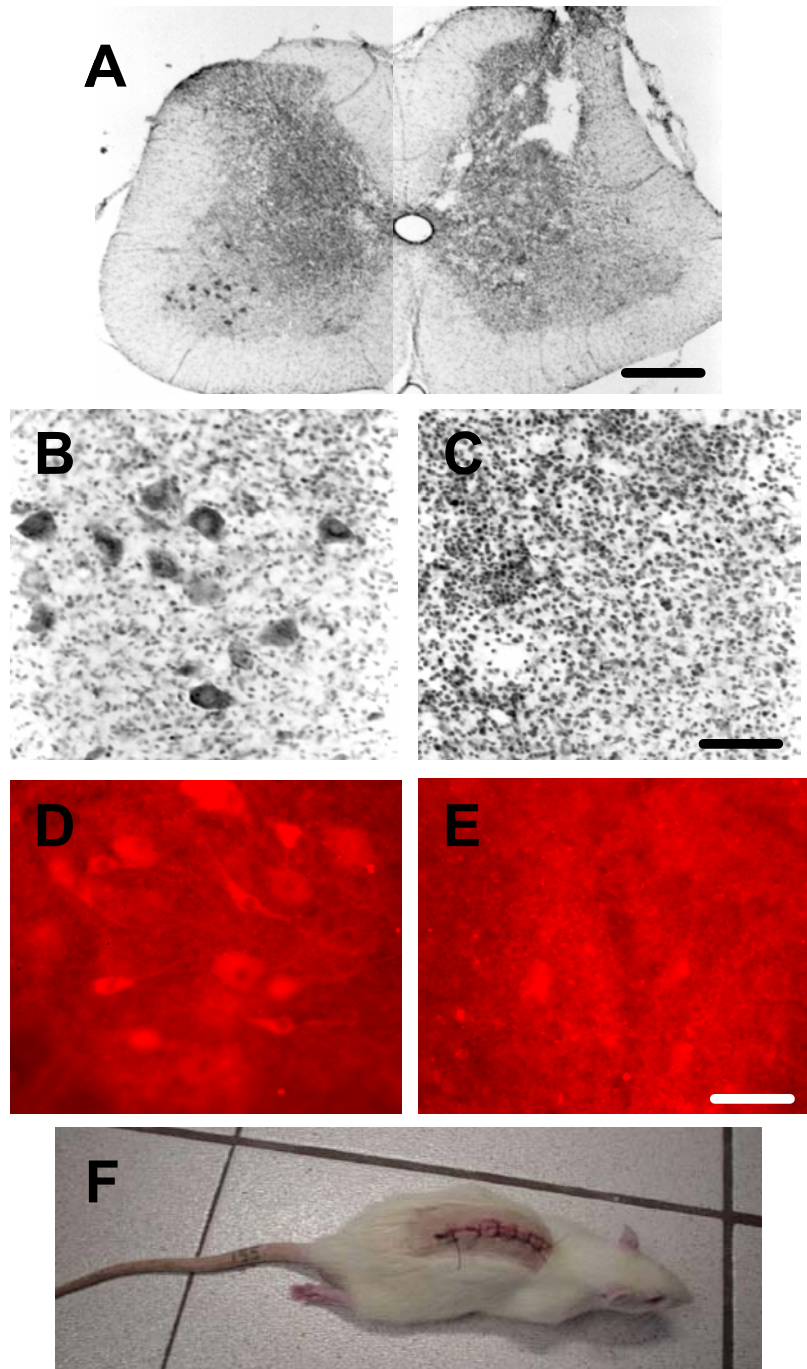
Por otro lado, una creciente evidencia sugiere que los receptores AMPA podrían estar participando en la muerte de las motoneuronas en la SALS. Las motoneuronas son más vulnerables a los agonistas de los receptores AMPA/kainato que otras neuronas espinales, tanto *in vivo* [31], como en cultivos organotípicos y de células disociadas de médula espinal [32-34]. Los mecanismos de la selectiva vulnerabilidad de las motoneuronas a la sobreactivación de los receptores AMPA no se conocen con exactitud, pero hay datos que sugieren fuertemente que las diferencias en la vulnerabilidad a agonistas de los receptores AMPA entre las motoneuronas y otras neuronas espinales podrían resultar de diferencias en la expresión del receptor AMPA y/o en fenómenos que estarían modulando la entrada de  $Ca^{2+}$ . En este sentido, ha generado gran interés la posibilidad de que la selectiva vulnerabilidad de las motoneuronas resulte de la predominante expresión de receptores AMPA que son permeables al  $Ca^{2+}$  debido a que carecen de la subunidad GluR2 [35-37].

Como ya se mencionó, en nuestro laboratorio hemos estudiado durante varios años los mecanismos de muerte neuronal en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas que se relacionan con la sobreactivación de los receptores del glutamato. Se han utilizado drogas que inhiben el transporte de glutamato, como el ya mencionado PDC. Recientemente nosotros realizamos experimentos en los cuales perfundimos por microdiálisis el PDC en la médula espinal de la rata, con el objetivo de estudiar la hipótesis descrita arriba de que deficiencias en el transportador de glutamato podrían producir daño en las motoneuronas. Encontramos que el PDC produjo un considerable y duradero (por más de dos horas) aumento en la concentración extracelular de glutamato pero este aumento no resultó en alteraciones motoras ni en daño a las motoneuronas, por lo que estos resultados no apoyan la hipótesis de deficiencias en el transportador de glutamato como causa de la neurodegeneración en la ALS [38]. Cuando administramos, también por microdiálisis en la médula espinal, la 4-AP, droga que estimula la liberación de glutamato desde las terminales sinápticas y produce intensas convulsiones y neurodegeneración en el hipocampo [16-18], observamos un aumento transitorio en la concentración extracelular de glutamato; aunque este incremento se acompañó de alteraciones motoras manifestadas por contracciones de la pata ipsilateral durante algunos minutos, no observamos parálisis ni neurodegeneración de las motoneuronas espinales. Estos resultados sugieren que el glutamato liberado por la acción de la 4-AP aumenta la excitabilidad de las motoneuronas en la médula espinal, pero no lo suficiente para producir excitotoxicidad, al menos en las condiciones experimentales exploradas [38].

En otros experimentos, demostramos que la administración por microdiálisis de NMDA y de kainato no produjo alteraciones motoras ni daño a las motoneuronas en la médula espinal. Esto indica que los receptores tipo NMDA y tipo kainato no generan excitotoxicidad en las motoneuronas espinales, debido probablemente a que no son muy abundantes en las astas ventrales [39, 40]. En contraste, cuando administramos AMPA sí observamos alteraciones motoras, manifestadas por fuertes contracciones de la pata ipsilateral durante 1-2 horas después de administrado el AMPA y por parálisis ipsilateral, que se inició unas horas después y que fue permanente hasta el momento del sacrificio de los animales, a los 5 días. Además, al realizar el análisis histológico a este tiempo se observó una severa pérdida de las motoneuronas en la médula espinal lumbar del lado tratado (Figura 3). Estos resultados sugieren que las motoneuronas espinales son altamente vulnerables a la excitotoxicidad por la sobreactivación de los receptores AMPA. Para confirmar esta conclusión, administramos AMPA conjuntamente con un antagonista de este tipo de receptores, el 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]-quinoxalina-7-sulfonamida (NBQX), y observamos que este tratamiento evitó totalmente los

cambios conductuales, la parálisis y la neurodegeneración de las motoneuronas que produce el AMPA [38].

**Figura 3.** Micrografías representativas del efecto de la perfusión por microdiálisis de AMPA (6 mM) en la médula espinal lumbar de la rata, 5 días después del experimento. En **A** se observa el tracto de la cánula de microdiálisis, que no llega a las astas ventrales de la médula espinal. **B-E**, amplificación de las astas ventrales, en la zona rica en motoneuronas. Nótese la pérdida de motoneuronas en el lado ipsilateral, tanto cuando se visualizan después del tñido con violeta de cresilo (**A-C**), como con la inmunocitoquímica para la colinacetyltransferasa, enzima que sintetiza la acetilcolina en las motoneuronas (**D-E**); las motoneuronas del lado contralateral muestran una morfología y una inmunocitoquímica normales. **F**, rata tratada con AMPA 6 mM, 24 h después del experimento, mostrando la completa parálisis de la pata ipsilateral al sitio de la microdiálisis. Barra = 400  $\mu\text{m}$  en **A**, 150  $\mu\text{m}$  en **B** y **C**, y 75  $\mu\text{m}$  en **D** y **E**. Véase la Ref. 38 para los datos completos de estos experimentos.



## Conclusiones

Dada la gravedad y las devastadoras consecuencias de las enfermedades neurodegenerativas, para las que no hay tratamientos eficientes, el conocimiento de los mecanismos de la muerte neuronal es sin duda indispensable para desarrollar estrategias y medidas terapéuticas realmente útiles. Aunque en general estos posibles mecanismos parecen ser comunes en los diferentes padecimientos, uno de los mayores problemas por resolver es la selectiva vulnerabilidad de las neuronas en las distintas regiones del SNC en las diferentes enfermedades. Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson degeneran principalmente las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta del mesencéfalo, mientras que en el Alzheimer se mueren primordialmente las neuronas colinérgicas de una zona de la corteza cerebral, y en la ALS las neuronas motoras de la médula espinal y del tallo cerebral. Si bien se han identificado factores genéticos, como las mutaciones de la superóxido dismutasa 1 en la ALS, de la presenilina en el Alzheimer o de la  $\alpha$ -sinucleína en el Parkinson, éstos no pueden explicar más del 5% o 10% de los casos, y en ellos no entendemos por qué, si las alteraciones genéticas afectan a todas las neuronas, no todas degeneran por igual.

La hipótesis de la excitotoxicidad por excesiva neurotransmisión sináptica glutamatérgica ha sido sin duda generadora de hallazgos relevantes para entender los mecanismos de la muerte neuronal. Sin embargo, es claro que esta hipótesis no ha sido suficiente para explicar la totalidad del fenómeno de neurodegeneración, ya que la sobreactivación de los receptores de glutamato puede ocurrir solamente cuando el aumento en la concentración extracelular del aminoácido es precisamente en el espacio sináptico, y esto no necesariamente sucede cuando disminuye su recaptura o por difusión desde neuronas lisadas. No hay duda, sin embargo, que un aumento en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$ , como consecuencia de su entrada masiva a través de los receptores tipo NMDA y AMPA, cuando éstos se sobreactivan, es un factor determinante de la muerte neuronal. En esta línea de investigación, creemos que los enfoques experimentales *in vivo* generarán modelos experimentales más cercanos a la realidad y por consiguiente un mejor conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración.

## Agradecimientos

Las investigaciones originales aquí descritas fueron financiadas en parte por DGAPA, UNAM (proyecto IN213703), y por el CONACYT (proyecto SEP42668).

## Referencias

1. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
2. Tapia, R. (1998) Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración. *Gac. Méd. Méx.* **134**, 695-703.
3. Tapia, R., Medina-Ceja, L., Peña, F. (1999) On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, *in vivo*. *Neurochem. Int.* **34**, 23-31.
4. Curtis, D.R., Watkins, J.C. (1960) The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* **6**, 117-141.

5. Dingledine, R., MacBain, C.R. (1999) Glutamate and aspartate. En Siegel, G.J. et al. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6<sup>th</sup> Ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 315-333.
6. Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci. **17**, 31-108.
7. Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science **258**, 597-603.
8. Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991) Ca<sup>2+</sup> Permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. Science **252**, 851-853.
9. Bettler, B., Mulle, C. (1995) Review: Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. Neuropharmacology **34**, 123-139.
10. Cartmell, J., Schoepp, D.D. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. J. Neurochem. **75**, 889-907.
11. Olanow, C.W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. Trends Neurosci. **16**, 439-444.
12. Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron **1**, 623-634.
13. Massieu, L., Morales-Villagrán, A., Tapia, R. (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. J. Neurochem. **64**, 2262-2272.
14. Massieu, L., Tapia, R. (1997) Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats *in vivo*. J. Neurochem. **69**, 1151-1160.
15. Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., Zilkha, E. (1996) Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. J. Neurochem. **66**, 2446-2454.
16. Peña, F., Tapia, R. (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. J. Neurochem. **72**, 2006-2014.
17. Peña, F., Tapia, R. (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. Neuroscience **101**, 547-561.
18. Ayala, G.X., Tapia, R. (2003) Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus *in vivo*. Neuropharmacology **45**, 649-660.
19. Julien, J.P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. Cell **104**, 581-591.
20. Cleveland, D.W., Rothstein, J.D. (2002) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. Nat. Rev. Neurosci. **2**, 806-819.
21. Rosen, D.R., et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature **362**, 59-62.
22. Gurney, M.E., Liu, R., Althaus, J.S., Hall, E.D., Becker, D.A. (1998) Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease. J. Inher. Metab. Dis. **21**, 587-597.
23. Plaitakis, A. (1990) Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: a hypothesis. Ann. Neurol. **28**, 3-8.
24. Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T. (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. **28**, 18-25.
25. Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P., Wastell, H. J. (1995) CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. Neurodegeneration **4**, 209-216.
26. Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.F., Le Forestier, N., Marouan A., Dib, M., Meininger, V. (2002) Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. J. Neurol. Sci. **193**, 73-78.
27. Rothstein, J.D., Martin, L.J., Kuncl, R.W. (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. New Engl. J. Med. **326**, 1464-1468.
28. Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. **38**, 73-84.
29. Rothstein J.D., Jin L., Dykes-Hoberg M., Kuncl R.W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 6591-6595.
30. Rothstein, J.D. Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, I.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Heideger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron **16**, 675-686.
31. Hugon, J., Vallat, J.M., Spencer, P.S., Leboutet, M.J., Barthe, D. (1989) Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. Neurosci. Lett. **104**, 258-262.

32. Rothstein J.D., Kuncl R.W. (1995) Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neurons toxicity. *J. Neurochem.* **65**, 643-651.
33. Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Weiss, J.H. (1996) Motor neurones are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury *in vitro*. *J. Neurosci.* **16**, 4069-4079.
34. Van Den Bosch, L., Robberech, W. (2000) Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain Res. Bull.* **53**, 383-388.
35. Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Lamberta, R., Weiss, J.H. (1995) *In vitro* kainate injury to large, SMI-32(+) spinal neurons is  $Ca^{2+}$  dependent. *Neuroreport.* **6**, 945-948.
36. Williams, T.L., Day, N.C., Ince, P.G., Kamboj, R.K., Shaw, P.J. (1997) Calcium-permeable  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **42**, 200-207.
37. Shaw, P.J. (1999) Calcium, glutamate, and amyotrophic lateral sclerosis: more evidence but no certainties. *Ann. Neurol.* **46**, 803-805.
38. Corona, J.C., Tapia, R. (2004) AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord *in vivo*. *J. Neurochem.* **89**, 988-997.
39. Petralia, R.S., Rubio, M.E., Wang, Y.X., Wenthold, R.J. (2000) Regional and synaptic expression of ionotropic glutamate receptors. En *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 18. Glutamate (Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., eds), pp. 145-182. Elsevier Science, Amsterdam.
40. Wisden, W., Seeburg, P.H., Monyer, H. (2000) AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression –an *in situ* hybridization atlas. En *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 18. Glutamate (Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., eds), pp. 99-143. Elsevier Science, Amsterdam.

## Resumen

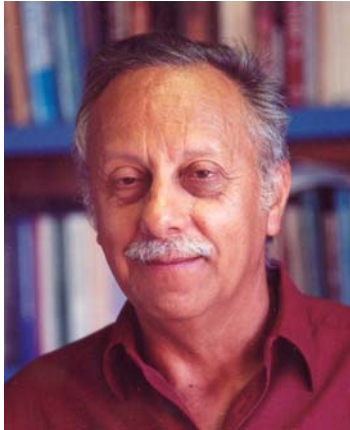
### Mecanismos de neurodegeneración

Los mecanismos de la muerte neuronal que caracteriza a varios tipos de enfermedades neurodegenerativas, cuya causa es desconocida, son hasta la fecha muy poco claros. Uno de los mecanismos propuestos es un incremento en la función de la neurotransmisión sináptica glutamatérgica excitatoria, producida por una sobreactivación de los receptores de glutamato de tipo ionotrópico, los cuales constituyen canales permeables al  $Ca^{2+}$ . En este artículo revisamos las bases experimentales de este mecanismo, llamado excitotoxicidad, incluyendo datos de nuestro laboratorio en modelos de epilepsia y de neurodegeneración en el hipocampo de la rata. Como un ejemplo más detallado, describimos experimentos recientes en los cuales estudiamos la posible correlación entre el incremento en la concentración extracelular de glutamato y el daño de las motoneuronas en la médula espinal de la rata *in vivo*, así como la vulnerabilidad de esas neuronas a la sobreactivación de los receptores al glutamato inducida por la perfusión por microdiálisis de diferentes agonistas. Encontramos que la perfusión con ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) por microdiálisis en la médula espinal lumbar produjo contracciones musculares, seguidas de una parálisis ipsilateral permanente, así como una severa pérdida de las motoneuronas, generando así un modelo de la enfermedad conocida como esclerosis lateral amiotrófica esporádica. Esos resultados sugieren que las motoneuronas son altamente vulnerables a la excitotoxicidad producida por la sobreactivación de los receptores AMPA, lo cual fue confirmado por el hallazgo de que el antagonista de los receptores AMPA, 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalina-7-sulfonamida (NBQX), protegió contra la parálisis y contra la neurodegeneración de las motoneuronas producidas por el AMPA.

**Palabras clave:** muerte neuronal; enfermedades neurodegenerativas; transmisión sináptica; receptores a glutamato; espina dorsal; esclerosis lateral amiotrófica.



## Semblanza del Dr. Ricardo Tapia



Médico Cirujano por Facultad de Medicina de la UNAM. Primer graduado como Doctor en Bioquímica de la UNAM, en 1969. En la actualidad es Investigador Emérito y Profesor de Asignatura en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y su tema de trabajo es sobre modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas y de epilepsia, y mecanismos de muerte neuronal. Profesor en la Facultad de Medicina, UNAM, de 1962 a 1980 y, de 1980 a la fecha, Profesor y Tutor en la licenciatura en Investigación Biomédica Básica y en los Posgrados en Ciencias Biomédicas, en Ciencias Bioquímicas y en Biología Experimental, UNAM. Coordinador General de la Licenciatura y el Posgrado en Investigación Biomédica Básica, de 1989 a 1996. Profesor en cursos de: CINVESTAV (IPN), UAM, IMSS, Institutos de Salud y hospitales de la SSA, Universidades de Guanajuato, Guadalajara y Autónoma de Puebla; en el extranjero, Universidad Zulia (Venezuela), Universidad de Honduras, y en varios cursos de organizaciones internacionales, incluyendo algunos en Argentina, Brasil, México y Uruguay. Ha dirigido 24 tesis de licenciatura, 15 de maestría y 12 de doctorado. Conferencista magistral en varios congresos y simposios nacionales e internacionales. Miembro de la International Society for Neurochemistry (miembro del Consejo Directivo 1985-1989), Sociedad Mexicana de Bioquímica, American Society for Neurochemistry, Society for Neuroscience, Academia Mexicana de Ciencias (AMC), Academia Nacional de Medicina (ANM), Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. International Brain Research Organization, New York Academy of Sciences, Seminario de Problemas Científicos y Filosóficos, y Colegio de Bioética (miembro fundador). Ha sido miembro de numerosas comisiones, jurados de premios y comités evaluadores en la UNAM, el CONACYT, el SNI, la AMC, la ANM y varias sociedades nacionales e internacionales, así como de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, desde 1997. Director de la revista *Ciencia* de la AMC, de 1997 a 2000. Ha publicado 141 trabajos en revistas internacionales, que han sido citados en la literatura internacional más de 3000 veces, así como 6 libros, uno de divulgación científica y 5 de docencia, y 76 artículos científicos y de docencia en libros y revistas nacionales, y numerosos artículos de divulgación de la ciencia en periódicos y en revistas culturales de interés general. Ha obtenido las siguientes distinciones: Premio de la Academia de la Investigación Científica (hoy AMC), 1976. Investigador Nacional nivel 3 desde 1984, Investigador Nacional Emérito desde 2000, e Investigador Nacional de Excelencia desde 2003 (SNI). Premio Universidad Nacional en Investigación en Ciencias Naturales, 1985. Premio de Investigación en Epilepsia, SSA, 1991. Premio Rosenkranz (Syntex), 1992. Cátedra Patrimonial de Excelencia Nivel I, CONACYT, 1994-2002. Investigador Emérito de la UNAM, desde 1996. Premio Nacional de Ciencias y Artes, 2002. Durante 8 años, Executive Editor de *Neurochemistry International*, y miembro del Editorial Board de: *Journal of Neurochemistry*, *Neurochemical Research* y *Archives of Medical Research*, así como árbitro de varias otras revistas internacionales.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## FACTORES DE CRECIMIENTO EN TUMORES CEREBRALES: UN BLANCO TERAPÉUTICO

Oscar Arrieta\*, Julio Sotelo<sup>‡</sup>  
Instituto Nacional de Cancerología\*  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía<sup>‡</sup>, Insurgentes  
Sur 3877, 14269 Mexico D.F., MEXICO  
[jsotelo@servidor.unam.mx](mailto:jsotelo@servidor.unam.mx)

### GROWTH FACTORS IN BRAIN TUMORS: A THERAPEUTIC TARGET

#### Abstract.

*Intracranial neoplasms include a great diversity of tumors with different histopathological origins, prognoses and treatments. Malignant gliomas, such as anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme, are the most frequent glial tumors. They are associated to a poor prognosis and both have high proliferation indexes and intense vascularity. These conditions are related to their ability to produce growth factors such VEGF, EGF, PDGF, FGF and HGF. These molecules could represent therapeutic targets that might improve prognosis. Nevertheless, great efforts have been made to inhibit several growth factors and the intracellular signals that regulate proliferation, apoptosis, invasiveness and angiogenesis. Few of these strategies have been taken to the clinical practice, and even less have been successful. The multiple disturbances and the great molecular heterogeneity of malignant gliomas could explain the difficulty to achieve satisfactory results. Successful treatments must request the identification of the molecular disturbances present and combine multiple therapeutic strategies. Although there have been important advances such as microarrays, which identify genetic expression profiles; individual subclassification is not yet possible. Despite such facts, we remain optimistic because of the identification of new mechanisms and intracellular pathways of growth factors.*

**Key words:** Intracranial neoplasms, growth factors; brain tumor; glioma

## Introducción

Los tumores primarios del sistema nervioso central corresponden al 2% de todas las neoplasias malignas y de éstos, los gliomas malignos (los astrocitomas los anaplásicos y el glioblastoma multiforme) son los tumores más frecuentes presentándose en un 60% (14). La Organización Mundial de la Salud define cuatro categorías de astrocitomas de acuerdo a sus alteraciones histológicas de acuerdo al las características histológicas como grado de diferenciación, presencia de necrosis y proliferación vascular (25). El glioblastoma multiforme (GBM), es la forma más agresiva de los gliomas, el cual puede desarrollarse *de novo* o a través de la transformación de un astrocitoma de grado inferior. La principal característica de estas neoplasias son las zonas de necrosis consecuencia de una alta tasa de proliferación celular, además de una extensa neoformación vascular. Aunque la sobrevivida media reportada en la literatura es de 40 semanas, en México la media de sobrevivida es de 16 meses en los pacientes que reciben tratamiento estándar con múltiples modalidades como son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (31). A pesar del avance científico, el pronóstico no ha cambiado en los últimos 30 años, por lo que la comprensión de su biología es de gran relevancia para desarrollar nuevos blancos terapéuticos que puedan mejorar el pronóstico.

## Fisiopatología de los gliomas malignos

La biología de los gliomas malignos se asocia con el balance en la expresión de las proteínas que controlan de manera positiva o negativa el ciclo celular, la proliferación, la motilidad, la neoformación vascular y el reconocimiento del sistema inmune. Estas alteraciones son el resultado de 1.- cambios en el nivel de la expresión de un gen normal o de involucrar la pérdida de un gen o 2.- la mutación del producto (receptor). La señal para que una célula normal proliferare, comúnmente inicia en la superficie celular, donde los factores de crecimiento (FC), liberados por la matriz extracelular (MEC) o por el propio tumor, interactúan con los receptores específicos en la membrana, desencadenando diversos mecanismos de señalización intracelular que afectan la expresión genética para promover la división celular. Pueden existir alteraciones y mutaciones en cada una de estas vías que en conjunto o de forma independiente puede dar lugar a la pérdida de regulación del ciclo celular, la angiogénesis, la proliferación y la invasión (15).

Los estímulos mitogénicos externos que se traducen y producen las señales citoplásmicas intermedias, afectan la expresión de los genes que inician la progresión del ciclo celular. Aquí la célula posee una serie de mecanismos que mantienen un balance a través de los efectores positivos y los reguladores negativos que controlan la proliferación. Los efectores positivos incluyen la cinasa dependiente de ciclina (CDK) y los protooncogenes MDM2. Los efectores negativos incluyen a los inhibidores de la cinasa ciclino dependiente (p15, p16, p18, p19, p21 y p27), y los genes supresores de tumores Rb y p53.

A medida que se clarifican los eventos responsables para la formación y progresión de gliomas, es posible correlacionar estas alteraciones con las características biológicas e histopatológicas del astrocitoma, del astrocitoma anaplásico y del glioblastoma multiforme. Para los astrocitomas grado II, la estimulación autócrina por el sistema PDGF aunado a la inactivación del gen *p53*, dando origen a la inducción del crecimiento con disminución de la muerte celular, lo que resulta en un crecimiento lento pero constante. Estas células también tendrán una respuesta defectuosa al daño de DNA y disminución de reparación lo que establece las condiciones para aumentar los cambios moleculares que pueden modificar el comportamiento tumoral en el futuro. Los astrocitomas anaplásicos muestran, además de las condiciones

---

ya mencionadas, una liberación de uno de los frenos críticos del ciclo celular que involucra a los genes CDKN2/p16, Rb y CDK4; lo que histológicamente resulta en un aumento importante en el número de mitosis y clínicamente como un crecimiento más conspicuo y veloz. Finalmente, los glioblastomas emergen por el surgimiento de clonas más agresivas, provenientes de un microambiente propicio para un círculo vicioso que involucra la necrosis, la hipoxia, la liberación de factores de crecimiento, la angiogénesis y la selección clonal. Las señales de crecimiento mediadas por la activación de los receptores del EGF pueden precipitar aún más este desarrollo. Las mutaciones que generan activación y sobreexpresión del receptor del EGF son esenciales en la patogenia de los glioblastomas primarios, asociándose a un pronóstico adverso (24).

### **Angiogénesis**

Para el crecimiento tumoral se requiere el balance entre los factores angiogénicos y anti-angiogénicos que regulan la proteólisis de la MEC, la disrupción de la adhesión celular, la migración, la proliferación y la quimiotaxis de células endoteliales. La remodelación de los vasos sanguíneos se inicia por las señales de crecimiento que interactúan con su ligando en la superficie celular. La activación de la angiogénesis puede ser el paso crucial en el desarrollo de una neoplasia benigna a una maligna. Esta hipótesis se ha manejado en gliomas de bajo grado que progresan a glioblastoma multiforme. Uno de los principales estimulantes para la expresión de factores angiogénicos es la hipoxia, que induce la síntesis de VEGF (23, 27,51).

### **Contacto celular y proliferación celular**

El contacto celular es importante para la regulación negativa de la proliferación celular. Al existir contacto entre las células por medio de las moléculas de adhesión, las señales para inhibir proliferación se transducen intracelularmente a través de los miembros de la familia de proteínas asociadas a la membrana 4.1, que incluyen a la proteína merlin, la DAL-1 y la ERM (ezrina-radixina-moesina). Estas proteínas sirven para conectar el citoesqueleto de actina a las glicoproteínas de la membrana celular. La disrupción de esta vía de señales ya sea por la pérdida de la expresión o la función del receptor o pérdida de la cascada de la familia de las proteínas 4.1 resulta en la eliminación de la señal inhibitoria por lo que se inicia la proliferación celular descontrolada.

La parte de la cascada intracelular mediada por las integrinas, se inicia de forma directa por la adhesión de éstas a las proteínas de la matriz extracelular o a través de otros tipos de receptores, incluyendo los receptores de tirosin cinasa involucrados con las señales de los FC, al receptor de HGF (c-met) y a los receptores de VEGF. La activación subsiguiente mediada por las integrinas de la cinasa de adhesión focal (FAK) promueve entonces la proliferación celular, la inhibición de apoptosis, la diseminación y la migración celular.

### **Factores de crecimiento**

Uno de los primeros eventos en el desarrollo de un glioma es un aumento en la expresión de factores de crecimiento, de sus receptores o de ambos, lo que ocasiona a estimulación autócrina y parácrina. En estos se incluye a los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) A y B, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), al factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (FGF), los factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2 (IGF-1 y 2) y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF)

(37). En la Tabla 1 se muestra el probable papel biológico de algunos factores de crecimiento en gliomas malignos.

En general, estos factores de crecimiento se unen a receptores tipo tirosin-cinasa para inducir la dimerización, la autofosforilación y la expresión de sitios de unión para proteínas de señal. El complejo formado activa una cascada de eventos por parte de una familia de proteínas llamadas transductores de señal y activadores de transcripción (STATs), que inducen la expresión de genes pro-proliferación y antiapoptóticos, lo que produce a un aumento en la proliferación celular.

**Tabla 1.** Actividad de los factores de crecimiento en los gliomas

Factor de Crecimiento	Actividad	Referencia
EGF	1. Proliferación celular por estimulación autócrina 2. Aumento de la tumorigenicidad y la malignidad 3. Resistencia a la quimioterapia	Frederick 2000
FGF	1. Proliferación celular por estimulación autócrina 2. Efecto sinérgico con el VEGF y el HGF para estimular la angiogénesis	Auguste 2001
VEGF	1. Principal mediador de la angiogénesis 2. Proteólisis de MEC 3. Aumento de edema cerebral	Chaudhry 2001
PDGF	1. Aumento de la transcripción de los factores de crecimiento (VEGF) 2. Potenciación de VEGF para estimular la angiogénesis 3. Proliferación celular	Arrieta 1998
HGF	1. Aumento de proliferación celular 2. Resistencia a radioterapia 3. Estimulación de la angiogenesis 4. Proteolisis de MEC	Arrieta 2002 Lattera 1997 Lamzus 2004
IGF	Proliferación celular por estimulación autócrina	Glick 1997

### Factor de Crecimiento Epidérmico

La familia de los factores de crecimiento epidérmico está constituida por el EGF, el TGF- $\alpha$  y la epiregulina y sus receptores EGFR/c-erbB1, B2, B3. La unión produce la dimerización del receptor y contribuyen a la estimulación autócrina de los gliomas malignos. Los patrones de expresión aberrante del EGFR (tirosin-cinasa transmembrana), el producto del proto-oncogen *c-erbB1*, se han asociado con la tumorigenicidad aumentada y la progresión tumoral en los gliomas de alto-grado que se presentan en adultos, la sobreexpresión de este gen se ha encontrado en 40-50% de GBM, frecuentemente en asociación con un rearreglo del gen para producir un receptor truncado y constitutivamente activado independiente del ligando. La frecuencia de amplificación de este gen varía dependiendo del grado tumoral de los gliomas, de 0, 6 y 50-68% en los gliomas grado I o II, III y IV respectivamente (18). La habilidad de las células tumorales para generar estas formas mutantes funcionales de EGFR puede

contribuir a la capacidad de los gliomas para evadir la quimioterapia y aumenta la complejidad para diseñar estrategias terapéuticas contra el EGF (32).

Se ha reportado que la amplificación del gen *EGFR* en el cromosoma 7 se puede usar para distinguir entre glioblastomas denominados "primarios" (los que surgen *de novo*, usualmente en pacientes con edad más avanzada) de los glioblastomas "secundarios" (los que parece que evolucionan de una forma más gradual a partir de lesiones de menor grado, generalmente en pacientes jóvenes). Sin embargo, debido a que este factor correlaciona con el grado tumoral, se desconoce si la expresión del EGFR o la amplificación del gen son de utilidad pronóstica independiente. Debido a que la inmunorreactividad del EGFR es una característica común en estos tumores, se han propuesto estrategias terapéuticas contra este receptor para detener el avance de los gliomas de alto grado.

Por medio de estudios de microarreglos, se ha demostrado que la sobre-expresión del receptor del EGF tiene un efecto considerable sobre el perfil transcripcional del GBM, se ha demostrado que este evento está asociado con la co-expresión de otros 90 genes, para algunos no se conoce la función, pero se sabe que otros están asociados con la proliferación celular del GBM (30). Diferentes patrones moleculares que podrían ser importantes en la clasificación y selección de estrategias terapéuticas. Sin embargo, se han identificado mutaciones específicas sobre el gen del rEGF, las cuales pudieran estar involucradas con la definición de tumores con mayor agresividad.

La transformación de un astrocitoma de bajo grado a un GBM, se asocia con una acumulación progresiva de mutaciones genéticas, la amplificación del EGFR es una de las últimas alteraciones y se relaciona con rearrreglos de los exones 2-7 del gen *EGFR*, lo cual genera un empalme coercitivo lo que da lugar a un transcrito idéntico pero truncado, sin el dominio para el receptor extracelular. Esta proteína denominada EGFRvIII está constitutivamente activada y le confiere una ventaja de crecimiento *in vivo* a las células implantadas en ratones desnudos por activación constante de la vía Ras-MAPK (16). Las implicaciones pronósticas sobre la amplificación de EGFR son controversiales. La sobreexpresión de EGFR no es un marcador pronóstico independiente, sin embargo, asociado a la ausencia de p53 y la edad, le confiere una menor sobrevida. La detección de vIIIIEGF por inmunohistoquímica no mostró estar asociado con la sobrevida con los GBM, pero sí con los astrocitomas anaplásicos, lo cual sugiere que la detección de vIIIIEGF puede ser utilizado para identificar y/o confirmar la identidad de un astrocitoma maligno que se comporta clínicamente como GBM (1)

Las estrategias de tratamiento para inhibir al EGFR involucran 1.- el uso de anticuerpos monoclonales (promueven la internalización del receptor disminuyendo su fosforilación), 2.- anticuerpos marcados con inmunotoxinas y radionucleótidos, y 3.- el bloqueo de las vías de señalización como es la inhibición de la cinasa a nivel del receptor EGFR; existen varios inhibidores como el ZD1839 (IRESSA o Gefitinib) que compiten con el ATP por la unión al receptor, estos compuestos están actualmente en ensayos clínicos fase I y II en paciente con glioblastoma multiforme, mostrando en algunos casos estabilización de la enfermedad (26). También se han probado otros inhibidores del EGFR, como el herstatin, el cual es capaz de inhibir el crecimiento de células de glioma humano intracraneal en ratones desnudos (46).

Aunque las mutaciones de Ras no parecen estar asociados a GBM, existe una constante actividad de Ras por la activación del EGFR, el EGFRvIII y el PDGFR en los astrocitomas malignos. La inhibición de la vía de Ras/MAPK con inhibidores de la farnesil transferasa (proceso crucial para el

traslado de Ras a la membrana celular) bloquea las señales mediadas por Ras y las vías Rho B y PI3K/Akt; el uso de inhibidores de la farnesilación con SCH66336 y R115777 podría tener efectos antitumorales, actualmente se están lo que produce acabo estudios fase I con estos compuestos (37).

### **Factor de crecimiento del endotelio vascular**

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), tiene un papel muy importante debido a que sus receptores están presentes únicamente en células endoteliales. El VEGF es una glicoproteína dimérica con cuatro isoformas que son altamente específicas para los receptores Flt-1, Flt-2 y KDR (ahora llamados VEGF-1,-2,-3). Los receptores de VEGF pertenecen a la familia de los receptores tirosin-cinasa, que inician la cascada al dimerizarse. La activación de los receptores de VEGF (VEGFR) también resulta en señalización indirecta para el inicio de la adhesión y la agregación de las integrinas a las proteínas de la matriz extracelular; este fenómeno induce las vías que modulan la apoptosis, la migración y la diseminación e invasión de las células tumorales.

Se considera que VEGF es el mediador más importante de la neovascularización en los gliomas y su expresión aumenta durante la progresión de gliomas (33). Ambos receptores (Flt-1 y KDR) están sobreexpresados en las células endoteliales de los astrocitomas malignos, los oligodendrogliomas anaplásicos y los ependimomas. La expresión del receptor Flt-1 ocurre en etapas tempranas de la tumorigénesis del glioma, mientras que el gen KDR es expresado (up-regulated) a medida que el glioma va progresando. La dependencia del crecimiento tumoral de la adquisición de vasos sanguíneos fue observada al tratar gliomas C6 con un receptor mutante KDR (FLK-1) dominante negativo. Su expresión está relacionada con la densidad vascular, la proliferación celular, el grado de malignidad y la severidad de edema cerebral inducido en los astrocitomas malignos. Además la presencia de VEGF y de sus receptores en gliomas de bajo grado está asociada con el grado de recurrencia y sobrevida (40,53). En modelos animales, la radioterapia induce expresión de VEGF asociado con radio-resistencia (21, 48).

Por su importancia en la fisiopatología, las estrategias terapéuticas contra el VEGF están basadas en la inhibición de la expresión del VEGF, la interferencia de vías de señalización, el uso de anticuerpos contra el VEGF y el VEGFR y contra los receptores solubles de VEGF. En el glioma experimental C6 de rata se han probado anticuerpos contra el receptor FLT-1, resultando en la inhibición de la actividad tirosina cinasa y un efecto antitumoral (47). También en modelos experimentales, se ha demostrado que la administración de los anticuerpos contra VEGF y el inhibidor de tirosin cinasa selectivo de Flk-1, puede prevenir la radio-resistencia (21, 48). Uno de los principales mecanismos de inhibición de la angiogénesis en los tumores malignos de la talidomida, es la inhibición de la síntesis de VEGF (así como de FGF) (9). En los modelos animales, hemos demostrado que los efectos antitumorales de la talidomida en el glioma experimental C6, están asociados con la disminución de la proliferación celular (5, 41), mostrando un efecto sinérgico con quimioterapia (5). Por medio de estudios fase II en gliomas recurrentes con tratamiento de talidomida, se ha demostrado la estabilización de la enfermedad en 42 % de pacientes y de las respuestas parciales en un 5% (35). Ensayos clínicos han corroborado nuestras observaciones al demostrar sinergismo entre la talidomida y la carmustina. En el modelo de glioma C6, los anticuerpos contra el VEGF y su receptor FLT-1 inhiben el crecimiento celular *in vivo* (47). Dos inhibidores de los VEGFR, el PTK787 y el SU5416, así como los anticuerpos monoclonales anti-VEGF y anti-VEGFR2, están siendo evaluados en ensayos Fase I.

### **Factor de Crecimiento Hepatocítico**

El factor de crecimiento hepatocítico (HGF), es una proteína multifuncional con un fuerte efecto mitogénico en los hepatocitos, está constituido por una cadena pesada y una cadena ligera que se une a un receptor tirosin-cinasa transmembrana, producto del proto-oncogen c-Met. El HGF también estimula la angiogénesis a través de interacciones con su receptor c-met presente en las células endoteliales. Al igual que con los VEGFRs, la estimulación de c-met puede resultar en la activación indirecta de las integrinas que participan en la modulación de la invasión a la matriz extracelular, así como la coexpresión de las metaloproteasas (52)

Los tumores gliales humanos y las líneas celulares de glioblastoma expresan el factor y su receptor así como una proteasa sérica que activa al precursor del HGF (28). Los gliomas malignos contienen niveles más elevados de HGF que los gliomas de grado bajo o que el tejido cerebral sano (38). Nosotros encontramos que el HGF es un marcador pronóstico independiente para los gliomas malignos, presentando una correlación directa con el índice de proliferación celular, la angiogénesis y el edema cerebral, lo que sugiere su participación en el crecimiento tumoral (6).

La transferencia del gen del HGF a la línea de glioblastoma U373 (que normalmente expresa c-met pero no HGF) aumenta su tumorigenicidad y malignidad *in vivo* así como el crecimiento independiente de anclaje *in vitro*, lo que sugiere que la vía de señales HGF/c-met aumenta la proliferación por mecanismos autócrinos, parácrinos o ambos (28). Se ha utilizado un antagonista del HGF (HGF/NK2), una forma truncada del HGF que se une a c-met con funciones agonistas parciales y antagonistas, en las células de glioma U87 con una vía autócrina estimuladora de HGF, el cual fue capaz de inhibir la migración *in vitro*, así como el crecimiento y la angiogénesis tumoral *in vivo* (10,22). También en modelos animales, los anticuerpos neutralizantes del HGF en los gliomas de origen humano inoculados en ratones han demostrado actividad antitumoral (11).

### **Factor de crecimiento derivado de plaquetas**

La familia de los factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y sus receptores están ampliamente expresados en los gliomas y en otros tumores del SNC. La reactivación de la expresión normal de los genes regulados durante el desarrollo, parece ser la causa de la sobre-expresión en la mayoría de los casos, ya que re-arreglos y amplificaciones ocurren solo en el 10-20% de los gliomas. La inducción de la expresión de PDGF parece ser un evento importante y temprano en la tumorigénesis, ya que la inyección de un retrovirus que codifique para la cadena PDGF-B en cerebro de ratón, induce tumores con características similares al glioblastoma multiforme (45). Estas investigaciones demuestran la importante contribución del cambio en la expresión de un solo factor. La expresión de PDGF está regulada de manera positiva de forma temprana en los gliomas de bajo grado, pero el receptor PDGFR-beta se expresa únicamente en las células endoteliales de gliomas de alto grado. Su expresión tiene implicaciones pronósticas en los gliomas de bajo grado (50).

El CP-673,451, un potente inhibidor de la cinasa PDGFR- $\beta$ , inhibe el crecimiento y la angiogénesis del glioblastoma multiforme U87MG humano (44). De igual manera, los anticuerpos neutralizantes contra PDGF inhiben sus vías de señalización intracelular, mostrando una disminución en la viabilidad celular (49). En el modelo experimental del glioma C6, nosotros demostramos que la protamina, un antagonista del receptor PDGF, tiene actividad antitumoral asociada con



disminución de la proliferación celular y la angiogénesis, con efecto sinérgico cuando es combinada con la quimioterapia citotóxica.

### **Factores de crecimiento tipo insulínico-1 y -2**

Los factores de crecimiento insulínicos (IGF1 e IGF2), son factores endocrinos circulantes en el torrente sanguíneo que se unen a receptores específicos para IGF1R (tirosin-cinasa) e IGF2R (manosa 6-fosfato). Ambos se encuentran sobre-expresados en los gliomas y otras neoplasias del SNC (20,54), relacionándose con un proceso de proliferación e inhibición de la apoptosis (19). En modelos experimentales tratamientos con genes antisentido contra el IGF o sus receptores, han sido probados extensamente con un importante efecto antitumoral (42). En un estudio piloto con las células de glioma autólogas de pacientes se demostró que el tratamiento con oligodeoxinucleótido antisentido contra el receptor del IGF, produce una reducción del 10% de la expresión del receptor, lo que ocasiona la inducción de la apoptosis (2).

### **Factor de Crecimiento Fibroblástico**

La familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), pertenecen a una clase de factores de unión a heparina que se unen a los receptores específicos FGFR1, FGFR2, FGFR3 Y FGFR4, los cuales son tirosina cinasa. Se han reportado incrementos en la producción de los factores de crecimiento fibroblástico y sus respectivos receptores en los gliomas (39). La coexpresión de los factores y sus receptores contribuye a la estimulación autócrina, ya que el crecimiento tumoral se inhibió en presencia de los oligonucleótidos antisentido bFGF. De lo anterior se deduce que los efectos mitogénicos pueden deberse al resultado de una sobreexpresión de las proteínas normales; sin embargo estudios en el GBM han demostrado que el exón  $\alpha$  del FGFR1 no estaba empalmado en el transcrito, lo que provoca un receptor de alta afinidad que posiblemente contribuía al grado de malignidad. La expresión de bFGF está regulada de manera positiva de forma temprana y consistente a través de la progresión de los gliomas.

El bFGF tiene el efecto sinérgico con el HGF y el VEGF de forma independiente o en combinación para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, y aunque los niveles de HGF y VEGF estaban elevados en los gliomas malignos comparados con los de bajo grado, este no fue el caso para el bFGF del que existen niveles biológicamente activos en los gliomas de bajo grado, por lo tanto parece que el bFGF por sí solo es insuficiente para inducir angiogénesis en gliomas pero puede actuar de forma sinérgica con el HGF y el VEGF durante la progresión maligna. La expresión de FGF se relaciona de igual manera con una baja sobrevida .

Múltiples tratamientos inhibiendo la actividad de FGF a nivel experimental se han realizado (12,13). El 1,3,6-naftaleno-trisulfonato, un inhibidor del FGFR, es capaz de reducir tanto la proliferación celular como la inducción de la apoptosis *in vitro* además de *in vivo*, inhibir la angiogénesis en el glioma C6. Utilizando tetraciclina para inhibir el sistema de la expresión de FGF R1 y FGFR2, las células del glioma disminuyen la expresión de VEGF, inhibiendo el proceso de la angiogénesis y presentando actividad anti-tumoral. (8)

## Las hormonas y los astrocitomas malignos.

La angiotensina II (AgII), además de regular la tensión arterial y el balance de los líquidos y los electrolitos, participa en la proliferación celular y la angiogénesis a través del receptor AT1 en diversos modelos no tumorales, como el miocardio y el riñón. Estos efectos parecen estar mediados por la estimulación de los factores de crecimiento, como el PDGF, el VEGF y el FGF. Nosotros demostramos que en diversos modelos experimentales de gliomas, el receptor AT1 y AT2 se encuentran expresados (17,43). El bloqueo del receptor selectivo de AT1, inhibe la proliferación celular, induce la apoptosis y tiene efecto antitumoral, asociado con la disminución de la síntesis de del PDGF, de VEGF y de FGF (Arrieta y cols, en prensa). Estudios recientes realizados por nuestro grupo han demostrado que una tercera parte de los astrocitomas malignos expresa, tanto AT1 y AT2, por lo que el bloqueo de AT1 pudiera representar un blanco terapéutico hormonal.

Otras hormonas probablemente involucradas en la fisiopatología de estas neoplasias es la gastrina, la cual puede aumentar la proliferación celular en modelos de los gliomas de alto grado como C6 de rata y U373 (29)

## Conclusión

Grandes esfuerzos se han realizado por inhibir diversos factores de crecimiento e inhibir sus señales intracelulares que regulan la proliferación, la apoptosis, la invasividad y la angiogénesis. Sin embargo pocas de estas estrategias se han llevado a la práctica clínica y más aún, pocas han sido exitosas. La dificultad para lograr resultados satisfactorios podría radicar en que los gliomas malignos presentan alteraciones en múltiples y diferentes vías, mostrando una gran heterogeneidad molecular, inclusive en un mismo tumor. Por consiguiente, tratamientos exitosos deben de requerir la identificación de las alteraciones moleculares presentes y combinar múltiples tratamientos. Sin embargo, la subclasificación individual aún no es posible, a pesar de los avances de micro-arreglos que identifican perfiles de la expresión génica. Aún así, la identificación de nuevos mecanismos y vías intracelulares de los factores de crecimiento hacen que permanezcamos cuidadosamente optimistas.

## Referencias

1. Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD (2004) Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(7): 700-707.
2. Andrews DW, Resnicoff M, Flanders AE, Kenyon L, Curtis M, Merli G, Baserga R, Iliakis G, Aiken RD (2001) Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J Clin Oncol* 19(8): 2189-2200.
3. Arrieta O, Guevara P, Reyes S, Ortiz A, Rembao D, Sotelo J (2001A) Protamine Inhibits angiogenesis and Growth of C6 Rat Glioma a Synergistic Effect when Combined with Carmustine. *Eur J Cancer* 34: 2101-2106
4. Arrieta O, Guevara P, Reyes S, Palencia G, Rivera E, Sotelo J (2001B) Paradoxical effect of aspirin on the growth of C6 rat glioma and on time of development of ENU-induced tumors of the nervous system. *J Cancer Res and Clin Oncol* 127: 681-686
5. Arrieta O, Guevara P, Tamariz J, Rembao D, Rivera E, Sotelo J (2002A)., Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma. *Int J Exp Path* 83: 99-104.

6. Arrieta O, Garcia E, Guevara P, Garcia-Navarrete R, Ondarza R, Rembao D, Sotelo J (2002B) Hepatocyte Growth Factor Is Associated with Poor Prognosis of Malignant Gliomas and Is a Predictor for Recurrence of Meningioma. *Cancer* 94: 3210-3218.
7. Arrieta O, Guevara P, Escobar E, García-Navarrete R, Pineda B, Sotelo J (2005) AT1 angiotensin II receptor blockage in C6 rat glioma decreases the synthesis of growth factors, inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Br J Cancer*. 92(7): 1247-1252.
8. Auguste P, Gursel DB, Lemiere S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP, Bikfalvi A (2001) Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 61(4): 1717-1726.
9. Basso U, Ermani M, Vastola F, Brandes AA (2002;) Non-cytotoxic therapies for malignant gliomas. *J Neurooncol* 58: 57-69.
10. Brockmann MA, Papadimitriou A, Brandt M, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K (2003) Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin Cancer Res* 9(12): 4578-4585.
11. Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF. (2001) Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/ scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7443-7448.
12. Cuevas P, Carceller F, Reimers D, Cuevas B, Lozano RM, Gimenez-Gallego G (1999A) Inhibition of intra-tumoral angiogenesis and glioma growth by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol Res* 21(5): 481-487.
13. Cuevas P, Reimers D, Diaz D, Lozano RM, Gimenez-Gallego G (1999B) Apoptosis of glioma cells induced by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurosci Lett* 275(2): 149-151.
14. DeAngelis LM (2001) Brain tumors. *N Engl J Med* 344(2): 114-123.
15. Demuth T, Berens ME (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 70(2): 217-228.
16. Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A. (1999) Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery* 45(6): 1442-1453.
17. Fogarty DJ, Sanchez GV, Matute C (2002) Multiple angiotensin receptor subtypes in normal and tumor astrocytes in vitro. *Glia* 39: 304-313
18. Frederick L (2000) Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60: 1383
19. Friend KE, Khandwala HM, Flyvbjerg A, Hill H, Li J, McCutcheon IE (2001) Growth hormone and insulin-like growth factor-I: effects on the growth of glioma cell lines. *Growth Horm IGF Res* 11(2): 84-91.
20. Glick RP, Lichtor T, Unterman TG. (1997) Insulin-like growth factors in central nervous system tumors. *J Neurooncol* 35(3): 315-325.
21. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, Koons A, Hari DM, Kufe DW, Weichselbaum RR (1999) Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 59(14): 3374-3378.
22. Guerin C, Luddy C, Abounader R, Lal B, Lattera J (2000) Glioma inhibition by HGF/NK2, an antagonist of scatter factor/hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 273(1): 287-293.
23. Kaur B, Tan C, Brat DJ, Post DE, Van Meir EG (2004) Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol*. 70(2): 229-243.
24. Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB (2003) Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Curr Opin Oncol* 15(3): 197-203.
25. Kleihues P, Cavenee W (2000) *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System* International Agency for Research on Cancer (LyonFrance).
26. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD (2001) EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8(2): 83-96.
27. Lamszus K, Heese O, Westphal M (2004) Angiogenesis-related growth factors in brain tumors. *Cancer Treat Res* 117: 169-190.
28. Lattera J, Rosen E, Nam M, Ranganathan S, Fielding K, Johnston P (1997) Scatter factor/hepatocyte growth factor expression enhances human glioblastoma tumorigenicity and growth. *Biochem Biophys Res Commun* 235(3): 743-747.

29. Lefranc F, Sadeghi N, Metens T, Brotchi J, Salmon I, Kiss R (2003) Characterization of gastrin-induced cytostatic effect on cell proliferation in experimental malignant gliomas. *Neurosurgery* 52(4): 881-891.
30. Lischel P (2003) Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogen* 22: 2361
31. López-Gonzalez and Sotelo J (2000) Brain tumors in Mexico: Characteristic and prognosis of glioblastoma. *Surg Neurol*, 53: 157-162.
32. Lorimer IA (2002) Mutant epidermal growth factor receptors as targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2(2): 91-102.
33. Machein and Plate (2000) VEGF in brain tumors. *J Neuro-oncol* 50: 109
34. Machein MR, Kullmer J, Fiebich BL, Plate KH, Warnke PC (1999) Vascular endothelial Growth factor expression, vascular volume, and capillary permeability in human brain tumors. *Neurosurgery* 44: 732-741.
35. Marx GM, Pavlakis N, McCowatt S, Boyle FM, Levi JA, Bell DR, Cook R, Biggs M, Little N, Wheeler HR (2001) Phase II study of Thalidomide in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurol Oncol* 54: 31-38
36. Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A (1999) Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-Guanosine Triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 45: 1442-1453.
37. Mischel and Cloughesy (2003) Target molecular therapy of GBM. *Brain Pathol* 13: 51
38. Moriyama T, Kataoka H, Koono M, Wakisaka S (1999) Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met in brain tumors: evidence for a role in progression of astrocytic tumors. *Int J Mol Med* 3(5): 531-536.
39. Morrison RS, Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Yahanda AM, Donehower LA, Berger M (1994) Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *Neurooncol* 18(3): 207-216.
40. Nam DH, Park K, Suh YL, Kim JH (2004) Expression of VEGF and brain specific angiogenesis inhibitor-1 in glioblastoma: prognostic significance. *Oncol Rep* 11(4): 863-869.
41. Palencia G, Arrieta O, Ríos C, Sotelo J (2002) Effect of thalidomide against different tumors in rodents. *J Exp Ther Oncol* May-Jun;2(3): 158-162.
42. Rininsland F, Johnson TR, Chernicky CL, Schulze E, Burfeind P, Ilan J (1997) Suppression of insulin-like growth factor type I receptor by a triple-helix strategy inhibits IGF-I transcription and tumorigenic potential of rat C6 glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5854-5859.
43. Rivera E, Arrieta O, Guevara P, Duarte A, Sotelo J (2001) AT1 receptor is present in glioma cells; Its blockage Reduces glioma C6 proliferation. *Br J Cancer*, 85(9): 1396-1399.
44. Roberts WG, Whalen PM, Soderstrom E, Moraski G, Lyssikatos JP, Wang HF, Cooper B, Baker DA, Savage D, Dalvie D, Atherton JA, Ralston S, Szewc R, Kath JC, Lin J, Soderstrom C, Tkalcevic G, Cohen BD, Pollack V, Barth W, Hungerford W, Ung E (2005) Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451. *Cancer Res* 65(3): 957-66.
45. Smits A, Funa K (1998) Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol Histopathol* 13: 511-520
46. Staverosky JA, Muldoon LL, Guo S, Evans AJ, Neuwelt EA, Clinton GM (2005) Herstatin, an autoinhibitor of the epidermal growth factor receptor family, blocks the intracranial growth of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 11: 335-340.
47. Stefanik DF, Fellows WK, Rizkalla LR, Rizkalla WM, Stefanik PP, Deleo AB, Welch WC (2001) Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor (VEGF) and the VEGF receptor, FLT-1, inhibit the growth of C6 glioma in a mouse xenograft. *J Neurooncol*. 55: 91-100.
48. Steiner HH, Karcher S, Mueller MM, Nalbantis E, Kunze S, Herold-Mende C (2004) Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J Neurooncol* 66 (1-2): 129-138.
49. Takeuchi H, Kanzawa T, Kondo Y, Kondo S (2004) Inhibition of platelet-derived growth factor signalling induces autophagy in malignant glioma cells. *Br J Cancer* 90: 1069-1075.
50. Varela M, Ranuncolo SM, Morand A, Lastiri J, De Kier Joffe EB, Puricelli LI, Pallotta MG (2004) EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol* 86: 34-40.
51. Visted T, Enger PO, Lund-Johansen M, Bjerkvig R (2003) Mechanisms of tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Front Biosci* 8: e289-304.
52. Yano H, Hara A, Murase S, Hayashi K, Ando H, Shinoda J, Shimokawa K, Sakai N (2001) Expression of hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-2 in human glioma. *Brain Tumor Pathol* 18: 7-12.

53. Yao Y, Kubota T, Sato K, Kitai R, Takeuchi H, Arishima H (2001) Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumours. *Acta Neurochir* 143: 159-166
54. Zumkeller W and Westphal M (2001) The IGF/IGFBP system in CNS malignancy. *Mol Pathol.* 54: 227-229.

## FACTORES DE CRECIMIENTO EN TUMORES CEREBRALES: UN BLANCO TERAPÉUTICO

### Resumen

Las neoplasias intracraneales incluyen una gran diversidad de tumores con diferentes orígenes, pronóstico y tratamiento. Los gliomas malignos como astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme son los tumores de la glia más frecuentes y están asociados con pobre pronóstico. Ambas neoplasias tienen índices de proliferación altos e intensa vascularidad. Estas condiciones están relacionadas con la capacidad para expresar factores de crecimiento y sus receptores como lo son VEGF, EGF, PDGF, FGF y HGF. Estas moléculas pueden representar blancos terapéuticos con el fin de mejorar el pronóstico. Sin embargo grandes esfuerzos se han realizado por inhibir diversos factores de crecimiento e inhibir sus señales intracelulares que regulan la proliferación, la apoptosis, la invasividad y la angiogénesis. Pocas de estas estrategias se han llevado a la práctica clínica y más aún, pocas han sido exitosas. La dificultad para lograr resultados satisfactorios podría radicar en que los gliomas malignos presentan alteraciones en múltiples y diferentes vías, mostrando una gran heterogeneidad molecular. Los tratamientos exitosos deben de requerir la identificación de las alteraciones moleculares presentes y combinar múltiples tratamientos. Sin embargo, la subclasificación individual aún no es posible, a pesar de los avances de micro-arreglos que identifican perfiles de la expresión génica. Aún así, la identificación de nuevos mecanismos y vías intracelulares de los factores de crecimiento hacen que permanezcamos cuidadosamente optimistas.

**Palabras clave:** neoplasma intracraneal, factores de crecimiento; tumor cerebral; glioma

## SEMBLANZA DEL DR. JULIO SOTELO



Médico cirujano de la Universidad Nacional Autónoma de México (1974), Especializado en Neurología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México (1975-1978), Estudios de Postgrado en Neuroinmunología (1978-1979) en la Universidad de Londres con el Prof. John Holborow (Profesor Emeritus Immunology) y en Neurovirología (1979-1981) en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos con el Prof. Carleton Gajdusek (Premio Nobel de Medicina). Actualmente Director General del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Autor de 86 capítulos en libros de texto internacionales y 228 publicaciones en revistas científicas indexadas internacionales. Hasta diciembre de 2004 citado 3,610 veces en la literatura científica internacional. Tercer autor de Latinoamérica más citado en la literatura Médica Internacional (ISI 1994). Autor del tercer artículo más citado en la Literatura Internacional de Autores Latinoamericanos. (*New Engl J Med* 1984; 310:1001-1007, (ISI 1995). Autor del décimo artículo más citado en la Literatura Internacional de Autores Latinoamericanos (*Arch Int Med* 1985; 145:442-449, (ISI 1995). Autor de tres artículos "clásicos" del Citation Index de la década 1990-2000 (ISI 2000). Tutor de 30 tesis de licenciatura,

especialidad, maestría y doctorado. Conferencista invitado a 77 universidades e Instituciones médicas internacionales. Vice-Presidente (2000) y Presidente (2001) de la Academia Nacional de Medicina de México. Ex-presidente de la Sociedad Mexicana de Neurología y Psiquiatría (1987-1988). Profesor de pregrado y posgrado de la Facultad de Medicina, UNAM. Investigador Titular "C" de los Institutos Nacionales de Salud de México, Investigador Nacional Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores de México. Miembro de la Junta Directiva de la Universidad Autónoma Metropolitana de México (segunda Universidad más grande de Latinoamérica). Coordinador del Programa de Maestrías y Doctorados en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM. Coordinador General del Comité Normativo Nacional de la Medicina General de México (2002-2004). Recipiendario de la Condecoración "Eduardo Liceaga" al Mérito en Medicina otorgada por el Presidente de la República Mexicana el 7 de Abril de 1992. Recipiendario del Premio Nacional de Ciencias y Artes 2001 otorgado por el Presidente de la República Mexicana el 25 de febrero de 2002. Recipiendario en dos ocasiones del Premio de la Academia Nacional de Medicina de México al mejor trabajo científico publicado en investigación clínica (1993 y 2003). Miembro del Consejo Editorial del British Medical Journal (Inglaterra); Surgical Neurology (USA).



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## DISEÑO MOLECULAR DE LACTONAS DE DIACILGLICEROL (DAG- LACTONAS) COMO ACTIVADORES ESPECÍFICOS DE ISOZIMAS DE LA PROTEÍNA CINASA C Y DE OTRAS PROTEÍNAS CON RECEPTORES SIMILARES

Víctor E. Márquez

Chief, Laboratory of Medicinal Chemistry  
Center for Cancer Research, NCI-Frederick  
376 Boyles St., Bldg. 376, Rm. 104  
Frederick, MD 21702-1201  
[marquezv@dc37a.nci.nih.gov](mailto:marquezv@dc37a.nci.nih.gov)

### MOLECULAR DESIGN OF DIACYLGLYCEROL LACTONES (DAG-LACTONES) AS SPECIFIC ACTIVATORS OF ISOFORMS OF PROTEIN KINASE C AND OTHER TARGET PROTEINS WITH SIMILAR RECEPTORS

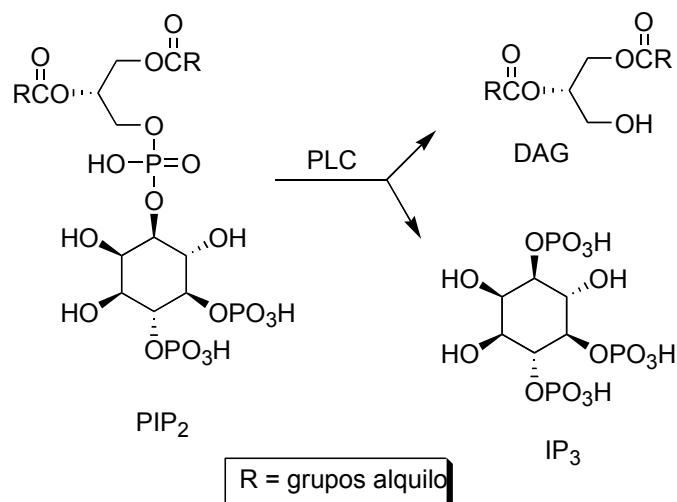
#### Abstract.

*The central role of protein kinase C (PKC) in cellular signal transduction has established it as an important therapeutic target for cancer and other diseases. We have developed a series of 4,4-disubstituted- $\gamma$ -butyrolactones (DAG-lactones), which contain a constrained glycerol backbone and behave as potent and selective ligands of PKC with affinities that approach those typically observed with structurally complex natural products. Such an increase in binding affinity results from reducing the entropic penalty associated with the transformation of a DAG into a DAG-lactone. Insights arising from the crystal structure of a C1 domain bound to a phorbol ester suggested the incorporation of amino acid-specific, branched hydrocarbon chains to provide a new generation of DAG-lactones that have the capacity to bind to PKC with low nanomolar affinity. Because the selective translocation of individual PKC isozymes to different cellular compartments determines its biological outcome, we have developed libraries of DAG-lactones containing a combinatorial-generated set of side chains, which provide a sort of molecular postal code that directs the translocation of individual isozymes, or other non-kinase target proteins that contain C1 domains, such as RasGRP, to specific cellular sites. The ability to direct the specific translocation of these target proteins with sets of structurally simple, yet highly potent compounds provides a powerful tool for engineering a plethora of molecules with novel biological functions.*

**Keywords:** Diacylglycerol, diacylglycerol lactones, protein kinase C isozymes, drug design, chemical libraries.

## 1. Introducción

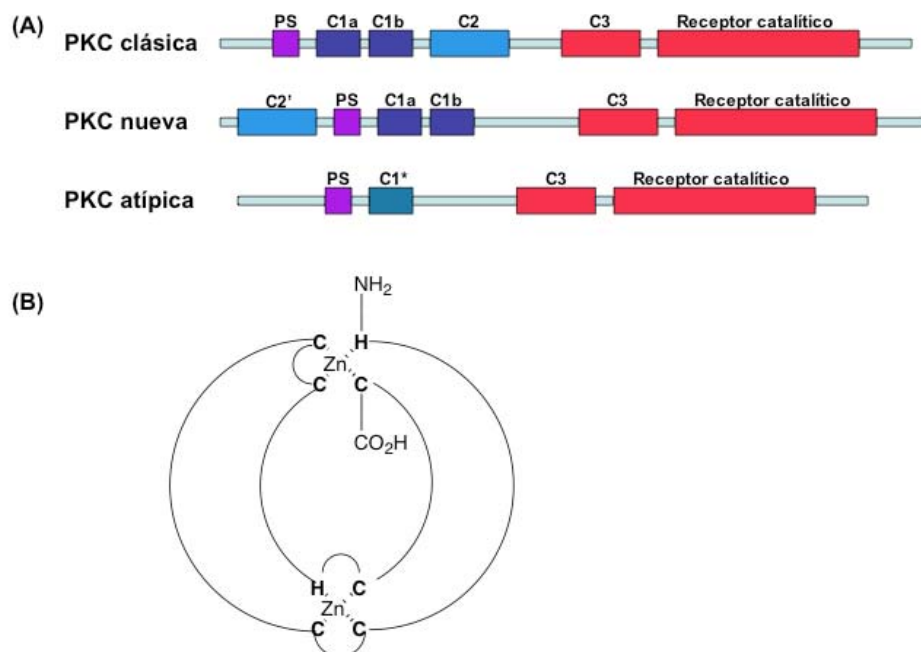
Avances recientes en el descubrimiento de los muy diversos eventos moleculares asociados con el cáncer apuntan, sin duda alguna, al papel central que desempeñan los circuitos de transmisión celular en la iniciación y propagación del estado neoplásico. Uno de los circuitos más importantes lo constituye la compleja red de comunicación subalterna a la liberación del 1,2-*sn*-diacilglicerol (DAG) el cual opera como segundo mensajero (1). La actividad hidrolítica de la fosfolipasa C (PL-C), responsable de la producción del DAG (Figura 1), está acoplada al disparo de la señal iniciada por la unión de un ligando (hormona o factor de crecimiento) a su receptor correspondiente ubicado en la membrana celular. Además del DAG, el otro producto de la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) es el inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual promueve la liberación de calcio de los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico. De esta manera, se genera una señal bifurcada en función de los circuitos que responden al DAG y al aumento de los niveles intracelulares de calcio. El DAG, por su parte, activa alostéricamente a ciertas proteínas, como la proteína cinasa C (PKC), al unirse a un tipo especial de receptores constituidos por los dominios C1 que funcionan como blancos del DAG. Como consecuencia de esta unión, ocurre una redistribución de la PKC activada a la membrana celular, o nuclear, y también a otros organelos intracelulares (2,3). Dicha translocación genera una actividad biológica específica que varía en función de la ubicación particular de cada PKC activada, ya que mediante este proceso la enzima logra tener acceso a sustratos diferentes. Además de la distinta composición lipídica de estas membranas, el proceso de translocación de la PKC es regulado por la naturaleza química de las cadenas alifáticas del DAG que pueden ser saturadas, monoinsaturadas o poliinsaturadas. Esta pluralidad de DAGs, de los cuales se conocen 50 especies diferentes, se debe a que además del mecanismo ya descrito de la PLC, existen otros mecanismos de producción del DAG, como el que resulta de la acción concertada de la fosfolipasa D y la hidrolasa del ácido fosfatídico (4). Esta diversidad molecular le permite a la célula modular distintas respuestas a la PKC que dependerán de la relación entre el tipo de DAG, la membrana y otros cofactores como el calcio y la fosfatidil serina.



**Figura 1.** Hidrólisis del PIP<sub>2</sub> y producción del DAG y IP<sub>3</sub>



La familia de proteínas cinasas tipo C (PKC) representa el grupo más importante de mediadores de señales iniciadas por la generación del DAG. Sus once miembros están divididos en tres subclases que poseen hacia el extremo carboxilo (COOH) de la proteína el receptor para el ATP (C3) y el receptor catalítico específico para serina o treonina. El sector regulador que contiene los dominios denominados C1 (C1a y C1b) se encuentra hacia el extremo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) de la proteína (Figura 2A). Este sector regulador contiene además un segmento llamado pseudosustrato (PS), el cual en la proteína inactiva ocupa el receptor catalítico y obliga a la proteína a adoptar una conformación cerrada. Mediante un conjunto de acciones que convergen hacia el sector regulador, como la liberación del DAG y su unión con los receptores C1, se estabiliza la forma abierta de la proteína, ocasionando así la salida del pseudosustrato de su posición usual y por ende la activación de la enzima (5). De los tres grupos isoestructurales de la familia de la PKC, las isozimas denominadas “clásicas” y “nuevas” contienen dos receptores mellizos tipo C1 (C1a y C1b) que funcionan como blancos moleculares del DAG. Estructuralmente cada receptor C1, llamados “dedos de zinc” (Figura 2B), contienen seis cisteínas (C) y dos histidinas (H) organizadas en una secuencia  $\text{HX}_{12}\text{CX}_2\text{CX}_{13/14}\text{CX}_2\text{CX}_4\text{HX}_2\text{CX}_7\text{C}$  en donde X representa un residuo de aminoácido variable (6). Los dos átomos de zinc se encuentran coordinados con tres azufres de cisteínas y un nitrógeno de la histidina en forma no consecutiva (Figura 2B). Las isoenzimas “clásicas” ( $\alpha, \beta 1, \beta 2$  y  $\gamma$ ) también poseen un receptor tipo C2 que funciona como blanco específico del calcio, mientras que las isoenzimas “nuevas” ( $\delta, \epsilon, \eta$  y  $\theta$ ) carecen de este receptor y por tanto no están sujetas a la regulación por calcio. Las PKC “atípicas” ( $\xi$  y  $\tau\lambda$ ) contienen una sola región homóloga a los receptores C1 (C1\*) que es insensible al DAG.



**Figura 2.** (A) Estructura primaria de las familias de la PKC. Los segmentos PS, C1 (a y b), y C2 se encuentran hacia el extremo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) de la proteína, mientras que hacia el extremo carboxilo (COOH) se encuentran los segmentos C3 (receptor del ATP) y el receptor catalítico específico para serina o treonina. Las PKC “nuevas” contienen una franja homóloga al receptor C2 (C2') en el extremo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) que es insensible al calcio. (B) Estructura de un “dedo de zinc”.

Además de la familia de la PKC, se han descubierto hasta el momento cinco grupos adicionales de proteínas que contienen regiones homólogas a los segmentos C1 y que por tanto funcionan como blancos del DAG (7,8): (a) La familia del PKD/PKC $\mu$  que aunque funciona como una cinasa semejante a la PKC su dominio catalítico no es homólogo al resto de las PKC y activa a sustratos diferentes; (b) los miembros de la familia RasGRP, que al ser activados por el DAG favorecen la asociación de Ras con el GTP produciendo su estimulación; (c) las chimerinas, proteínas implicadas en procesos de adhesión celular y dinámica del citoesqueleto; (d) las proteínas de tipo munc, que son importantes en la transmisión sináptica de neuronas; y (e) la DAG-cinasa- $\gamma$  que rescinde las señales iniciadas por el DAG.

## 2. LAS REGIONES C1 COMO MODULADORAS DEL CIRCUITO DE SEÑALES DEL DAG

La identificación de múltiples miembros de isozimas de la PKC y el estudio de su función nos ha mostrado que los segmentos C1 son específicos para cada isoenzima y que además no son ni redundantes ni intercambiables. Estas isoenzimas controlan numerosos procesos celulares importantes como proliferación, apoptosis, diferenciación, motilidad celular, etc. Significativamente, en algunos casos, la activación de ciertas isoenzimas resulta en acciones antagónicas. Por ejemplo, la PKC $\delta$  funciona como inhibidora del crecimiento en células NIH 3T3, mientras que la PKC $\delta$  o la PKC $\epsilon$  lo estimulan. Tales efectos antagónicos pueden ser explotados terapéuticamente ya que en lugar de detener un proceso de crecimiento a través de un inhibidor catalítico de una isoenzima promotora, se podrá lograr el mismo efecto estimulando la actividad de la isoforma de acción antagónica.

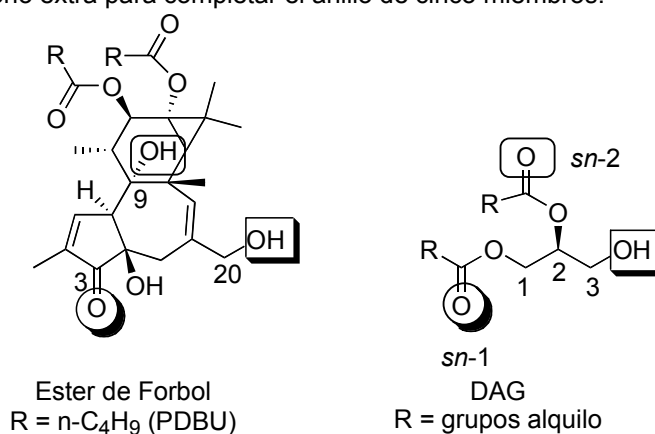
Un grupo diverso de productos naturales ha proporcionado un caudal de información muy importante en cuanto a la identidad de los farmacóforos claves reconocidos por los receptores C1. Estos productos incluyen diterpenos como los ésters de forbol, lactonas macrocíclicas como las briostatinas, poliacetatos como la aplisiatoxina y los alcaloides indólicos tipo teleocidina. Tal abundancia y diversidad de soluciones estructurales que la naturaleza ha encontrado para generar moléculas con excelente afinidad por los receptores C1 ha ayudado a confirmar el papel central que desempeñan estos receptores en la biología de la PKC y de las otras proteínas que contienen receptores similares. Por otra parte, la complejidad estructural de estos productos naturales dificulta la posibilidad de manipular estas moléculas con facilidad. Es por esta razón que nuestro grupo se ha interesado en investigar el potencial del segundo mensajero activador natural de la PKC, el diacilglicerol (DAG), como armazón central sobre el cual se puedan diseñar moléculas parecidas al DAG, pero con un grado de complejidad mayor y aún fáciles de sintetizar.

## 3. MODELO INTUITIVO DE LOS RECEPTORES C1 EN FUNCIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL DAG. DISEÑO DE ESTRUCTURAS RÍGIDAS DEL DAG.

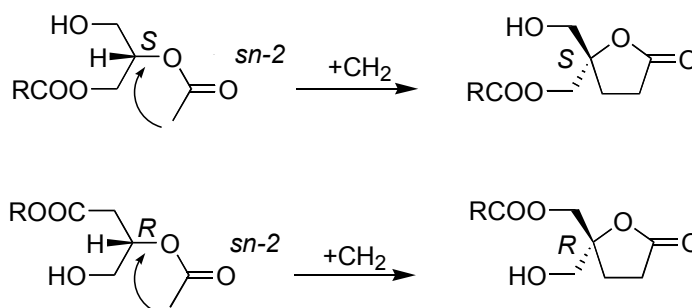
*3.1. Selección de lactonas pentacíclicas como plataformas del DAG.* Mucho antes de que la estructura de los receptores C1 fuera conocida, varios modelos intentaban explicar las diversas interacciones hidrofílicas y estereoespecíficas entre el DAG y estos receptores, especialmente aquellas concernientes a los enlaces por puente de hidrógeno (puente-H) (9). Todos los modelos coincidían con la existencia de por lo menos tres importantes grupos de farmacóforos que podrían interactuar con las regiones C1 a través de estos puentes de Hidrógeno. En el caso

del DAG, los grupos carbonilos  $C_1$  (*sn*-1) y  $C_2$  (*sn*-2) se consideraban como aceptores de puente-H, mientras que el grupo OH en el carbono  $C_3$  actuaba como donador de puente-H. En el caso de los ésteres de forbol, los grupos carbonilo en  $C_3$  y el OH en  $C_9$  funcionan como aceptores de puente-H, y el OH en  $C_{20}$  como donador de puente-H (Figura 3) (10). Después de que la estructura cristalográfica del 13-acetato de forbol ubicado en la región C1b de la PKC $\delta$  fue resuelta, se encontró que este modelo era bastante aproximado, sobre todo en relación al papel del OH en el  $C_{20}$  y el carbonilo en el  $C_3$  (11). Sin embargo, a pesar de la equivalencia ideal entre los grupos farmacóforos del DAG y de los ésteres de forbol, los modelos no lograban explicar la potencia mil veces mayor de estos últimos en relación al DAG (12,13).

Con el propósito de encontrar la naturaleza de estas diferencias, se diseñaron moléculas cíclicas que incluyeran el esqueleto fundamental del DAG partiendo de la estructura misma del isómero activo, S-DAG (14), evitando así la anticipada pérdida de afinidad que experimenta el DAG al ligarse a su receptor, debido al mayor gasto entrópico causado por la flexibilidad del sistema 1,2,3-propanotriol. Las  $\gamma$ -butirolactonas 4,4-sustituidas demostraron la capacidad de sobreponer la deficiencia de dicho gasto entrópico, por lo cual fueron seleccionadas entre otras opciones como la plataforma ideal para la síntesis de estructuras cíclicas del DAG (15). Esta molécula, denominada genéricamente como DAG-lactona, se concibe al conectar el grupo O-acilo en la posición *sn*-2 sobre el mismo carbono  $C_2$  (Figura 4). Tal operación requiere de la adición de un carbono extra para completar el anillo de cinco miembros.

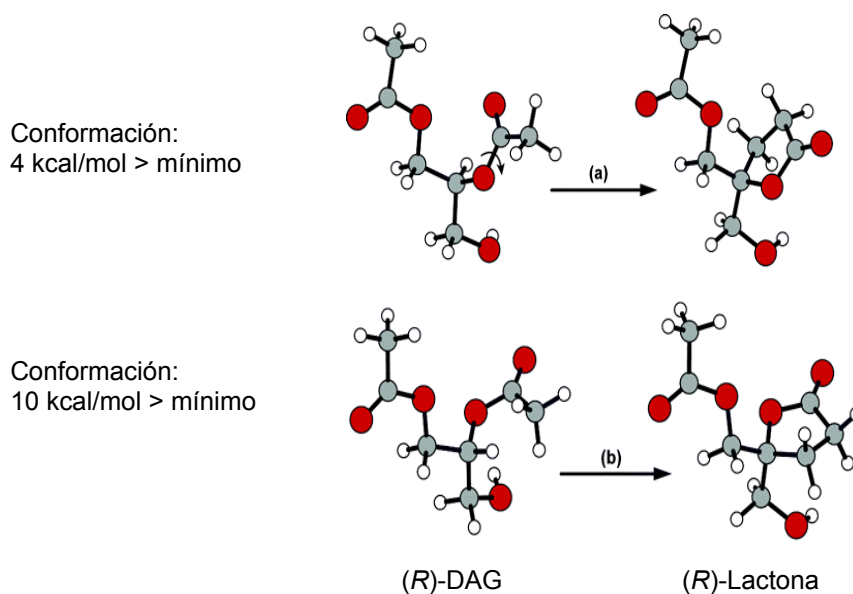


**Figura 3.** Correspondencia entre grupos farmacóforos del DAG y el éster de forbol.



**Figura 4.** Formación de DAG-lactonas a partir de ambos isómeros del DAG.

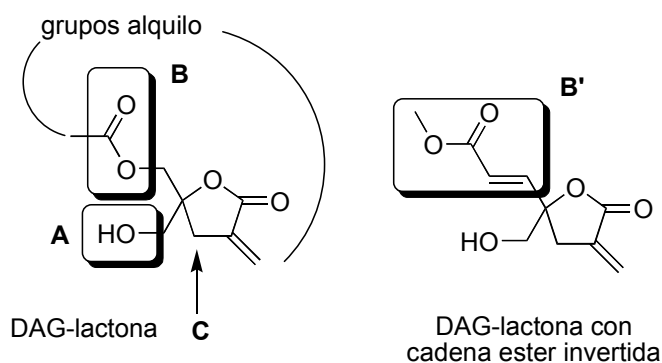
3.2. *Estereoquímica de las plataformas de DAG-lactonas.* Contrariamente al DAG, cuyo isómero activo es el *S*, para las DAG-lactonas la capacidad de activar la PKC reside exclusivamente en el isómero *R*. Cuando cada enantiómero del DAG se sobrepone al forbol, con la intención de lograr una sobreposición óptima de los grupos farmacóforos entre ambas moléculas, el gasto energético para que el *S*-DAG alcance tal conformación es sólo de 4 kcal/mol por encima del valor de la conformación más estable, mientras que para el *R*-DAG el gasto es de 10 kcal/mol (16). Esto explica el porqué de la preferencia de la PKC por el isómero *S*-DAG (14). Sin embargo, se puede observar que en la generación de la *S*-DAG-lactona a partir de su correspondiente *S*-DAG, la orientación del grupo carbonilo en el anillo de la lactona cambia durante el proceso, resultando así en una plataforma inactiva (Figura 5a). Por el contrario, cuando la misma operación se realiza a partir del *R*-DAG (Figura 5b) la disposición de todos los grupos farmacóforos permanece inalterada. De tal manera que la generación del anillo cancela efectivamente el mayor gasto energético asociado con la conformación de la *R*-DAG-lactona equivalente a la del forbol y explica porqué la PKC muestra exclusividad por este enantiómero. Esta preferencia fue experimentalmente confirmada al constatar que las *R*-DAG-lactonas demostraron una mayor afinidad por la PKC (Tabla I). Los valores de afinidad expresados en función de la constante  $K_i$  reflejan una mayor afinidad por la PKC a medida que este número disminuye. El valor de la  $K_i$  expresa la afinidad del compuesto ensayado en función a su habilidad en desplazar al [ $^3\text{H}$ -20]-12,13-dibutirato de forbol (PDBU) de su receptor (PDBU, Figura 3).



**Figura 5.** Estereoquímica del proceso de formación de la estructura cíclica del DAG. La ciclación procede del mismo modo que se indica en la Figura 4, bien a partir del isómero (*S*)-DAG (a), o a partir del isómero (*R*)-DAG (b). Se puede observar que la orientación del carbonilo sn-2 de la lactona no cambia de posición cuando la ciclación parte del isómero (*R*)-DAG (b).

3.3 *Disposición y naturaleza de las cadenas alquílicas en las DAG-lactonas.* La Tabla I ilustra la importancia de la ubicación de las cadenas alquílicas en el núcleo de las DAG-lactonas. Los compuestos **1** y **2** representan las DAG-lactonas estructuralmente más simples con un solo

grupo acilo correspondiente al ácido mirístico. En este tipo de DAG-lactona solamente existen pequeñas diferencias en la actividad al variar la naturaleza del ácido graso, por ejemplo entre el ácido mirístico y oléico, en favor del ácido monoinsaturado. Por el contrario el cambio de la posición *sn*-1 a la posición *sn*-2 de la cadena alifática larga, para formar un grupo  $\alpha$ -alquilideno, produjo un aumento sustancial en la afinidad por la PKC de 5 a 8 veces como lo ilustran los compuestos **3-6** (Tabla 1). Esta simple estrategia dio origen a la DAG-lactona **4** que es 20 veces más potente que su correspondiente DAG, 1-oleoil-2-acetil-*sn*-glicerol ( $K_i = 230$  nM) (17). Cuando las cadenas alifáticas son lineales, la afinidad de las DAG-lactonas por la PKC parece ser independiente de la estereoquímica *E* o *Z* del grupo  $\alpha$ -alquilideno (compuestos **3-6** (Tabla 1)). Por el contrario, cuando éstas son ramificadas, el isómero *Z* muestra una afinidad dos veces superior a la del isómero *E* (compuestos **7-10** (Tabla 1)) (18,19). Muchas de estas diferencias se explicaron más tarde a la luz del conocimiento de la estructura molecular del receptor C1 (11).

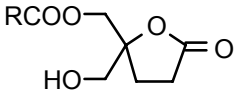
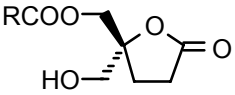
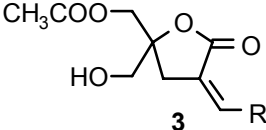
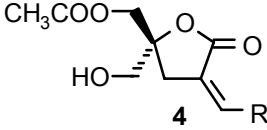
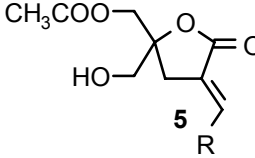
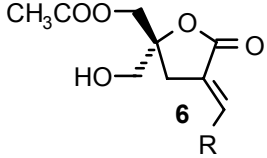
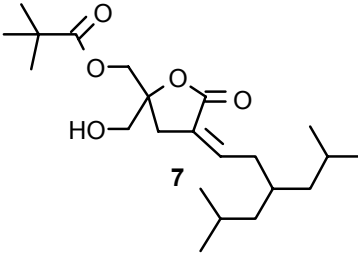
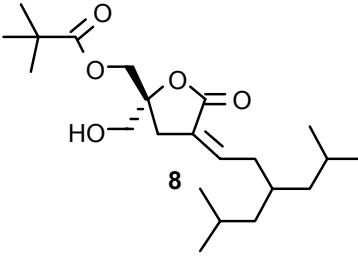
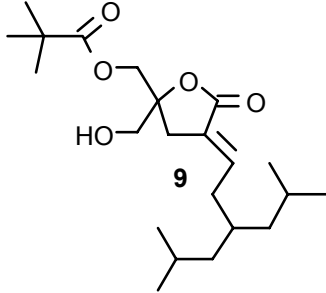
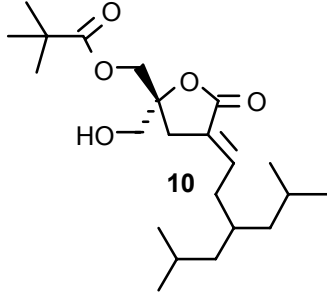


**Figura 6.** Disección de las DAG-lactonas por regiones y relación estructura-actividad. Las regiones discutidas en el texto aparecen dentro de los rectángulos correspondientes.

**3.4. Reemplazo de grupos isostéricos en las DAG-lactonas.** Cambios mínimos en la región A (Figura 6) reducen la afinidad de las DAG-lactonas por la PKC. El homólogo superior ( $C_4$ -hidroxietilo) del compuesto **4** de la Tabla I resultó tener una afinidad por la PKC 100 veces menor (20). También la región B es muy sensible a cambios y requiere de una función éster intacta. Por ejemplo, el reemplazo del grupo éster por cetona, cetona- $\alpha,\beta$ -insaturada, amida, hidroxamida (21,22) y aún un tioéster (23) reduce la afinidad por la PKC. La ubicación del grupo éster también es crítica, ya que al aumentar la distancia entre éste y el anillo de la lactona, o simplemente al intercambiar el oxígeno del éster con el carbonilo, la afinidad por la PKC decae (24). La distancia entre el carbonilo del éster y el anillo de la lactona parece ser determinante ya que los ésteres invertidos sí mantienen un buen grado de afinidad por la enzima, especialmente cuando el éster se modifica como un  $\alpha,\beta$ -insaturado (región B' Figura 6) (25). La región C permite muy pocos cambios. Por ejemplo, ambos epímeros del  $C_3$ -OH secundario resultaron inactivos (26). Esto indica que estos grupos OH no logran conectarse con el receptor a través de puente-H. Sin embargo, el reemplazo del carbono  $C_3$  por un oxígeno resultó en una molécula efectiva nueva de tipo dioxolano (27); esto indica que esta posición sí puede unirse al receptor como aceptor de puentes de Hidrógeno. Por el contrario, la presencia de grupos alquilos en la posición  $C_3$ , inclusive grupos pequeños como metilos, no es tolerada (28). La unión de las cadenas alifáticas del éster y del grupo  $\alpha$ -alquilideno genera unos compuestos macrocíclicos interesantes muy

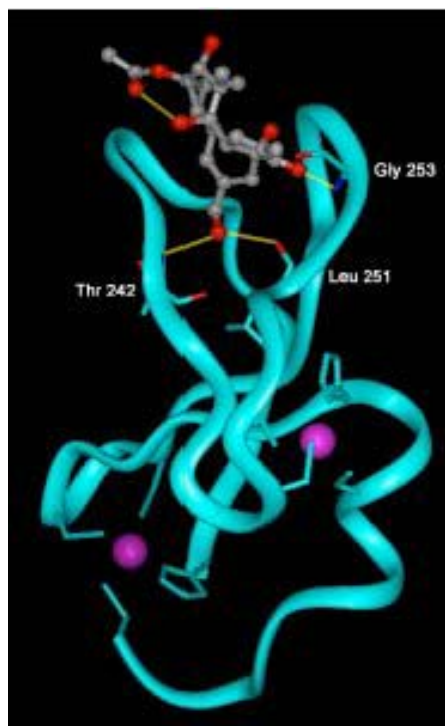
activos y cuya actividad depende del tamaño del anillo (29). El compuesto macrocíclico más potente tiene una cadena de 14 carbonos, mientras que aquellos con cadenas menores de 10 carbonos resultaron ser de menor potencia. Para estos macrocíclicos también la estereoquímica del doble enlace refleja la misma preferencia por el isómero Z. Finalmente, el carbonilo de la lactona también es irremplazable. El cambio del anillo de la lactona por una lactama, ciclopentanona o tiolactona reduce la afinidad por la PKC (21, 23).

**Tabla I.** Valores de  $K_i$  (nM) para los ligandos **1-10** como inhibidores competitivos del PDBU por la  $\text{PKC}\alpha$

Racemato	$K_i$	Enantiómero-( <i>R</i> )	$K_i$
 <p><b>1</b></p> <p>R = <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}</math></p>	138±24	 <p><b>2</b></p> <p>R = <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}</math></p>	96±3.1
 <p><b>3</b></p> <p>R = <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7</math></p>	24±2.87	 <p><b>4</b></p> <p>R = <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7</math></p>	12±0.40
 <p><b>5</b></p> <p>R = <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7</math></p>	28±2.19	 <p><b>6</b></p> <p>R = <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7</math></p>	13±1.30
 <p><b>7</b></p>	2.9±0.35	 <p><b>8</b></p>	1.4±0.20
 <p><b>9</b></p>	4.5±0.49	 <p><b>10</b></p>	2.4±0.34

#### 4. ESTUDIO DE LAS DAG-LACTONAS EN FUNCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES C1.

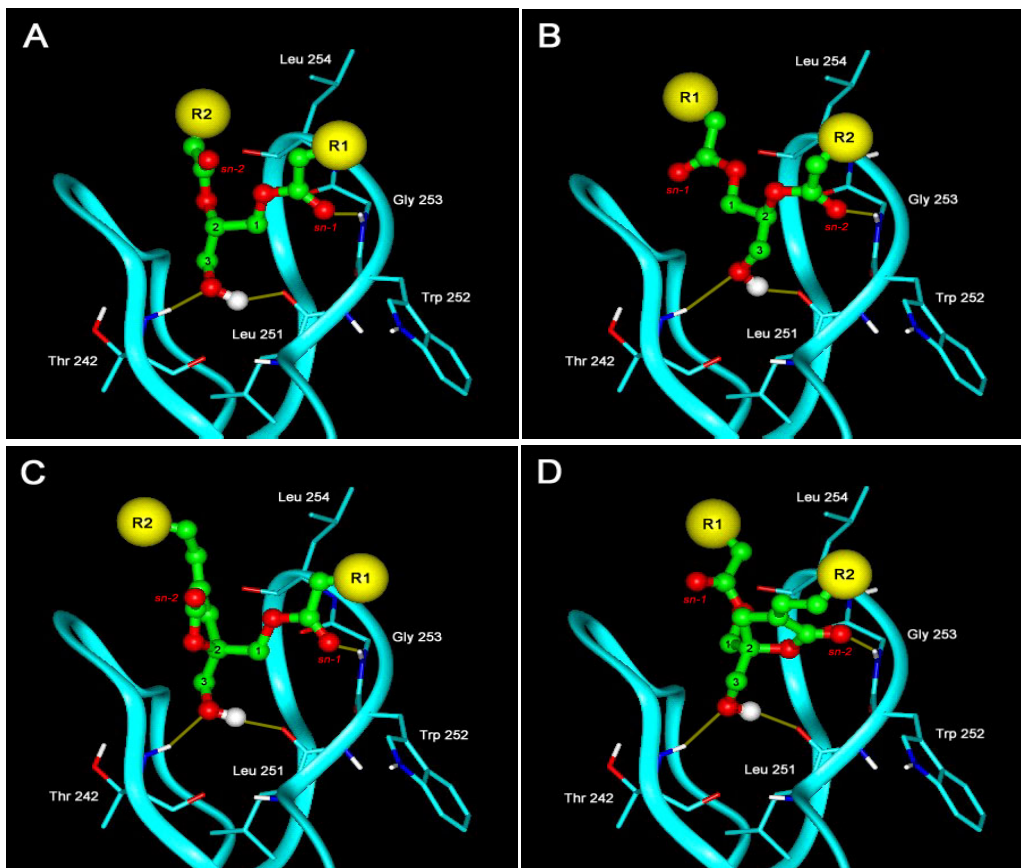
**4.1. Estructura cristalográfica del receptor C1.** Con el advenimiento de la estructura de rayos X del 13-acetato de forbol ligado al receptor C1b de la isoenzima PKC $\delta$  (11), se lograron entender muchos de los resultados empíricos sobre la relación estructura-actividad, tanto para los ésteres de forbol y otros ligandos naturales, como para el DAG y las DAG-lactonas. La estructura confirmó la importancia de los puentes-H para el grupo carbonilo en el C<sub>3</sub> del forbol, el cual en combinación con el OH en el C<sub>4</sub> se une al NH y al carbonilo de la Gly253. El OH en el C<sub>20</sub> del forbol aparece por su parte aceptando un puente-H de la Thr242 y además participa como donante en un enlace bifurcado entre los grupos carbonilos de la Thr242 y la Leu251 (Figura 7). Sorprendentemente, el OH en el C<sub>9</sub>, que es un farmacóforo indispensable (30), no se ve involucrado con la proteína y más bien aparece formando un puente de Hidrógeno intramolecular con el carbonilo del éster en el C<sub>13</sub>. Un modelo fundamentalmente idéntico se describió por RMN para el receptor C1b de la PKC $\gamma$  (31). Si se considera que el papel del OH en el C<sub>9</sub> es realmente importante, es posible que este grupo interactúe con las moléculas de agua organizadas en la interfase lipídica, o con las cabezas de los fosfolípidos que se encuentran en la membrana del complejo “forbol-C1b-membrana” (32). Tanto por RMN como por modelado molecular (32) se ha podido constatar que las dos cadenas  $\beta$ -antiparalelas del receptor C1b son bastante flexibles, especialmente entre los residuos 6-14 y 23-29 que es donde precisamente se insertan tanto el DAG como los ésteres de forbol.



**Figura 7.** Estructura del 13-acetato de forbol ligado al receptor C1b de la isoenzima PKC $\delta$  (código pdb 1PTR). Los enlaces puente H entre el forbol y los aminoácidos Thr242, Leu251 y Gly253 aparecen en color amarillo. También en el mismo color se señala el enlace intramolecular entre el OH en el C<sub>9</sub> y el carbonilo en el C<sub>13</sub> del forbol.

**4.2 Modo de enlace sn-1 versus sn-2.** Utilizando métodos de apareamiento molecular con varios programas como AutoDock 2.4, FLexX o GOLD (33-35), es posible reproducir con bastante fidelidad la estructura de rayos X del complejo 13-acetato de forbol/C1b $\delta$ . Cuando en este

modelo se reemplaza la molécula del forbol por el DAG, o las DAG-lactonas, se pueden identificar las mismas redes hechas por puente-H características del forbol, con la particularidad de que tanto para el DAG como para la DAG-lactonas existen dos modos equivalentes de encajar la molécula en la cavidad del receptor. En ambas modalidades aparece involucrado solamente uno de los dos carbonilos, quedando el otro libre como en el caso del OH en el C<sub>9</sub> del forbol. Debido a que tanto para el DAG como para las DAG-lactonas los carbonilos no son equivalentes, estas modalidades de unión con el receptor se denominan *sn-1* o *sn-2* de acuerdo con el carbonilo que aparece formando un puente-H con el receptor (Figura 8). Cuando se ensayaron DAG-lactonas carentes de uno de los dos carbonilos, esencialmente convirtiendo la función éster en éter, los compuestos tuvieron una afinidad por PKC 100 veces menor (36). Esto indica que uno de los dos carbonilos del DAG, o de las DAG-lactonas, funciona de manera equivalente al grupo OH en el C<sub>9</sub> del forbol, posiblemente en la interfase lípido-proteína.



**Figura 8.** Unión por medio de puentes de Hidrógeno de DAG (A, B) y DAG-lactonas (C,D) con el receptor C1b $\delta$  en ambas modalidades *sn-1* (izquierda) y *sn-2* (derecha). Los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> corresponden a cadenas alifáticas lipofílicas.

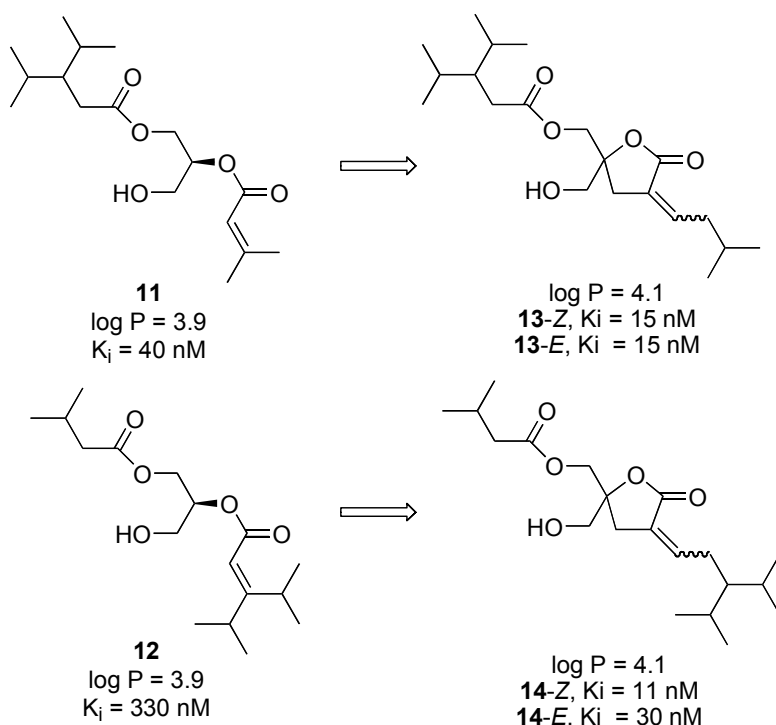
**4.3 Diseño y construcción de DAG-lactonas con cadenas ramificadas y relación con el valor lipofílico ( $\log P$ ).** Tanto para los ésteres de forbol como para el DAG y las DAG-lactonas, las cadenas alifáticas lipofílicas no parecen alterar el modo de encaje de la molécula en el receptor.



Sin embargo, pueden aumentar la afinidad por el mismo como consecuencia de interacciones favorables con las cadenas alifáticas de aminoácidos vecinos y de lípidos en la membrana. En los dos modos de enlace descritos (*sn-1* y *sn-2*) se puede apreciar que aunque en ambas modalidades la red de puentes de Hidrógeno permanece intacta, los grupos  $R_1$  y  $R_2$  de las cadenas alifáticas del DAG, o de las DAG-lactonas, se encuentran orientados en direcciones opuestas. Si consideramos que a lo largo de las dos cadenas  $\beta$ -antiparalelas del receptor C1b $\delta$  se encuentran aminoácidos con grupos lipofílicos, tales como Met239, Pro241, Phe243, Leu250, Trp252 y Leu254, es posible que una orientación particular en *sn-1* o *sn-2* permita que las cadenas  $R_1$  y  $R_2$  puedan interactuar de una manera óptima con el receptor. Por esta razón, se escogieron cadenas alifáticas ramificadas que imitaran las cadenas de aminoácidos como leucina (Leu) y valina (Val). Estas cadenas se diseñaron simétricas, como el 2,3,4-trimetilpentano y 2,4,6-trimetilheptano, con el fin de aumentar la probabilidad de producir contactos entre la proteína y los grupos  $R_1$  y  $R_2$  de las cadenas alifáticas del DAG o las DAG-lactonas respectivamente (Tabla I, compuestos 7-10). Inicialmente el valor lipofílico entre  $R_1$  y  $R_2$  para las DAG-lactonas se mantuvo constante y próximo al valor del log P del 1-miristoil-2-acetilglicerol (log P = 5.25) que sirvió como el punto de referencia para un DAG activo. Como era de esperarse, se determinó la existencia de una correlación parabólica entre el valor de la afinidad expresado como log  $1/K_i$  y log P que permitió encontrar el valor óptimo del balance hidrofóbico/hidrofílico de la molécula (18). El valor de log P (coeficiente de partición octanol/agua) nos da una idea del balance hidrofóbico/hidrofílico de la molécula, el cual se puede calcular empíricamente mediante el programa KOWWIN 1.63 que se basa en la suma de fragmentos moleculares que contribuyen positivamente o negativamente al valor del log P (37). Aunque una de las funciones principales de los grupos  $R_1$  y  $R_2$  es la de impartir un valor adecuado de log P para facilitar la concentración del ligando en la membrana, es posible que un valor excesivo de log P sea capaz de ocultar o minimizar las interacciones entre el ligando y los aminoácidos hidrofóbicos presentes en los receptores C1. De esta forma la molécula ideal debe tener un valor mínimo necesario de log P para garantizar su ubicación en la membrana y que a su vez le permita revelar interacciones específicas con los diferentes aminoácidos característicos de las distintas isoenzimas de la PKC. El empleo de cadenas ramificadas ayuda doblemente con este propósito, ya que para un número igual de carbonos la ramificación disminuye el valor del log P con respecto a la cadena lineal (37).

**4.4. Enlace *sn-1* versus *sn-2* en DAGs.** El éxito logrado con las cadenas ramificadas en las DAG-lactonas nos obligó a considerar la incorporación de cadenas iguales en la molécula más sencilla del DAG para estudiar sus propiedades (38). Esto era importante porque todas las moléculas conocidas del DAG, como el 1,2-dioctanoil-*sn*-glicerol (diC8), el 1-oleoil-2-acetil-*sn*-glicerol (OAG) y el 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol (dioleína), solamente presentan cadenas alifáticas lineales. Con base a las dos alternativas de enlace descritas (*sn-1* y *sn-2*), en donde las cadenas alifáticas aparecen dirigidas en direcciones opuestas (Figura 8 A,B), anticipábamos que las diferencias entre estas moléculas nos darían alguna información sobre su modo preferido de enlace. Este ejercicio obligaba a disminuir el valor de log P al mínimo para así aumentar las diferencias entre las modalidades *sn-1* y *sn-2* que dependerían de la interacción específica de  $R_1$  y  $R_2$  con las cadenas alifáticas de los aminoácidos presentes en las cadenas  $\beta$  del receptor C1. El valor de log P para algunas de estas moléculas se redujo sustancialmente para aproximarlos al valor del éster de forbol, PDBU (log P = 3.4) que es mucho más bajo que el valor del DAG, diC8 (log P = 5.3). Las dos moléculas de DAG (**11** y **12**) diseñadas con un valor de log P igual a 3.9 fueron eficientemente discriminadas por la isoenzima PKC $\alpha$  en cuanto a su modo de enlace (Figura 9). El DAG **11** mostró una afinidad 8 veces superior al isómero **12** con sólo cambiar la disposición

*sn*-1 o *sn*-2 de las cadenas (38). Se logró una afinidad excepcional para el DAG **11** ( $K_i = 40$  nM) a pesar de una reducción del valor de log P en 1.4 unidades logarítmicas en relación al DAG común, diC8. Los modelos de apareamiento molecular de los DAG **11** y **12** con los receptores C1a y C1b de la isoenzima PKC $\alpha$  permitieron calcular no solamente la estabilidad de los puentes-H en las modalidades *sn*-1 y *sn*-2, sino también las interacciones hidrofóbicas entre ligando y receptor, las cuales fueron estimadas calculando la diferencia de superficie accesible por un solvente externo entre el receptor libre y ocupado (38). Este valor se encuentra relacionado con el componente no polar de la energía de solvatación (es decir el efecto hidrofóbico) en donde el área del receptor que está oculta bajo el ligando nos permite estimar la fuerza del enlace hidrofóbico. En la Tabla 2 se puede apreciar que los puentes de Hidrógeno son más estables (valores menores) cuando el DAG se une en *sn*-1, especialmente para el receptor C1a. Cuando adicionalmente el grupo ramificado de mayor tamaño se encuentra próximo al carbonilo *sn*-1, como es el caso del DAG **11** ( $K_i = 40$  nM), el tamaño del área sepultada que resulta de esta unión también es mayor, reforzando de esta manera la mayor estabilidad de la red de puente-H característica de la modalidad *sn*-1. Si por el contrario el grupo ramificado de mayor tamaño está ubicado adyacente al carbonilo *sn*-2, como en el caso del DAG **12** ( $K_i = 330$  nM), aunque la red de puente-H es más estable en *sn*-1, la magnitud del área oculta es mayor en la modalidad *sn*-2, y como resultado de este antagonismo la afinidad del DAG **12** es menor. El compuesto **11** es quizás el DAG más potente que se conoce. Este compuesto es capaz de activar a la PKC $\alpha$  ( $EC_{50} = 9.5 \pm 0.8$   $\mu$ M) con una mayor potencia que el diC8 ( $EC_{50} = 16.4 \pm 2.9$   $\mu$ M). Más aún, en cultivos celulares, el DAG **11** logró inducir la translocación de la molécula entera de PKC $\alpha$  a la membrana celular, hecho que no se produce con el diC8 en condiciones similares (39).



**Figura 9.** Comparación entre DAG y DAG-lactonas con cadenas ramificadas.

**4.5. Enlace *sn*-1 versus *sn*-2 en DAG-lactonas.** Las DAG-lactonas equivalentes a los DAG **11** y **12** fueron sintetizadas para contrastar el modo de unión entre ambas clases de ligandos, y además para lograr ligandos con mayor potencia debido a que la lactonización supone una reducción del costo entrópico.

Comparando las DAG-lactonas **13** (*E/Z*) y **14** (*E/Z*) con sus DAG progenitores respectivos, **11** y **12** (Figura 9) con cadenas ramificadas iguales, se encuentra que la ventaja entrópica (33 veces mayor) se manifiesta únicamente en la transformación **12** → **14**. Por el contrario, la lactonización del DAG más potente **11** → **13** se tradujo solamente en un aumento de afinidad de 2.5 veces. Esto significa que las cadenas alifáticas son capaces de dirigir la unión de las DAG-lactonas de manera diferente al DAG. Es decir, cuando la disposición de las cadenas es óptima para el DAG, la misma disposición no lo es para la DAG-lactona y viceversa. Un estudio similar al que aparece en la Tabla 2 con las DAG-lactonas **13** y **14**, concluye que el modo de unión que produce el arreglo más estable por los puente-H es el *sn*-2 (involucrando el carbonilo de la lactona, Figura 8 D), y que en el mismo sentido, cuando la cadena ramificada de mayor tamaño se encuentra adyacente a este carbonilo, la unión con el receptor resulta ser más estable como en el caso de la DAG-lactona **14**. Por el contrario, el modo preferido *sn*-2 de las DAG-lactonas es antagonizado con la ubicación inadecuada de la cadena ramificada de mayor tamaño adyacente al grupo carbonilo *sn*-1, tal como sucede con la DAG-lactona **13**. La conclusión más importante de este ejercicio es que si bien los DAG y las DAG-lactonas difieren en cuanto a su preferencia por el modo de unión *sn*-1 o *sn*-2, esta preferencia es fuertemente modulada por el tamaño y la naturaleza de los grupos funcionales presentes en las cadenas alifáticas correspondientes. Este tipo de estudio también aclaró la preferencia por el isómero Z de las DAG-lactonas con cadenas  $\alpha$ -alquilideno ramificadas. La presencia del doble enlace del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado restringe la rotación de esta cadena con relación al residuo de aminoácido (G253) el cual se encuentra estrictamente conservado en todas las isozimas de la PKC. Esta restricción hace que en función del área oculta el modo de enlace sea menos efectivo para el isómero *E*-**14** con respecto al isómero Z-**14** (Figura 10).

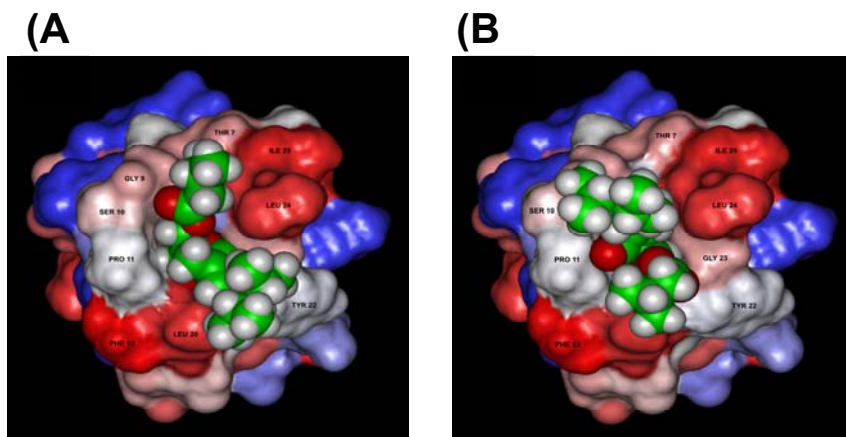
**Tabla 2.** Energía de los puentes de Hidrógeno (kcal/mol) y área oculta para los DAGs **11** y **12** ubicados en los dominios C1 de la PKC $\alpha$

	Puente-H		Área Oculta (Å <sup>2</sup> )	
	C1a	C1b	C1a	C1b
<b>DAGs</b>				
<b>11</b> ( <i>sn</i> -1)	-120.33	-115.30	547.59	563.74
<b>11</b> ( <i>sn</i> -2)	-61.22	-102.35	533.31	547.11
<b>12</b> ( <i>sn</i> -1)	-119.59	-107.60	548.92	555.47
<b>12</b> ( <i>sn</i> -2)	-87.52	-100.52	553.62	562.27

## 5. FACTORES ADICIONALES QUE AFECTAN LA ESPECIFICIDAD DEL DAG Y LAS DAG-LACTONAS. LA MEMBRANA CELULAR.

Además de la importancia que tienen la diversidad química de los receptores C1 y las cadenas de las DAG-lactonas en los procesos de translocación de la PKC, otras diferencias en el entorno de estos receptores C1 y la composición misma de la membrana celular desempeñan

un papel muy importante en la formación y ubicación del complejo terciario conformado por el ligando, el receptor C1 y la membrana. Adicionalmente, los mismos receptores C1 (C1a y C1b), a pesar de tener estructuras comunes, parecen tener funciones diferentes de acuerdo a cada tipo de isoenzima de que se trate; unos funcionan como receptores propiamente dichos y otros como moduladores en la formación del complejo con la membrana (40). Estudios recientes también han confirmado la preferencia antípoda entre receptores C1a y C1b por los ésteres de forbol y el DAG para ciertas isoenzimas como la PKC $\delta$  (41). La sumatoria de todos estos efectos, que naturalmente dependerán de la composición de las membranas celulares, perinucleares, las del aparato de Golgi y de la mitocondria —en diferentes tipos de células— son los factores que determinarán el destino temporal y la ubicación de la isoenzima activada en un compartimiento celular específico. Estas interacciones moleculares generan de esta manera una contraseña química que dirige a la isoenzima activada a su destino. Al lograrse una ubicación física particular, la isoenzima de la PKC podrá activar sustratos diferentes y por ende la repercusión de su actividad biológica será distinta. En el caso particular de la DAG-lactona **8** (Tabla 1), a pesar de que es capaz de activar *in vitro* igualmente a las isoenzimas  $\alpha$  y  $\delta$  aisladas, en cultivos celulares dirige la translocación exclusiva de la PKC $\alpha$  a la membrana celular y la PKC $\delta$  a la membrana nuclear (42).



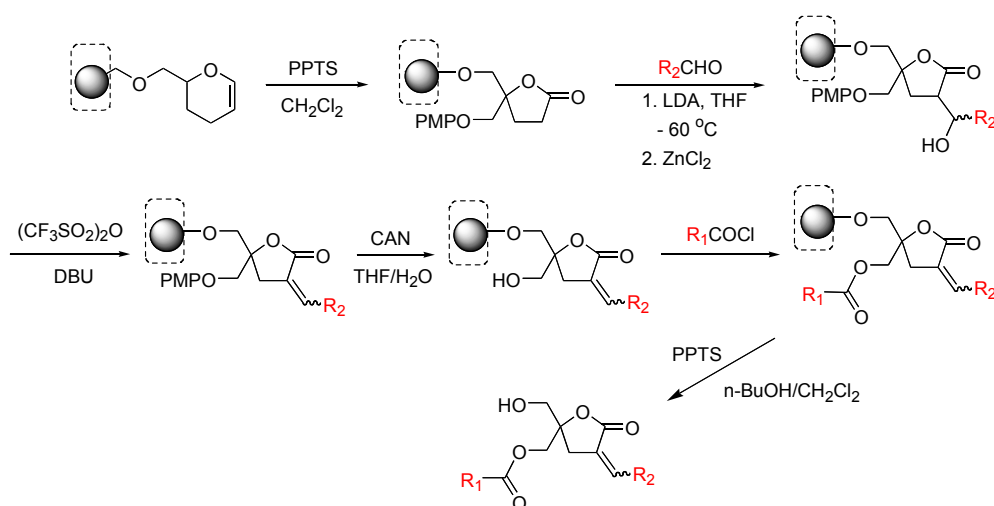
**Figura 10.** Modelos moleculares de las DAG-lactonas Z-14 (A) y E-14 (B) ligadas al receptor C1b de PKC $\alpha$ .

## 6. DESARROLLO DE QUIMIOTECAS DE DAG-LACTONAS

La activación de las isoenzimas de la PKC es indudablemente un paso crucial entre los numerosos procesos celulares que abarcan, desde la regulación de la transcripción genética hasta la modulación de estímulos de secreción acoplados a la liberación de hormonas o neurotransmisores. Sin embargo, la ubicuidad y expresión redundante de esta familia de isoenzimas, sumadas a la multiplicidad de sustratos y a la presencia de otros receptores tipo C1 que también responden al DAG, dificultan la identificación precisa del papel específico de cada isoenzima. Ello se debe a que en muchos experimentos farmacológicos se cuantifica una

respuesta fisiológica terminal que dista a varios pasos de la señal iniciada por la isoenzima activada.

Como complemento al uso de otras técnicas utilizadas para precisar la función de cada isozima, tales como la sobre-expresión empleando adenovirus de isozimas nativas o mutadas (42) y el uso del siRNA para eliminar la expresión de una isozima específica (43), proponemos explorar en forma aleatoria el espacio químico generado por múltiples grupos  $R_1$  y  $R_2$  en las DAG-lactonas con el fin de identificar compuestos que pudieran activar selectivamente a algunas isozimas específicas o a otras proteínas que contengan receptores tipo C1. Tal especificidad resultaría del reconocimiento molecular de los grupos funcionales en las posiciones  $R_1$  y  $R_2$  de las DAG-lactonas por la membrana celular, o por los otros blancos intracelulares ya descritos. De esta manera, los grupos funcionales  $R_1$  y  $R_2$  actuarían como un “código postal” químico capaz de dirigir la translocación específica de la isozima activada. Por otro lado, se lograrían obtener DAG-lactonas capaces de distinguir entre los subgrupos de receptores C1 (C1a y C1b).



**Figura 11.** Método de síntesis en fase sólida desarrollado para explorar el espacio químico de las DAG-lactonas con aldehidos  $R_2\text{CHO}$  (sn-2) y cloruros de ácido  $R_1\text{COCl}$  (sn-1). Reactivos: PPTS (piridina p-tolueno sulfonato), LDA (litio dietilamida), THF (tetrahidrofurano), DBU (1,8-diazabicyclo[4.3.0]undec-7-eno), CAN (nitrato de cerio (IV) y amonio), n-BuOH (butanol).

La concepción de un proceso sintético eficiente en fase sólida, desarrollado en nuestro laboratorio, ha permitido la producción de quimiotecas destinadas a explorar este espacio químico conformado por los grupos  $R_1$  y  $R_2$  de una manera eficiente (Figura 11) (44). A manera de ejemplo, uno de los 96 miembros (H-5) de la quimioteca que aparece en la Figura 12 se identificó como una DAG-lactona que a pesar de ser muy débil como ligando de la  $\text{PKC}\alpha$ , aproximadamente 30 veces menos potente que el compuesto más activo (G-2), mostró una extraordinaria especificidad por el receptor aislado C1b $\delta$  y por la proteína completa RasGRP, la cual posee un solo receptor C1 (Figura 13). Este compuesto representa el primer ejemplo de una molécula capaz de activar un blanco molecular con receptores tipo C1 de una manera específica, no solamente *in vitro*, sino también a nivel celular como lo demuestra la translocación rápida y

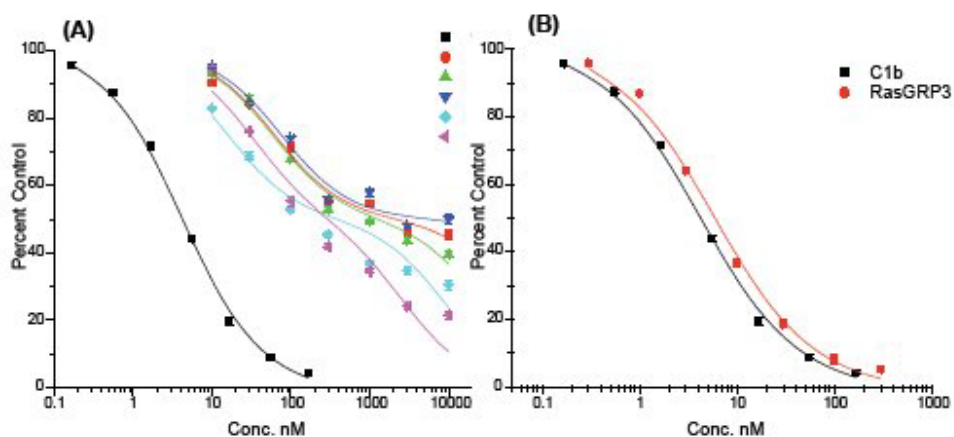
selectiva de la RasGRP que contrasta con la inhabilidad del compuesto de translocar la PKC $\alpha$  (Figura 14) (45). Los ésteres de forbol, por el contrario, son capaces de translocar indistintamente a ambas proteínas. Este ejemplo constituye una demostración de la gran utilidad del uso de “quimiotecas dirigidas” destinadas a explorar el entorno de un blanco molecular conocido y así lograr su translocación específica dentro de la célula en función de los códigos postales conformados por los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>.



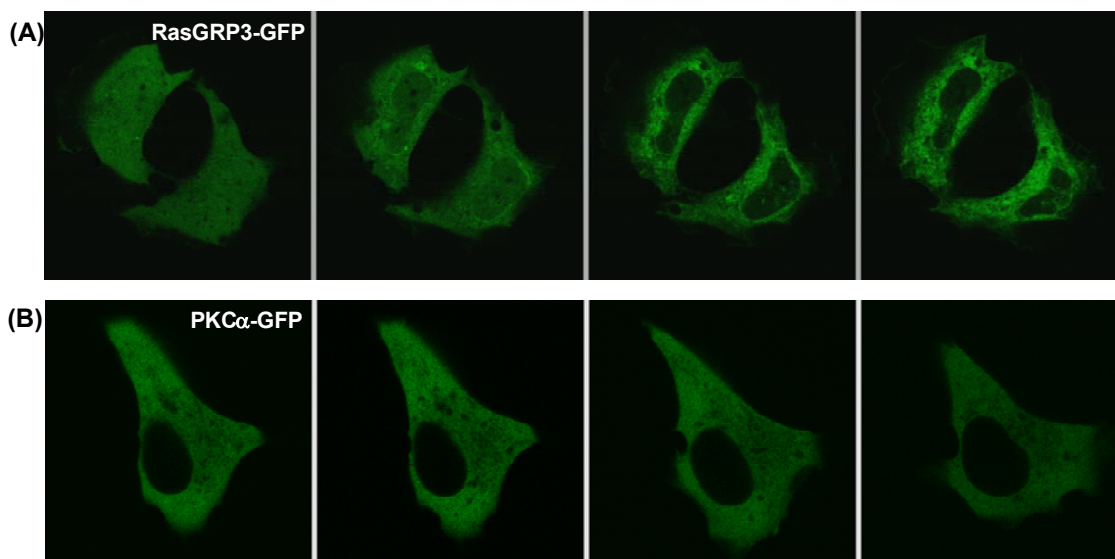
**Figura 12.** Quimioteca tipo de 96 miembros. Las cifras corresponden a los valores de K<sub>i</sub> (nM) para la PKC $\alpha$ . Dentro del círculo se identifica el compuesto H-5.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con el diseño molecular de las DAG-lactonas demuestran claramente la intrínseca relación que existe entre la estructura y la actividad. El uso de  $\gamma$ -butirolactonas 4,4-substituidas (DAG-lactonas) en donde la cadena flexible del agonista natural (diacilglicerol, DAG) ha sido integrada a una estructura cíclica, permitió reducir sustancialmente el costo entrópico asociado con el proceso de unión del DAG con su receptor. A pesar de que los receptores C1 de las diversas isoenzimas de la PKC tienen una arquitectura bastante



**Figura 13.** (A) Curvas de competencia que reflejan la habilidad del compuesto H-5 en desplazar el  $[^3\text{H}]\text{-PDBU}$  del receptor C1b $\delta$  (■) y de otras isoformas (PKC $\alpha$  = ●, PKC $\beta$  = ▲, PKC $\gamma$  = ▼, PKC $\delta$  = ◆, PKC $\epsilon$  = ▲). (B) Curvas de competencia comparando la actividad del compuesto H-5 con el receptor aislado C1b $\delta$  (■) y la proteína RasGRP (●).



**Figura 14.** Visualización de la translocación de la RasGRP (A) y PKC $\alpha$  (B) ligadas a una proteína fluorescente verde (GFP) e inducida por el H-5 (20  $\mu\text{M}$ ) en cultivo de células de cáncer prostático (LNCaP) a distintos intervalos de tiempo. (A) = 0, 1, 5 y 10 min. (B) = 0, 10, 30 y 60 min.

uniforme, la diversidad molecular que existe en el perímetro de estas estructuras permitió la construcción de DAG-lactonas con cadenas alifáticas ramificadas capaces de discriminar entre algunos tipos de receptores C1. Estas modificaciones produjeron DAG-lactonas con afinidad del orden nanomolar por la PKC, aproximando así a la afinidad característica de los ligandos provenientes de fuentes naturales, como los ésteres de forbol. Además de la diversidad

molecular que existe en el perímetro de estos receptores, la naturaleza química variable de las membranas u organelos celulares también funcionan como elementos adicionales de discriminación. Con el propósito de explotar la diversidad de todo este conjunto de espacios químicos, en el entorno de los receptores C1, se desarrollaron quimiotecas de DAG-lactonas con cadenas variables que permitieron discriminar eficientemente entre algunos de los receptores C1, como el del RasGRP. Se propone que estos grupos creados en forma aleatoria funcionan como una especie de “código postal químico” que al ser reconocidos por un compartimiento celular específico pondrán en contacto la isozima activa con diversos sustratos que generarán una respuesta biológica determinada. La facilidad con la cual se generan estas quimiotecas contribuirá al descubrimiento de un universo mayor de estructuras nuevas con actividades farmacológicas diferentes y específicas.

### Referencias

- 1.- Nishizuka, Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein-kinase-C. *Science* 258: 607-614.
- 2.- Neri, L M, P Borgatti, S. Capitani, and A M Martelli. (2002) Protein kinase C isoforms and lipid second messengers: a critical nuclear partnership? *Histol Histopathol* 17: 1311-1316.
- 3.- Martelli A M, I Faenza, A M Billi, F Fala, L Cocco, and L Manzoli (2003) Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? *Histol Histopathol* 18: 1301-1312.
- 4.- Hodking M N, T R Pettitt, M Ashley, R. H Michell, A J Pemberton, and M J Wakelam (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23: 200-204.
- 5.- Newton A C (2001) Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101: 2353-2364.
- 6.- Irie K, O Kentaro, A Nakahara, Y Yanai, H Ohigashi, P A Wender, H Fukuda, H Konishi, and U Kikkawa (1998) Molecular basis for protein kinase C isozyme-selective binding: The synthesis, folding, and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of all protein kinase isozymes. *J Am Chem Soc* 120: 9159-9167.
- 7.- Kazanietz M G, M J Caloca, P Eroles, T Fujii, M L García-Bermejo, M Reilly, and H Wang (2000) Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Biochem Pharmacol* 60: 1417-1424.
- 8.- Brose N and C Rosenmund (2002) Move over protein kinase C, you've got company: Alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115: 4399-4411.
- 9.- Wang S, G W A Milne, M C Nicklaus, V E Marquez, J Lee, and P Blumberg (1994) Protein Kinase C. Modeling of the binding site and prediction of binding constants. *J Med Chem* 37: 1326-1338.
- 10.- Nakamura H, Y Kishi, M A Pajares, and R R Rando (1989) Structural basis of protein kinase-C activation by tumor Promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9672-9676.
- 11.- Zhang G, M G Kazanietz, P M Blumberg, and J H Hurley (1995) Crystal structure of the Cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* 81: 917-924.
- 12.- Kazanietz M G, K W Krausz, and P M Blumberg (1992) Differential irreversible insertion of protein kinase C into phospholipid vesicles by phorbol esters and related activators. *J Biol Chem* 267: 20878-20886.
- 13.- Sharkey N. A and P M Blumberg (1986) Comparison of the activity of phorbol-12-myristate-13-acetate and the diglyceride glycerol-1-myristate-2-acetate. *Carcinogenesis* 7: 677-679.
- 14.- Rando R R and N Young (1984) The stereospecific activation of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 818-823.
- 15.- Marquez V E, K Nacro, S Benzaria, J Lee, R Sharma, K Teng, G W A Milne, B Bienfait, S Wang, N E Lewin, and P M Blumberg (1999) The Transition from a pharmacophore-guided approach to a receptor-guided approach in the design of potent protein kinase C ligands. *Pharmacol Therap* 82: 251-261.
- 16.- Lee J, S Wang, G W A Milne, R Sharma, N E Lewin, P M Blumberg, and V E Marquez (1996) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. ultrapotent protein kinase C ligands based on a chiral 5-disubstituted tetrahydro-2-furanone template. *J Med Chem* 39: 29-35.
- 17.- Kazanietz M G, L B Areces, A Bahador, H Mischak, J Goodnight, J F Mushinski, and P M Blumberg (1993) characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol Pharmacol* 44: 298-307.



- 18.- Nacro K, B Bienfait, J Lee, K-C Han, J-H Kang, S Benzaria, N E Lewin, D K Bhattacharyya, P M Blumberg, and V E Marquez (2000) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). How much structural complexity is necessary for recognition and high binding affinity to protein kinase C? *J Med Chem* 43: 921-944.
- 19.- Kang J-H, M A Siddiqui, D M Sigano, K. Krajewski, N E Lewin, Y Pu, P M Blumberg, J Lee, and V E Marquez (2004) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. Asymmetric synthesis of a chiral (R)-DAG-lactone template as a versatile precursor for highly functionalized DAG-lactones. *Org Lett* 6: 2413-2416.
- 20.- Lee J, S Y Kim, J-H Kang, G Acs, P M Blumberg, and V E Marquez (2004) Conformationally constrained diacylglycerol (DAG) analogs: 4-C-hydroxyethyl-5-O-acyl-2,3-dideoxy-D-glyceropentono-1,4-lactone analogs as protein kinase C (PKC) ligands. *Eur J Med Chem* 39: 69-77.
- 21.- Kang J-H, H-E Chung, S Y Kim, Y Kim, J Lee, N E Lewin, L V Pearce, P M Blumberg, and V E Marquez (2003) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). Effect on protein kinase C (PKC) binding by the isosteric replacement of sn-1 and sn-2 esters in DAG-lactones. *Bioorg Med Chem* 11: 2529-2539.
- 22.- Choi Y, J-H Kang, N E Lewin, P M Blumberg, and V E Marquez (2003) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). Synthesis and protein binding affinity of DAG-lactones bearing an N-hydroxylamide side chain. *J Med Chem* 46: 2790-2793.
- 23.- Kang J-H, N E Lewin, P M Blumberg, and V E Marquez (unpublished).
- 24.- Tamamura H, D M Sigano, N E Lewin, P M Blumberg, and V E Marquez (2004) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. The search for an elusive binding site on protein kinase C through relocation of the carbonyl pharmacophore along the sn-1 side chain of 1,2-diacylglycerol lactones. *J Med Chem* 47: 644-655.
- 25.- Lee J, R Sharma, S Wang, G W A Milne, N E Lewin, Z Szallasi, P M Blumberg, C George, and V E Marquez (1996) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. Ultrapotent protein kinase C ligands based on a chiral 4,4-disubstituted heptono-1,4-lactone template. *J Med Chem* 39: 36-45.
- 26.- Nacro K, J Lee, J J Barchi Jr, N E Lewin, P M Blumberg, and V E Marquez (2002) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). Asymmetric syntheses of (3R)- and (3S)-3-hydroxy-4,4-disubstituted heptono-1,4-lactones as protein kinase C (PK-C) ligands with increased hydrophilicity. *Tetrahedron* 58: 5335-5345.
- 27.- Choi Y, P M Blumberg, and V E Marquez (unpublished).
- 28.- Tamamura H, D M Sigano, N E Lewin, M L Peach, M C Nicklaus, P M Blumberg, and V E Marquez (2004) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). Hydrophobic ligand-protein interactions versus ligand-lipid interactions of DAG-lactones with protein kinase C (PK-C). *J Med Chem* 47: 4858-4864.
- 29.- Kang J-H, S Y Kim, J Lee, V E Marquez, N E Lewin, L V Pearce, and P M Blumberg (2004) Macrocyclic diacylglycerol-bis-lactones as conformationally constrained analogues of diacylglycerol-lactones. Interactions with protein kinase C. *J Med Chem* 47: 4000-4007.
- 30.- Krauter G, C-W Von der Lieth, R Schmidt, and E Hecker (1996) Structure/activity relationships of polyfunctional diterpenes of the tiglane type. A pharmacophore model for protein-kinase-C activators based on structure/activity studies and molecular modeling of the tumor promoters 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate and 3-O-Tetradecanoylgingerol. *Eur J Biochem* 242: 417-427.
- 31.- Xu R X, T Pawelczyk, T-H Xia, and S C Brown (1997) NMR structure of a protein kinase C- $\gamma$  phorbol binding domain and study of protein lipid micelle interactions. *Biochemistry* 36: 10709-10717.
- 32.- Hritz J, J Ulicny, A Laaksonen, D Jancura, and P Miskovsky (2004) Molecular interaction model for the C1b domain of protein kinase C- $\gamma$  in the complex with its activator phorbol-12-myristate-13-acetate in water solution and lipid bilayer. *J Med Chem* 47: 6547-6555.
- 33.- Morris G M, D S Goodsell, R Huey, and J A Olson (1996) Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *J Comput Aid Mol Des* 10: 293-304.
- 34.- FlexX and SYBYL are products of Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2913 ([www.tipos.com](http://www.tipos.com)).
- 35.- Jones G, P Willett, and R C Glen (1995) Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* 245: 43-53.
- 36.- Benzaria S, B Bienfait, K Nacro, S Wang, N E Lewin, M Beheshti, P M Blumberg, and V E Marquez (1998) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). The indispensable role of the sn-1 and sn-2 carbonyls in the binding of DAG-lactones to protein kinase C (PK-C). *Bioorg Med Chem Lett* 8: 3403-3408.
- 37.- Meylan W M and P H Howard (1995) Atom fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci* 84: 83-92 (*KOWWIN 1.63* Syracuse Research Corp. 1995).

- 38.- Sigano D M, M L Peach, K Nacro, Y Choi, N E Lewin, M C Nicklaus, P M Blumberg, and V E Marquez (2003) Differential binding modes of diacylglycerol (DAG) and DAG lactones to protein kinase C (PKC). *J Med Chem* 46: 1571-1579.
- 39.- Nacro K, D M Sigano, S Yan, M C Nicklaus, L L Pearce, N E Lewin, S H Garfield, P M Blumberg, and V E Marquez (2001) An optimized protein kinase C activating diacylglycerol. *J Med Chem* 44: 1892-1904.
- 40.- Bogi K, P S Lorenzo, Z Szallasi, P Acs, G S Wagner, and P M Blumberg (1998) Differential selectivity of ligands for the C1a and C1b phorbol ester binding domains of protein kinase C $\delta$ : possible correlation with tumor-promoting activity. *Cancer Res* 58: 1423-1428.
- 41.- Stahelin R V, M A Digman, M Medkova, B Ananthanarayanan, J D Rafter, H R Melowic, and W Cho (2004) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C $\delta$ . *J Biol Chem* 279: 29501-29512.
- 42.- Garcia-Bermejo, M L, F C Leskow, T Fujii, Q Wang, P M Blumberg, M Ohba, T Kuroki, K-C Han, J Lee, V E Marquez, and M G Kazanietz (2002) Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKC. *J Biol Chem* 277: 645-655 (published erratum appears in *J Biol Chem* 2004, 279: 23846).
- 43.- Irie N, N Sakai, T Ueyama, T Kajimoto, Y Shirai, and N Saito (2002) Subtype- and species-specific knockdown of PKC using short interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 738-743.
- 44.- Duan D, N E Lewin, D M Sigano, P M Blumberg, and V E Marquez (2004) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. A solid-phase method of synthesis of diacylglycerol lactones as a prelude to a combinatorial approach for the synthesis of protein kinase C isozyme-specific ligands. *J Med Chem* 47: 3248-3254.
- 45.- Pu Y, N A Perry, D Yang, N E Lewin, N Kedei, D C Braun, S H Choi, P M Blumberg, S H Garfield, J C Stone, D Duan, and V E Marquez (2005) A novel diacylglycerol lactone shows marked selectivity in vitro among C1 domains of PKC isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  as well as selectivity for RasGRP compared to PKC. *J Biol Chem* (in review).

## **DISEÑO MOLECULAR DE LACTONAS DE DIACILGLICEROL (DAG- LACTONAS) COMO ACTIVADORES ESPECÍFICOS DE ISOENZIMAS DE LA PROTEÍNA CINASA C Y DE OTRAS PROTEÍNAS CON RECEPTORES SIMILARES**

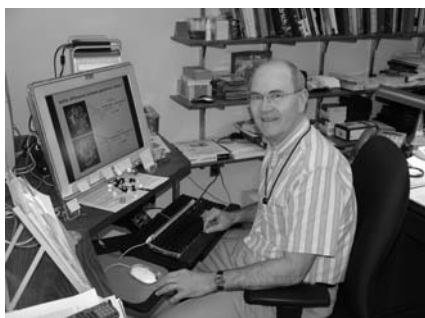
### **Resumen**

El papel central que desempeña la proteína cinasa C (PKC) en los circuitos de información celular la destaca como un blanco terapéutico importante para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. Mediante el uso de una serie de  $\gamma$ -butirolactonas 4,4-substituidas (DAG-lactonas), en donde la cadena flexible del agonista natural (diacilglicerol, DAG) ha sido integrada a una estructura cíclica, hemos logrado reducir el costo entrópico asociado con el proceso de unión del DAG con su receptor. La estructura de rayos X del receptor C1b de la isozyma  $\delta$  ligada a un éster de forbol inspiró la incorporación de cadenas alifáticas ramificadas a las DAG-lactonas con el fin de optimizar su interacción con las cadenas hidrofóbicas, también ramificadas, de aminoácidos presentes en el perímetro del receptor. Estas modificaciones produjeron DAG-lactonas con afinidad por la PKC a concentraciones nanomolares, aproximando así la afinidad característica de los ligandos provenientes de fuentes naturales, como los ésteres de forbol. A nivel celular, la ubicación de cada isoenzima activa en un compartimento celular concreto determina el tipo de respuesta biológica. Este paso es la culminación de un proceso complejo de translocación de la enzima desde el citoplasma a tales compartimentos celulares que se inicia con la activación alostérica de la enzima por el DAG, o por las DAG-lactonas. Como la constitución de las cadenas de las DAG-lactonas son factores contribuyentes al proceso de translocación, hemos desarrollado unas quimiotecas de lactonas con cadenas diversas con el propósito de explorar nuevos espacios moleculares que puedan ser reconocidos como códigos postales químicos por los diferentes compartimentos celulares y así lograr una respuesta biológica determinada. La facilidad con la cual se generan estas quimiotecas dirigidas a los receptores C1 de la isoenzimas del PKC y otras proteínas que contienen receptores C1

similares, han contribuido al descubrimiento de nuevas estructuras con actividades farmacológicas diferentes y específicas.

**Palabras clave:** Diacilglicerol; diacilglicerol lactonas; proteína cinasa C, isoenzimas; drogas, diseño molecular; quimiotecas.

## Semblanza del Dr. Víctor E. Márquez.



Después de recibir el título de Farmacéutico de la Universidad Central de Venezuela (1966), obtuvo su maestría (1968) y doctorado (1970) en "Medicinal Chemistry" de la Universidad de Michigan. A continuación de un año de postdoctorado en el "National Cancer Institute" (NCI) trabajó en la industria farmacéutica privada en Venezuela como director de investigaciones. En el año 1977 regresó al NCI como investigador visitante y diez años más tarde, después de recibir ciudadanía americana, se incorporó de manera

permanente a esta organización con el título de investigador principal. Desde el año 2000 ejerce el cargo de Jefe del Laboratorio de Química Medicinal del NCI. Ha participado como profesor en cursos de postgrado impartidos en las Universidades de Saskatchewan y Manitoba (1984-85) en Canadá y en la Universidad de Santiago de Compostela (2001) en España. Hasta la fecha ha recibido más de 80 invitaciones como orador de orden en congresos científicos internacionales y como conferencista en universidades e industria farmacéutica. Fue organizador de las Conferencias Gordon sobre el tema de "Purinas, Pirimidinas y Compuestos Relacionados" durante los años 1993 (vicepresidente) y 1995 (presidente). Ha recibido diversas distinciones y premios tales como el premio de inventor del Departamento de Comercio de los Estados Unidos de América (1979), "NIH Merit Award" (1992), "NCI Intramural Research Award" (1997), "Federal Technology Transfer Award" (1998, 1999 & 2000) y "Pharmazie-Wissenschaftspreis" (2001). Desde el año 2003 es miembro de la comisión de planificación de conferencias de la División de Química Medicinal de la Asociación Americana de Química y en el año 2003 fue distinguido como orador del "Belleau Memorial Lecture" por la Universidad de McGill en Canadá. Su grupo de investigación sigue dos líneas de trabajo, una relacionada con la síntesis de activadores de la proteína cinasa C y otra sobre el estudio de nucleósidos carbocíclicos como agentes antivirales y antitumorales. Hasta la fecha ha publicado 271 artículos científicos, 9 capítulos y es inventor o co-inventor de 24 patentes.

Teléfono: 301-846-5954; Fax: 301-846-6033;  
marquezv@dc37a.nci.nih.gov  
<http://ccr.cancer.gov/Staff/Staff.asp?StaffID=731>



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## **NUEVAS FUNCIONES PARA LAS FOSFOLIPASAS Y ACILTRANSFERASAS DE FOSFOLÍPIDOS: UNA BREVE REVISIÓN DE LAS FUNCIONES Y EL METABOLISMO DE FOSFOLÍPIDOS**

María Teresa Peña Rangel y Juan Riesgo Escovar

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM Juriquilla  
Km 15 carr. Qro- SLP, Querétaro. Qro. 76230.

[riesgo@inb.unam.mx](mailto:riesgo@inb.unam.mx)

### **NEW LIPID PHOSPHOLIPASES AND ACYLTRANSFERASES FUNCTIONS: A SUCCINCT REVIEW OF PHOSPHOLIPID FUNCTION AND METABOLISM**

#### **Abstract**

*Lipid molecules have received traditionally very little attention as components of general metabolism and cellular signaling in eukaryotes. Originally, lipid function was established as cellular/bodily energy storage and structural components of biological membranes. In this paper, we briefly summarize these basic and other lipid functions, together with their classification and structure. We particularly stress phospholipids because they mediate the majority of the now known lipid functions, and we briefly describe their structure, synthesis and degradation. Finally, we discuss the characteristics of two types of enzymes involved in phospholipids metabolism: the phospholipases and the acyltransferases, and their roles in sensory processes, learning and memory.*

**Keywords:** phospholipids, phospholipase A<sub>2</sub>, acyltransferase, learning and memory.

---

#### **Introducción**

La diversidad y complejidad de los procesos y las funciones que llevan a cabo las células requiere de la participación de muchos tipos de moléculas biológicas; tradicionalmente

estas se clasifican en los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. El estudio de estas moléculas ha ocupado buena parte de la bioquímica y la biología celular del siglo veinte.

Por muchos años, las investigaciones en el campo de la bioquímica se dedicaron casi exclusivamente al estudio de las proteínas, en buena parte debido a que los investigadores resultaron atraídos por la sorprendente diversidad estructural y funcional de las mismas, lo que redundó en el desarrollo de las técnicas de aislamiento y purificación que facilitaron la determinación estructural y funcional de muchas de ellas (1). A esta situación se une el hecho de que durante mucho tiempo se creyó que las proteínas eran las depositarias de la información genética de los seres vivos y las únicas moléculas que, al menos entonces, eran capaces de catalizar reacciones químicas. Sin embargo, fueron los carbohidratos las primeras moléculas en las que se descifraron las rutas metabólicas de degradación y de síntesis. Ejemplo de ello es que para 1930 y 1937 estaban descritas todas las reacciones de la glucólisis y del ciclo de Krebs, respectivamente. A partir de que en 1944 se demostró que el DNA es la molécula que almacena la información genética (2, 3), el campo de la bioquímica se desplazó parcialmente a estudiar la estructura del DNA, y más recientemente, con el desarrollo de las técnicas de la genómica, a estudiar la estructura y el contenido informático de genomas completos incluyendo el humano, así como las cohortes de genes que intervienen en una función o proceso determinado (4).

Los lípidos no se estudiaron tan intensamente como las otras moléculas biológicas e incluso se llegó a suponer que eran moléculas relativamente inertes y que su metabolismo no resultaba tan importante como el de los carbohidratos y proteínas. Estas ideas se modificaron en poco tiempo al conocerse que un tipo de lípidos, los triglicéridos son la fuente principal de la energía metabólica, cuantitativamente más importante que las reservas de carbohidratos en forma de glucógeno. Más recientemente se ha establecido que los lípidos llevan a cabo muchas otras funciones en la célula, como soporte estructural, funciones de señalización, etc. En la actualidad se sabe que los lípidos son constituyentes extremadamente importantes de los seres vivos. En los mamíferos ocupan de un 5 a un 25% del peso corporal. Su estudio ha permitido entender mejor como su desequilibrio o deficiencia son la causa de padecimientos muy serios como la diabetes, la acidosis, la hipercolesterolemia y la obesidad, entre muchas otras patologías (5-7).

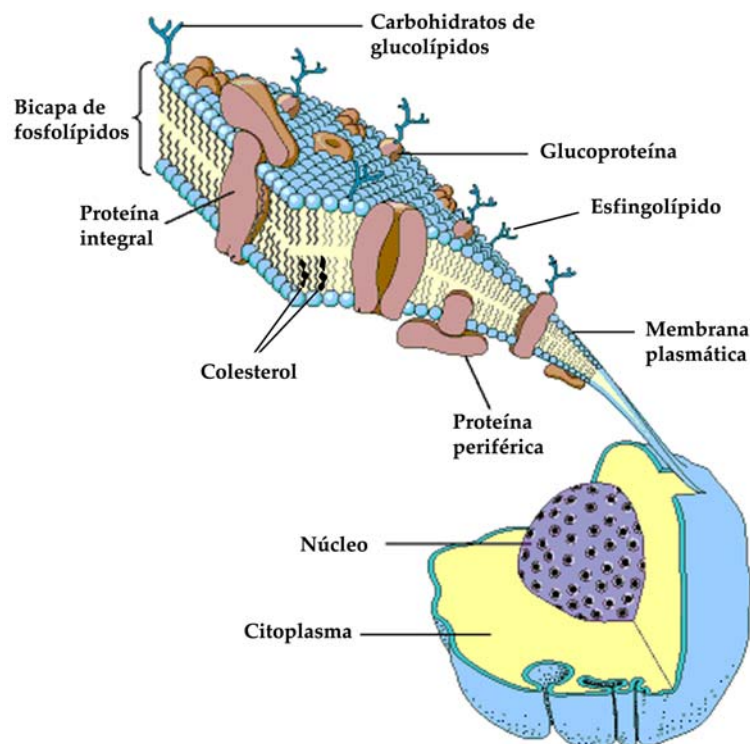
Los lípidos son un conjunto de moléculas con una gran diversidad estructural y funcional. Se les agrupa en la misma categoría a pesar de esta diversidad porque todos contienen estructuras ricas en Carbono e Hidrógeno, lo que les confiere una muy baja solubilidad en ambientes acuosos. En especial un tipo de lípidos, los fosfolípidos, tienen un carácter anfipático lo que significa que tienen regiones hidrofílicas (solubles en agua) e hidrofóbicas (insolubles en agua), que les permite cumplir con una de sus principales funciones en las células, ser un componente fundamental de las membranas biológicas.

### **Funciones de los lípidos**

Las funciones que llevan a cabo los lípidos son muy diversas lo cual es un reflejo de su amplia diversidad estructural. A continuación se ejemplificarán algunas de las funciones más importantes de estas biomoléculas.

1. Son constituyentes fundamentales de las membranas biológicas. Las membranas se forman por bicapas de fosfolípidos (ver Figura 1). Aunque la composición de las membranas biológicas varía dependiendo del tipo celular, los fosfolípidos ocupan un porcentaje importante. Por ejemplo, de los constituyentes lipídicos totales de la membrana plasmática de una célula hepática, el 35% son fosfolípidos, el 17% lo ocupa el colesterol, el 19% los esfingolípidos y el 7% corresponde a glucolípidos. Dentro de las bicapas de fosfolípidos que estructuran las membranas biológicas, la composición de fosfolípidos también varía: Los fosfolípidos que forman la capa en contacto con el medio externo son distintos de aquellos que forma la capa interna, que está en contacto con el medio intracelular en las membranas plasmáticas, y rara vez ocurren intercambios de fosfolípidos de una capa a la otra. Las células mantienen la composición de ambas capas de manera activa, ya que una de las formas de evidenciar la apoptosis o muerte celular programada es observando la aparición de fosfolípidos de la capa interna en la capa externa. Las membranas internas también varían en composición entre sí y con respecto a la membrana plasmática, por ejemplo en el retículo endoplásmico el 62% de las moléculas lipídicas corresponde a los fosfolípidos, el 6% al colesterol y el 5% lo ocupan los esfingolípidos, de manera que se crean diversos ambientes lipídicos. A esto se le debe de sumar la existencia de 'balsas lipídicas', microambientes en las membranas ricas en otros lípidos, como el colesterol, que alteran las propiedades de las membranas (por ejemplo el colesterol vuelve más fluidas las membranas), se asocia de manera preferente con proteínas, creando, en efecto, microregiones dentro de las membranas de diferente composición lipídica, y diferentes características físicas y químicas, como la fluidez y el grosor de las mismas. Muchas proteínas señalizadoras, entre otras, se asocian preferentemente con estas balsas lipídicas 'navegando' en este mar de fosfolípidos. Así se concentran en pequeñas parcelas dentro de las membranas, algo crítico para su función señalizadora. El estudio de las balsas lipídicas es hoy uno de los temas más interesantes en el campo de las membranas biológicas (8).
- 2) Son componentes de las lipoproteínas. El colesterol esterificado y los triglicéridos son moléculas insolubles en ambientes acuosos y el mecanismo de transporte a través del torrente sanguíneo en vertebrados es a través de partículas denominadas lipoproteínas, que están rodeadas por una monocapa de fosfolípidos unidos a proteínas integrales (9). Son algunos de estos complejos de transporte los que frecuentemente se asocian con patologías como la arteroesclerosis, que consiste en la deposición de estos complejos en las paredes de los vasos sanguíneos, reduciendo, y en casos extremos, ocluyendo la luz de los mismos (10).
- 3) Varias proteínas se modifican con lípidos postraduccionalmente. Existen muchos ejemplos de proteínas que necesitan estar unidas a lípidos para llevar a cabo su función. Entre estas, muchas de las proteínas de cadenas señalizadoras se sirven de sus 'colas' lipídicas para localizarse en microambientes y membranas lipídicas particulares, vitales para su función. Entre estas proteínas el caso de la proteína Hedgehog es quizá, singular. Esta proteína sufre autoproteólisis mediada por su extremo carboxilo terminal después de traducida al interior de la célula, y el fragmento amino terminal sufre la adición de dos moléculas lipídicas: un ácido graso en su extremo amino terminal (un ácido palmítico) y la esterificación de una molécula de colesterol en su extremo carboxilo terminal (11). Sin estas modificaciones el poder señalizador de esta proteína es prácticamente nulo. Dado que Hedgehog actúa como un morfógeno, es

decir, que es capaz de señalar a varias células de distancia de la célula sintetizadora de Hedgehog de una manera concentración dependiente, estas modificaciones lipídicas imponen serias restricciones a la movilidad de Hedgehog en ambientes acuosos, como el medio extracelular, y han dado pie a varias teorías para explicar sus efectos. Una teoría es la trancitosis, o el transporte secuencial de fragmentos de membrana plasmática conteniendo Hedgehog entre células por medio de englobamientos sucesivos y transporte intracelular en vesículas de un lado de la célula al opuesto, o la formación de citonemas, delgadas prolongaciones de la membrana plasmática de las células de varios diámetros celulares de longitud, verdaderos 'dedos' celulares, capaces de hacer contacto con las membranas plasmáticas de las células sintetizadoras de Hedgehog (12).



**Figura 1.** Esquema de la estructura de las membranas biológicas (Modificado de Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. (2003). Bioquímica. Tercera edición. Addison Wesley).

- 4) Son fuentes muy importantes de energía. Del contenido total de lípidos en un mamífero, el 90% corresponde a los triglicéridos, la forma principal de almacenamiento de energía. Una persona de 70 kilos tiene almacenados alrededor de 400,000 kJ en forma de triglicéridos y solo 2,500 kJ en forma de glucógeno. Usar triglicéridos como fuente principal de almacenamiento de energía tiene dos ventajas: a) los átomos de carbono de los ácidos grasos que los constituyen, están más reducidos que los carbonos en los carbohidratos y b) el glucógeno es sumamente hidrofílico, y por cada gramo del polisacárido hay dos gramos de agua, mientras que los triglicéridos son hidrofóbicos y no

- retienen agua. Por lo anterior, durante la degradación de los triglicéridos, se obtienen 7 moléculas de ATP por átomo de carbono catabolizado, comparado con 5 obtenidas a partir de carbohidratos (13).
- 5) Son elementos involucrados en el reconocimiento celular. Los oligosacáridos de los glucoesfingolípidos en las membranas celulares determinan los tipos de grupos sanguíneos en humanos, siendo el sistema ABO el más familiar (14).
  - 6) Son mediadores en los procesos de inflamación y dolor. Un ejemplo particularmente conocido son las prostaglandinas. Algunos analgésicos de uso común como el ácido acetil salicílico o la aspirina, actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (15).
  - 7) Actúan como hormonas, o mensajeros intercelulares a distancia induciendo la transcripción de genes en las células blanco. Las hormonas son mediadores que viajan a través de medios de circulación general en los organismos, como el torrente sanguíneo de vertebrados o la hemolinfa de invertebrados hasta llegar a sus células blanco. La comunicación que se establece entre células por este medio (endócrina) puede ocurrir a grandes distancias dentro del organismo, y frecuentemente es más lenta que la que se suscita entre células más cercanas, como la comunicación neural. Varias de las hormonas conocidas son compuestos lipídicos de bajo peso molecular, como la progesterona y el estradiol en vertebrados, o la ecdisona en artrópodos. La progesterona y el estradiol, dos hormonas esteroides, influyen en el desarrollo, la diferenciación y el mantenimiento del tracto reproductor y de otros tejidos blanco de varias maneras, entre las que se incluyen la modificación de la expresión génica al unirse a receptores nucleares, aunque también tienen efectos llamados 'no génicos' mediados en la membrana plasmática y el interior celular. Dado que son compuestos lipídicos (y por lo tanto, hidrofóbicos), pueden difundirse a través de las membranas biológicas y llegar al interior del núcleo de las células blanco, en donde se unen a proteínas que actúan como sus receptores. Estos complejos de receptor/hormona lipídica actúan entonces como factores de transcripción (16).
  - 8) Son mensajeros intracelulares. Un ejemplo muy estudiado y conocido lo constituye la señalización intracelular mediada por los segundos mensajeros producto de la degradación del inositol bifosfato en diacilglicerol y 1,4,5-inositol trifosfato, o  $IP_3$ , mediada por fosfolipasas C. La transducción celular en respuesta a moléculas señalizadoras, como hormonas y neurotransmisores, muchas veces está mediada por este sistema de segundos mensajeros: la molécula señalizadora se une a su receptor en la membrana plasmática, y este complejo molécula señalizadora/receptor activa una vía de transducción de señales que activa, a su vez, a una fosfolipasa C generando diacilglicerol e  $IP_3$ . Estas moléculas actúan como segundos mensajeros intracelulares activando a otras proteínas transductoras, como lo es la apertura de canales de calcio en el retículo endoplásmico, para el caso del  $IP_3$ , o la activación de proteínas cinasas en las membranas, para el caso del diacilglicerol (17). Este sistema de señalización está muy difundido, y puede transducir muchísimas señales distintas dependiendo de la célula y del contexto en el que se active este sistema, desde la transducción visual en invertebrados, la respuesta a hormonas o la comunicación neural.



- 9) Son inductores de la proliferación, la migración y la supervivencia celular. El ácido lisofosfatídico, producto de la acción de algunas fosfolipasas, además de fungir como metabolito intermediario en la biosíntesis de fosfolípidos, activa vías de señalización implicadas en procesos tan diversos como la cicatrización de heridas, la remodelación del sistema vascular y la progresión de tumores (18).
  
- 10) Existen compuestos que se sintetizan por condensación de isoprenos y realizan funciones biológicas muy diversas. Dentro de este grupo encontramos a las vitaminas liposolubles A, D, E y K. La vitamina A tiene varias formas lo que le permiten actuar como un pigmento visual o como una hormona que regula la expresión génica. La vitamina D, al igual que la A tiene actividad hormonal y específicamente, induce la expresión de genes que regulan la captación de calcio. La vitamina E es un antioxidante biológico que reacciona con radicales libres producidos durante el metabolismo oxidativo, y la vitamina K se requiere en el proceso de la coagulación. Las plantas también producen una gran cantidad de compuestos isoprenoides, algunos con propiedades hormonales como las giberelinas o fragancias como el mentol (13).

En conclusión, y aunque el listado anterior no es exhaustivo, es claro que los lípidos participan críticamente en una gran variedad de funciones celulares. Debido a esta importancia y diversidad, se hace preciso describir brevemente su estructura y metabolismo.

### **Clasificación de los lípidos**

A diferencia de las proteínas, los ácidos nucleicos y los carbohidratos, los lípidos no son polímeros y en general son moléculas pequeñas. Una clasificación muy general de los lípidos los agrupa en lípidos simples y lípidos complejos. Dentro de los lípidos simples se encuentran los ácidos grasos, que son, a su vez, constituyentes de lípidos complejos. Otros lípidos simples son los isoprenoides o terpenos que incluyen al colesterol, a las hormonas esteroides, a los ácidos biliares, a las vitaminas liposolubles y a las giberelinas, entre otros.

Los lípidos complejos se agrupan en dos grandes categorías: a) lípidos complejos no polares que incluyen los triglicéridos y las ceras y b) los lípidos complejos polares que son moléculas anfipáticas porque contienen dominios hidrofóbicos y regiones hidrofílicas en la misma molécula. En esta categoría se encuentran los fosfolípidos, los esfingolípidos, los glucoglicerolípidos, las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos (19).

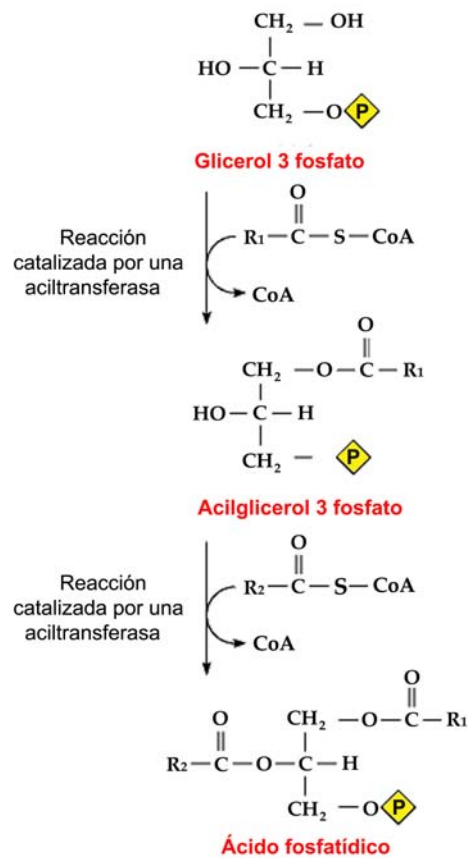
Del grupo de los lípidos complejos polares, los fosfolípidos intervienen en la mayoría de las funciones mencionadas anteriormente y el resto del artículo estará enfocado a describir brevemente su estructura, su síntesis y degradación y en especial la participación en la activación de dos enzimas que se requieren para la transmisión sináptica en los sentidos de la olfacción y la visión y en los mecanismos del aprendizaje y la memoria en *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta.

## Estructura de los fosfolípidos

Un fosfolípido está formado por una molécula de L-glicerol-3-fosfato a la que están unidas dos ácidos grasos en el C1 y en el C2, por medio de enlaces éster, formándose así el fosfolípido más sencillo que es el ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es un componente menor en las membranas y funciona principalmente como precursor de otros fosfolípidos o de los triglicéridos, o bien como producto de degradación de estos mismos. Al grupo fosfato se le pueden unir diferentes moléculas como por ejemplo la colina, la etanolamina, el inositol, o la serina, dando lugar a las fosfatidilcolinas, las fosfatidiletanolaminas, los fosfatidilinositoles, etc. La variedad en los tipos de ácidos grasos que forman a los fosfolípidos generan toda una gran familia de especies moleculares que comparten el mismo esqueleto de glicerol y porción polar. Por ejemplo, en el caso particular de los tipos de fosfatidilcolinas, los diferentes ácidos grasos generan moléculas distintas que ocurren diferencialmente entre organismos, entre los tejidos de un mismo organismo y aún entre células diferentes de un mismo tejido. En general los ácidos grasos unidos al C1 del glicerol son de 16-18 carbonos de longitud y son saturados y los ácidos grasos unidos al C2 del glicerol son de 18-20 carbonos y son insaturados. Los ácidos grasos insaturados unidos al C2 también pueden variar en el grado de insaturación. Lo anterior da como resultado la presencia de cientos de fosfolípidos diferentes en una célula con la misma estructura y cabeza polar. El significado biológico de esta variabilidad todavía no se entiende muy bien pero es evidente que es un factor fundamental en la fluidez de las membranas. Dentro de estas familias de fosfolípidos tan diversos, el fosfatidilinositol es un poco la excepción ya que contiene generalmente ácido esteárico en el C1 y ácido araquidónico en el C2 en mamíferos, siendo éste último el precursor de varios mensajeros e intermediarios de vías de señalización (20).

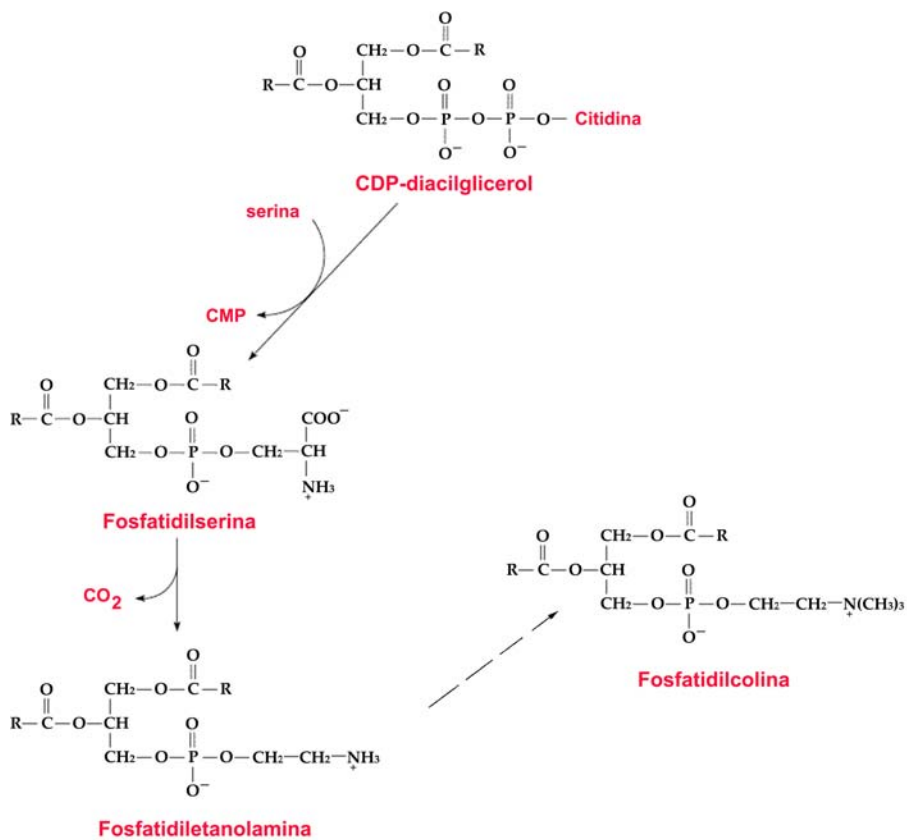
## Metabolismo de los fosfolípidos

Se cree que en la mayoría de las células hay un recambio continuo de los constituyentes de las membranas celulares, lo que implica la participación de las vías de degradación y de síntesis de los fosfolípidos con una tasa de actividad más o menos constante y similar. En las células eucariontes existen tres rutas para la síntesis de ácido fosfatídico, el precursor de todos los fosfolípidos. La vía más común inicia con una molécula de L-glicerol-3-fosfato y la participación de dos aciltransferasas que usan acilCoA como sustratos, formando así 1-acilglicerol-3-fosfato en la primera reacción y ácido fosfatídico en la segunda reacción (ver Figura 2). Entre los fosfolípidos más abundantes en las células eucariontes, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina se forman a partir de fosfatidilserina aunque también se pueden formar a través de vías alternas utilizando ácido fosfatídico y colina o etanolamina libre, respectivamente. En el primer caso, a partir del ácido fosfatídico se forma diacilglicerol activado con el nucleótido citidina difosfato (diacilglicerol-CDP) cuyo papel es similar al del UDP (uridina difosfato) en la síntesis de polisacáridos, y se lleva a cabo una reacción entre la serina y el CDP, generándose fosfatidilserina y citidina monofosfato (CMP). La fosfatidiletanolamina se forma por una descarboxilación de la fosfatidilserina y a partir de la fosfatidiletanolamina se forma fosfatidilcolina (ver Figura 3). El fosfatidilinositol se forma por la transferencia de inositol a una unidad de diacilglicerol fosfato, y fosforilaciones posteriores catalizadas por cinasas específicas producen fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, que como ya hemos descrito es una molécula importante en la transducción de señales (21).



**Figura 2.** Vía principal de síntesis del ácido fosfatídico en eucariontes. Participan dos aciltransferasas con diferente especificidad sobre los derivados acilgraso ( $R_1$  y  $R_2$ ).

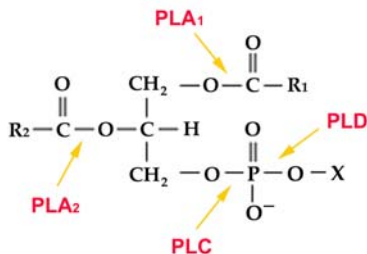
Aunque hay vías alternas de síntesis para los principales fosfolípidos, la falta de alguna de ellas puede tener efectos dramáticos, como se observa en mutaciones en el gen *easily shocked* de *Drosophila*. Estas mutantes no pueden sintetizar fosfatidiletanolamina por la ruta alterna, es decir, a partir de ácido fosfatídico y etanolamina y esto reduce la cantidad y tipo de fosfolípidos en las membranas celulares. Lo anterior trae como consecuencia parálisis temporales después de una estimulación eléctrica, mientras que en las moscas silvestres este fenómeno no se presenta. Este ejemplo sirve para mostrar la importancia de la composición de fosfolípidos en fenómenos de excitabilidad (22). Datos recientes han arrojado gran cantidad de información sobre los mecanismos de regulación de la composición de fosfolípidos en las membranas, por ejemplo la caracterización de factores de transcripción que activan genes que codifican para enzimas de las vías biosintéticas de fosfolípidos (23). Estos factores de transcripción están presentes en insectos y mamíferos, y están involucrados en los mecanismos de regulación de la composición de lípidos en las membranas.



**Figura 3.** Síntesis de algunos de los fosfolípidos más abundantes en eucariontes. Las reacciones se llevan a cabo por enzimas mitocondriales y por enzimas unidas a membranas del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi, principalmente en el hígado en vertebrados.

El ácido fosfatídico es uno de los productos principales de la degradación de los fosfolípidos, por acción de la fosfolipasa D. La fosfolipasa  $A_1$  y la fosfolipasa  $A_2$  en cambio, catalizan reacciones de remoción de ácidos grasos usando fosfolípidos como sustrato. La fosfolipasa  $A_1$  cataliza la reacción que genera un lisofosfolípido removiendo el ácido graso del C1 mientras que la fosfolipasa  $A_2$  cataliza la reacción en la que se remueve el ácido graso del C2 (ver Figura 4). Más adelante nos detendremos a describir con detalle algunas características y funciones en las que está involucrada la fosfolipasa  $A_2$ . Los lisofosfolípidos, además de las funciones anotadas arriba activando vías de señalización, son también una fuente de ácidos grasos en reacciones de remodelación de fosfolípidos para la síntesis de fosfolípidos específicos como es el caso del fosfatidilinositol. A su vez, los ácidos grasos removidos de los fosfolípidos son una fuente importante de energía. Su degradación se lleva a cabo principalmente en el hígado en vertebrados y necesitan transportarse del citosol a la matriz mitocondrial que es en donde se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación. En esta ruta catabólica, los ácidos grasos se convierten en unidades de dos carbonos unidos a la coenzima A (acetilCoA) y entran al ciclo de Krebs en donde se produce  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , GTP, NADH y  $\text{FADH}_2$ . También durante las reacciones de la  $\beta$ -

oxidación se genera NADH y FADH<sub>2</sub>. Todas las moléculas de NADH y FADH<sub>2</sub> entran a la cadena de transporte de electrones y a través de la fosforilación oxidativa, se genera una gran cantidad de ATP, como ya se mencionó anteriormente (24).



**Figura 4.** Especificidad de las diferentes fosfolipasas. La fosfolipasa A1 (PLA<sub>1</sub>) rompe el enlace éster de los derivados acilgraso del C1 en los fosfolípidos, la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ataca el enlace éster de los derivados acilgraso del C2 y las fosfolipasa C (PLC) y D (PLD) los enlaces fosfodiéster.

Dentro del metabolismo general de los fosfolípidos resulta particularmente interesante estudiar a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (EC: 3.1.1.4) y a la enzima que cataliza la reacción inversa, la aciltransferasa de lisofosfolípidos (EC: 2.3.1.51). Recientemente se les ha implicado en funciones del sistema nervioso como la olfacción, la visión, el aprendizaje y la memoria en *Drosophila melanogaster* (25, 26).

### Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

A partir de los fosfolípidos y principalmente a partir del ácido fosfatídico, la PLA<sub>2</sub> produce monoacilglicerol 3 fosfato llamado también ácido lisofosfatídico (LPA). El LPA es un componente central del metabolismo de lípidos y todas las células lo contienen en pequeñas cantidades aunque algunos tipos como las plaquetas activadas producen una elevación importante en la concentración de LPA en el plasma. Esta elevación no se debe a la síntesis y secreción de LPA por las plaquetas, ya que su producción ocurre en el medio extracelular por secreción de PLAs que actúan sobre fosfolípidos de membranas, o unidos a albúmina o asociados a lipoproteínas, cuando las plaquetas se activan por diversas señales (27).

Se han identificado varias PLA<sub>2</sub>s y estas se clasifican en tres grupos: 1) PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), 2) PLA<sub>2</sub> extracelulares (ePLA<sub>2</sub>), y 3) PLA<sub>2</sub> intracelulares independientes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Las cPLA<sub>2</sub> se encuentran en la fracción citosólica de prácticamente cualquier tipo celular, poseen un dominio de unión a la membrana dependiente de Ca<sup>2+</sup> y parecen tener preferencia por fosfolípidos que contienen ácido araquidónico en la posición 2, su participación parece ser crucial en la formación de vesículas provenientes del complejo de Golgi (28). Las iPLA<sub>2</sub> se identificaron recientemente y no parecen tener especificidad por fosfolípidos con ácido araquidónico como las cPLA<sub>2</sub>. Finalmente, las ePLA<sub>2</sub> tampoco muestran selectividad por un tipo de fosfolípidos en particular e intervienen en varios procesos patológicos como la arteroesclerosis produciendo intermediarios de moléculas inflamatorias como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos (29).

El LPA, que como se mencionó es uno de los productos de la reacción de la PLA<sub>2</sub>, se describió inicialmente como mitógeno en varios tipos celulares (30), aunque ahora se sabe que se requiere en la migración y sobrevivencia celular, en la cicatrización de heridas, durante la agregación de las plaquetas, en la depolarización de las membranas, en la maduración de

ovocitos, en la retracción de neuritas y en la olfacción entre otras funciones, aunque en condiciones patológicas parece ser un factor activador de cáncer ovárico (31). En todas estas funciones la respuesta está mediada por receptores acoplados a proteínas G en vertebrados. Cabe mencionar que en humanos existen aproximadamente 2000 tipos de receptores a ligandos muy diversos, acoplados a proteínas G. Hasta el momento se han descrito tres receptores para el LPA y son codificados por los genes *lp*, de la familia de receptores de siete cruces transmembranales. Estos receptores se expresan en la mayoría de órganos y tejidos en mamíferos (32). Las vías de señalización que se activan en respuesta al LPA son: 1) la vía de las MAPK (proteínas cinasas activada por mitógenos), responsables de la proliferación celular, 2) la vía de la fosfolipasa C (PLC) con la generación de diacilglicerol e  $IP_3$  y la consecuente activación de la proteína cinasa C (PKC) y la movilización de  $Ca^{2+}$  y 3) la activación de GTPasas de tipo Rho produciendo rearrreglos del citoesqueleto y cambios de forma celular (33).

Además de lo anterior, las  $PLA_2$  también intervienen en la peroxidación de lípidos. Durante el metabolismo oxidativo de la célula, los fosfolípidos de las membranas están expuestos a modificaciones por radicales libres que producen lipoperoxidación. Los lípidos peroxidados tienen propiedades distintas, y esto altera las propiedades de las membranas biológicas. Por ello existen mecanismos de reparación que consisten en la remoción de los ácidos grasos peroxidados y su reemplazo con nuevos ácidos grasos. Debido a que en la posición 2 de los fosfolípidos es común la presencia de un ácido graso insaturado, este es un blanco especial para la lipoperoxidación, y las enzimas ideales para participar en esta reacción son las  $PLA_2$ s, removiendo al ácido graso peroxidado y una aciltransferasa, para reponer un ácido graso en esta posición (C2) (34).

Toda la información anterior sobre las  $PLA_2$ s se obtuvo estudiando vertebrados, particularmente mamíferos. Recientemente, se reportó en *Drosophila melanogaster* la existencia de una  $PLA_2$  cuya actividad se requiere para un tipo de memoria, la memoria resistente a anestesia (25).

Tanto en vertebrados como en invertebrados hay varios tipos de memoria: memoria a corto plazo, memoria a mediano plazo, memoria a largo plazo y memoria resistente a anestesia (MRA). Esta última se caracteriza porque los anestésicos producen amnesia de experiencias recién adquiridas (35). Se conoce una parte de los procesos que subyacen a los mecanismos de memoria a corto plazo y se sabe que la vía de segundos mensajeros del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) está involucrada. La memoria a largo plazo requiere de la síntesis de proteínas, pero se desconoce la vía de señalización que establece la MRA. Tully y colaboradores (35) demostraron que moscas mutantes para una  $PLA_2$  tienen una reducción considerable en la memoria resistente a anestesia, implicando la existencia de una vía de señalización en este tipo de memoria que requiere de la actividad de una  $PLA_2$ . Alternativamente o además de una función de señalización, con la producción de un lisofosfolípido como segundo mensajero, es también posible que la función de la  $PLA_2$  se requiera para la remodelación de las membranas alterando el balance fosfolípidos/lisofosfolípidos, ya que se ha observado que esta relación es clave para establecer la curvatura de las membranas y concomitantemente la generación de vesículas para el tráfico vesicular. Se ha especulado que las  $PLA_2$  y las enzimas que catalizan la reacción inversa, las aciltransferasas de fosfolípidos, pueden mediar eventos como la fusión de las vesículas sinápticas durante la comunicación neuronal (36). En el caso de esta recién descrita  $PLA_2$  de *Drosophila melanogaster*, por medio de genes reporteros se ha determinado el patrón de expresión en adultos. Esta enzima se expresa en el lóbulo de la antena, un centro de

procesamiento de los estímulos olfatorios y en interneuronas que envían proyecciones a los cuerpos setíferos, estos últimos centros importantes en la consolidación de la memoria olfativa en el cerebro (25).

### **Aciltransferasas de lisofosfolípidos (LPAT) .**

Las LPAT son enzimas que transfieren ácidos grasos insaturados a lisofosfolípidos, es decir catalizan la reacción contraria a la que llevan a cabo las PLA<sub>2</sub>s y la PLA<sub>1</sub> al reaclilar lisofosfolípidos. Existe una gran cantidad de aciltransferasas agrupadas en una superfamilia de enzimas asociadas a las membranas y que transfieren ácidos orgánicos, principalmente ácidos grasos, a moléculas blanco que pueden ser lípidos, lipopolisacáridos o proteínas (37), por ejemplo, las aciltransferasas que transfieren ácidos grasos a moléculas de colesterol o diacilglicerol o a las proteínas. Cada vez se tienen más evidencias de que las modificaciones postraduccionales en las proteínas de señalización, como las ya descritas para Hedgehog o para otra importante molécula señalizadora, Wingless, por compuestos lipídicos como colesterol o ácido palmítico, influyen de manera crítica en la distribución y la actividad de estas moléculas de secreción regulando el anclaje con la matriz extracelular o con la membrana plasmática. No tan solo en estas moléculas de señalización ocurren estas modificaciones lipídicas. La adición de palmitato a la apolipoproteína B es necesaria para el ensamblaje correcto de las partículas lipoprotéicas, de las que la apolipoproteína B forma parte (38). Añadir motivos hidrofóbicos en proteínas extracelulares o citosólicas, parece volverse cada vez más una regla que una excepción. Se han empezado a caracterizar algunas de las aciltransferasas involucradas en estas modificaciones lo que seguramente proporcionará elementos para entender mejor los procesos en los que intervienen.

Por otro lado, las aciltransferasas se requieren para el tráfico vesicular intracelular, algo que hemos mencionado ya anteriormente. Existen varios trabajos que muestran evidencias de la acción de la PLA<sub>2</sub> en la formación de túbulos provenientes del complejo de Golgi y del efecto opuesto de una LPAT. Se ha propuesto que mientras que la PLA<sub>2</sub> aumenta la proporción de lisofosfolípidos en la membrana, la LPAT regenera los fosfolípidos de la misma, ambas influyendo en la curvatura de las membranas y contribuyendo así a la formación de túbulos o vesículas (39, 40).

En particular, recientemente se aislaron y caracterizaron mutaciones en el homólogo en *Drosophila melanogaster* de las endofilinas, una familia de proteínas descritas originalmente en vertebrados (*DendoA*). Había evidencias de que las endofilinas actuaban como proteínas adaptadoras en la endocitosis para el reciclaje de membranas de vesículas sinápticas (41). Mutaciones nulas en esta endofilina son letales en la etapa larvaria del ciclo de vida de la mosca. Recordemos que una mutación nula conduce a la ausencia total de la función de un gen. Se sabe que esta endofilina tiene un dominio de aciltransferasa de lisofosfolípidos y se propone que promueve la curvatura de la membrana favoreciendo la endocitosis de vesículas sinápticas en la sinapsis neuromuscular larvaria. El análisis de estas sinapsis en las mutantes muestra que la endocitosis de las membranas sinápticas inicia, pero las células son incapaces de completar la curvatura de las mismas, para formar vesículas; en cambio se acumulan intermediarios endocíticos sin separarse de la membrana plasmática en la presinapsis (42).

Trabajando con *Drosophila melanogaster*, en nuestro laboratorio hemos aislado y caracterizado mutaciones en un gen que codifica para una aciltransferasa de lisofosfolípidos de membrana. Estos alelos mutantes tienen defectos en dos sistemas sensoriales: la olfacción y la visión. En ensayos conductuales de respuesta a estímulos luminosos y odorantes realizados tanto en la fase larvaria como en la etapa adulta, los individuos mutantes se comportan como ciegos y con olfacción defectuosa comparados con controles silvestres. La mutación original en este locus es producto de la inserción de un transposón o elemento genético móvil. Los transposones existen de manera natural dentro de los genomas, pero en particular este elemento, llamado elemento P, se ha modificado para regular la transposición e incluir dentro de las secuencias del elemento un gen reportero. Esta estrategia tiene tres finalidades: Por un lado, es una herramienta para generar nuevos alelos por excisiones imprecisas del transposón, permite determinar la expresión de gen (o genes) endógeno(s) en el sitio de inserción (43) y permite el mapeo molecular de la inserción. A través de este transposón se determinó que la inserción está interrumpiendo un gen que codifica para una LPAT que se expresa en órganos olfatorios y visuales y en algunas áreas del sistema nervioso en varias etapas del desarrollo de la mosca. Se tienen datos preliminares sobre la actividad enzimática de la LPAT que muestran una notable disminución en la actividad total de aciltransferasas de lisofosfolípidos en homogenados y preparaciones de membranas plasmáticas y microsomales en comparación a la observada en los controles. Se han realizado electroretinogramas para tratar de conocer el tipo de defecto en la percepción visual y se han encontrado defectos en la transmisión sináptica entre los fotorreceptores y las interneuronas de la lamina en el lóbulo óptico. A esta aciltransferasa le hemos dado el nombre de *nanahuatzin*, en honor al dios azteca que de acuerdo a la leyenda se inmoló al inicio de la quinta era para cargar al sol y dar luz al mundo (26).

Es sólo recientemente que se tienen datos del papel de los fosfolípidos y su metabolismo en procesos neurales y de señalización. Estos hallazgos recientes que utilizan como modelo a la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, han sido críticos. La participación de la LPAT *nanahuatzin* en la percepción y el procesamiento neural de estímulos sensoriales así como el de la endofilina A y una PLA<sub>2</sub> en el aprendizaje y la memoria, abren el panorama que parecen jugar las aciltransferasas y fosfolipasas en los fenómenos celulares de comunicación neural y función cerebral.

## Referencias

1. Doolittle R (1985). Proteins. Sci. Am. 253(4): 88-96.
2. Hershey A D y Chase M (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. The Journal of General Physiology. 36(1): 39-56.
3. Avery O T, MacLeod C M y McCarty M (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *pneumococcal* types. J. Exp. Med. 98: 451-460.
4. Lander E S, Linton L M, Birren B, Nusbaum C, Zody M C, et al (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921.
5. Downes C P (1998). Lipids in signaling and recognition. Biochim. Biophys. Acta 1436: 1-126.
6. Brown M y Goldstein J L (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34-47.
7. Friedman J M y Halaas J L (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395: 763-770.
8. Edidin M (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32: 257-283.
9. Steinber D S (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. J. Biol. Chem. 272: 20963-20966.
10. Hajjar D P y Nicholson A C (1995). Atherosclerosis. Am. Sci. 83: 460-467.



11. Briscoe J y Théron P (2005). Hedgehog signaling: From the *Drosophila* cuticle to anti-cancer drugs. *Dev. Cell* 8: 143-151
12. Ramirez-Weber F A, y Kornberg T B (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607.
13. Nelson D y Cox M (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. W. F. Freeman and Company New York. pp 343-368.
14. Hakomori S (1986). Glycosphingolipids. *Sci. Am.* Mayo 254(5): 44-53.
15. Lands W E M (1991). Biosynthesis of prostaglandins. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 41-60.
16. Edwards D (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 335-376.
17. Irvine R F (1992). Inositol lipids in cell signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4: 212-219.
18. Mills G B y Moolenaar W H (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3:582-591.
19. Mathews C, van Holde K E y Ahern K (2000). *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Addison Wesley Longman. pp 315-358.
20. Dowhan W (1997). Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66: 199-232.
21. Carman G M y Henry S A (1989). Phospholipid biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 635-669.
22. Pavdilis P, Ramaswami M y Tanouye M A (1994). The *Drosophila* *easily shocked* gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell* 79: 23-33.
23. Dobrosotskaya I Y, Seegmiller A C, Brown M S, Goldstein J L y Rawson R B (2002). Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science* 296: 879-883.
24. Berg J, Tymoczko J y Stryer L (2002). The biosynthesis of membrane lipids and steroids. En: *Biochemistry*. 5th ed. New York W. H. Freeman. pp. 715-738.
25. Chiang A, Blum A, Barditch J, Chen Y H, Chiu S L, Regulski M, Armstrong J D, Tully T y Dubnau J (2004). *radish* encodes a phospholipase-A<sub>2</sub> and defines a neural circuit involved in anesthesia-resistant memory. *Current Biology* 14:263-272.
26. Gómez-Hernández A, Peña-Rangel M T, Miranda R, Díaz-Muñoz M, Hovemann B y Riesgo-Escovar J R. *nanahuatzin*, a nervous system lysophospholipid acyltransferase necessary for vision and smell in *Drosophila melanogaster* (en preparación).
27. Murakami M y Kudo I (2004). Diversity of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Secretory phospholipase A<sub>2</sub>*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(8): 1158-1164.
28. de Figuereido P, Drecktrah D, Katzenellenbogen J A, Strang M y Brown W J (1998). Evidence that phospholipase A<sub>2</sub> activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8642-8647.
29. Chakraborti S (2003). Phospholipase A<sub>2</sub> isoforms: a perspective. *Cellular signalling* 15: 637-665.
30. van Corven E J, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T y Moolenaar W H (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59: 45-54.
31. Moolenaar W, van Meeteren L y Giepmans N G (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26(8): 870-881.
32. Moolenaar W H (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp. Cell. Res.* 253: 230-238.
33. Contos J, Ishii I y Chun J (2000). Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular Pharmacology* 58: 1188-1196.
34. Nigam S y Schewe T (2000). Phospholipase A<sub>2</sub>s and lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta* 1488: 167-181.
35. Tully T, Preat T, Boynton S C, y Del Vecchio M (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79(1): 35-47.
36. Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov A V, Witke W, Huttner W B y Soling H D (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401: 133-141.
37. Hofmann K (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25: 111-112.
38. Mann R K y Beachy P A (2004). Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 891-923.
39. Drecktrah D, Chambers K, Racoosin E, Cluett E, Gucwa A, Jackson B y Brown W (2003). Inhibition of a Golgi complex lysophospholipid acyltransferase induces membrane tubule formation and retrograde trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 14: 3459-3469.

40. Chambers K y Brown W (2004). Characterization of a novel CI-976-sensitive lysophospholipid acyltransferase that is associated with the Golgi complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 313: 681-686.
41. Slepnev V I y De Camilli P (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1: 161-172.
42. Guichet A, Wucherpfennig T, Dudu V, Etter S, Wilsch-Brauniger M, Hellwig A, Gonzalez-Gaitan M, Huttner WB y Schmidt AA (2002). Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO J.* 21: 1661-72.
43. Bellen H J, O'Kane C J, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson R K y Gehring W J (1989). P-element-mediated enhancer detection: A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes and Development* 3: 1288-1300.

## **NUEVAS FUNCIONES PARA LAS FOSFOLIPASAS Y ACILTRANSFERASAS DE FOSFOLÍPIDOS: UNA BREVE REVISIÓN DE LAS FUNCIONES Y EL METABOLISMO DE FOSFOLÍPIDOS**

### **Resumen**

Los lípidos tradicionalmente han llamado poco la atención en el metabolismo intermedio y la señalización en eucariontes. Originalmente se estableció que funcionan como reservas de energía y como elementos estructurales de las membranas biológicas. En este trabajo resumimos de manera sucinta estas y otras funciones que hoy en día se conocen acerca de los lípidos en general, su clasificación y su estructura. Ponemos especial énfasis en los fosfolípidos que intervienen en la mayoría de las funciones descritas y describimos brevemente su estructura, su síntesis y degradación. Finalmente, discutimos las características de dos tipos de enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, las fosfolipasas y las aciltransferasas, y su participación en procesos sensoriales y de aprendizaje y memoria.

**Palabras clave:** fosfolípidos; fosfolipasa A<sub>2</sub>; aciltransferasa; aprendizaje; memoria.

## Semblanza del Dr Juan Rafael Riesgo Escovar



El Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar realizó sus estudios de Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM y el maestría y doctorado en la Universidad de Yale. Hizo una estancia postdoctoral en la Universidad de Zúrich y a partir de 1998 se incorporó al Instituto de Neurobiología de la UNAM en donde es investigador titular del Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología y miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel II. Su modelo de estudio es la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y los proyectos de investigación que está desarrollando son del área de la transducción de señales, en particular de la vía de la cinasa de Jun, y de la transducción sensorial. Ha sido merecedor de premios como la medalla Gabino Barreda al mejor promedio de su generación en la licenciatura y la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos 2004. Como fruto de su trabajo de investigación ha publicado 20 artículos en revistas internacionales con un total de 853 citas a sus trabajos, lo que demuestra la relevancia de los mismos. Ha impartido conferencias en diferentes instituciones en México y en otros países y ha dirigido 3 tesis de Licenciatura, dos de doctorado y actualmente dirige 4 de maestría y una más de doctorado.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## **PARTICIPACIÓN DE LOS ADRENOCEPTORES $\alpha_{1D}$ VASCULARES Y LA ANGIOTENSINA II EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

Rafael Villalobos-Molina<sup>1,2</sup>, Daniel Godínez-Hernández<sup>2,3</sup>,  
Itzell A. Gallardo-Ortiz<sup>2</sup>, Pedro López-Sánchez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, U.N.A.M.,  
Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, México.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur,

<sup>3</sup>Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, I.P.N..  
[villalobos@campus.iztacala.unam.mx](mailto:villalobos@campus.iztacala.unam.mx)

### **ROLE OF VASCULAR $\alpha_{1D}$ -ADRENOCEPTORS AND ANGIOTENSIN II ON ARTERIAL HYPERTENSION**

#### **Abstract.**

*$\alpha_1$ -Adrenoceptor stimulation produces vascular smooth muscle contraction. Angiotensin II (Ang II) induces contraction and increases  $\alpha_1$ -adrenoceptor expression in vascular smooth muscle cells. Furthermore, captopril (an inhibitor of angiotensin converting enzyme, ACEi) diminishes  $\alpha_1$ - responses in rat aorta. We explored captopril effects on  $\alpha_1$ -adrenoceptor expression (both mRNA and protein), and phenylephrine-induced contraction in aorta of normotensive Wistar Kyoto (WKY) and pre-hypertensive (SHR) 5 weeks-old rats, with or without captopril therapy (3mg/kg/day/7days) dissolved in drinking water. Functional responses showed that captopril did not modify agonist apparent affinity for the receptor present in aorta ( $-\log EC_{50} = pD_2$ ), neither antagonist affinity ( $pA_2 = -\log pK_b$ ) for BMY 7378 (a selective  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor antagonist,  $pA_2$ , 8.63-9.20 among groups). However, maximal effects to phenylephrine in aorta of captopril-treated SHR diminished  $\approx 50\%$ . Basal expression of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor mRNA is 35% higher in SHR than in WKY;  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor mRNA expression was higher in WKY, while  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor mRNA was similar among rat strains, and protein for  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors was not different among groups. Captopril diminished  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor mRNA expression 52% and 27% in SHR and WKY, respectively. Receptor protein was 48% higher in SHR than in WKY, and captopril therapy decreased it 45%.  $\alpha_{1A}$ -Adrenoceptor mRNA increased in captopril-treated*

*SHR, and the ACEi did not induce changes in  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor mRNA nor protein, neither in  $\alpha_{1A}$ -protein.*

*Data suggest that  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors are responsible for contraction in aorta of WKY and SHR at this age, and ACE inhibition diminishes  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors expression and function in pre-hypertensive SHR, probably by avoiding  $\alpha_{1D}$ - expression due to a lack of Ang II. These findings might be related to vascular changes that contribute to hypertension development.*

**Keywords:**  $\alpha_{1D}$ -Adrenoceptors, mRNA, protein, contraction, captopril, spontaneously hypertensive rats.

---

### **Introducción.**

La hipertensión es una enfermedad caracterizada por un aumento en la resistencia vascular periférica (1), esta alteración en la presión es el factor de riesgo mas importante para las enfermedades cardiovasculares, y es probablemente también el problema de salud pública más importante en las naciones industrializadas (2). Actualmente ocupa el primer lugar de las causas de morbilidad y de mortalidad en México (3) con un 25% de las muertes registradas, afectando principalmente a las personas de edad madura y ancianos (4). A pesar de la gran cantidad de investigaciones realizadas sobre el tema, no se conocen los eventos que conducen al desarrollo de la hipertensión arterial; sin embargo, en el ámbito vascular se han propuesto tres factores involucrados en la patogénesis de esta condición: 1) hipersensibilidad de los vasos sanguíneos a estímulos vasoconstrictores, 2) cambios estructurales en las paredes de los vasos sanguíneos y 3) disfunción endotelial (1,2), aunque es bien conocida la participación de otros órganos como el corazón, el riñón y el sistema nervioso central (5).

Los cambios estructurales pueden ser un fenómeno de adaptación, en el cual la pared arterial se engruesa en respuesta al aumento en la presión arterial (1) y, como consecuencia, la hipertensión predispone al individuo a otras enfermedades cardiovasculares, como son: infarto del miocardio, accidente vascular cerebral, falla renal y aceleración de la aterosclerosis (2, 5).

En la respuesta a la noradrenalina, se ha sugerido a la hipersensibilidad del músculo liso vascular, como un elemento involucrado en la elevación y el mantenimiento de la presión arterial, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)<sup>1</sup>. No se conoce si este fenómeno está relacionado con un incremento en el número o en la afinidad de los adrenoceptores  $\alpha_1$ , con predominancia de alguno de los diferentes subtipos o con cambios en los eventos post-receptor, pues existe controversia en los resultados experimentales, ya que se han descrito: aumentos, disminuciones o inclusive, no cambios en la respuesta contráctil a la noradrenalina.

Por otra parte, la disfunción endotelial presupone la disminución de los factores relajantes de la hipertensión [óxido nítrico (NO), prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina, PGI<sub>2</sub>) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)] y el aumento de los factores contráctiles [prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) y otros prostanoides] en la hipertensión, lo que implica la desregulación del tono vascular (6).

---

<sup>1</sup> del inglés: spontaneously hypertensive rat

Las catecolaminas noradrenalina y adrenalina se comportan como neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) y como hormona en los tejidos periféricos, respectivamente (7). Las acciones de estas aminas están mediadas por una variedad de receptores de membrana, miembros de la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembranales, designados: adrenoceptores  $\alpha$  y  $\beta$ . Los adrenoceptores  $\beta$  se dividen en tres subtipos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ ) y se consideran isorreceptores en la transducción hormonal, ya que generan la misma señal intracelular (incremento en el AMP cíclico), al estimular a la adenilil ciclasa vía una proteína  $G_s$ ; mientras que los adrenoceptores  $\alpha$  se dividen en dos familias ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ), son heterorreceptores pues los  $\alpha_2$  disminuyen los niveles de AMP cíclico, al inhibir a la adenilil ciclasa vía una proteína  $G_i$ , y los  $\alpha_1$  actúan por medio de la estimulación de una fosfolipasa C, vía una proteína  $G_{q/11}$ , generando inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG), los cuales movilizan  $Ca^{2+}$  intracelular y activan a la proteína cinasa C (PKC), respectivamente (7). Adicionalmente, se han descrito alteraciones en las respuestas  $\alpha$ - adrenérgicas en los diferentes modelos de hipertensión y en los diferentes tejidos estudiados (8). Así se tiene que, en la mayoría de los casos, no se conoce si estas alteraciones: 1) contribuyen al desarrollo o mantenimiento de la hipertensión; 2) se presentan en respuesta a un aumento en la presión sanguínea o 3) no están relacionados con el aumento en la presión arterial (1, 8).

La Angiotensina II (Ang II) tiene una función importante en la regulación de la presión arterial, a través de su síntesis sistémica vía el sistema renina-angiotensina (RAS). La Ang II actúa directamente sobre el músculo liso vascular como un potente vasoconstrictor, por estimulación de los receptores  $AT_1$ . Indirectamente afecta la contractilidad y la frecuencia cardiaca al incrementar el tono del sistema nervioso simpático, esto es, modula la liberación facilitada de noradrenalina presináptica (9). Así, se ha reportado que los componentes de RAS, como la actividad de renina plasmática, el angiotensinógeno plasmático y la liberación renal de renina pueden estar aumentados en ratas SHR jóvenes y pueden contribuir a la patogénesis de la hipertensión genética (10-12).

En el sistema cardiovascular los adrenoceptores  $\alpha_1$  regulan la contracción cardiaca y arterial y han sido implicados en procesos patológicos como la hipertrofia cardiaca o las arritmias inducidas por isquemia (13-15). En las arterias de las ratas, se ha detectado la presencia de RNAm para los tres adrenoceptores  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$ ), lo que demuestra que los genes de estos adrenoceptores se expresan (16, 17); sin embargo, al usar radioligandos como marcadores, en estudios funcionales y usando anticuerpos contra los adrenoceptores  $\alpha_1$ , para detectar la presencia de dichos adrenoceptores en membrana, se sabe que sólo 1 o 2 de los adrenoceptores  $\alpha_1$  predominan para la contracción del músculo liso vascular (18-20). En este sentido, los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  se expresan funcionalmente en las arterias aorta, carótida, mesentérica, iliaca, femoral y renal, donde median la contracción inducida por agentes adrenérgicos (21-26) y su expresión funcional *in vivo* tiene un importante papel en el control de la presión arterial (20, 27, 28). Además, en las arterias que expresan el subtipo  $\alpha_{1D}$  como predominante para las respuestas contráctiles, pero no en los vasos sanguíneos que expresan al  $\alpha_{1A}$ , se ha demostrado que existe una población de receptores constitutivamente activos (es decir, los receptores no requieren noradrenalina para ser estimulados), lo que sugiere que los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  ejercen un papel modulador en las arterias de conductancia, evitando cambios súbitos en el diámetro arterial cuando se remueve el agonista, manteniendo el flujo

sanguíneo (22, 29). La evidencia actual muestra que los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  vasculares están funcionalmente relacionados con la génesis y/o el mantenimiento de la hipertensión y parecen estar presentes en la vasculatura antes de que se establezca la hipertensión, por lo que se ha sugerido que hay un aumento en la población de esos receptores constitutivamente activos y que son los responsables de la patología y del alto tono simpatoadrenal en las ratas SHR (14, 20, 25, 30, 31).

En el nivel vascular, muchas investigaciones han tratado de explicar la relación entre el sistema renina-angiotensina (RAS) y las vías adrenérgicas periféricas y su papel en la génesis de la hipertensión. Así, Schiffrin y cols. (32) mostraron un aumento en la Ang II y en los adrenoceptores  $\alpha_1$  en la vasculatura de ratas SHR antes del desarrollo de la hipertensión (4 semanas de edad). *In vivo*, el efecto estimulador de Ang II sobre la síntesis de DNA en células de músculo liso vascular, disminuyó con el co-tratamiento con prazosina, el antagonista de los adrenoceptores  $\alpha_1$  (33). Otras aproximaciones han mostrado que el captopril (un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ECA) en altas dosis inhibe la hipersensibilidad anormal, en los vasos de resistencia, a la fenilefrina (12, 34). Además, el bloqueo de RAS por inhibidores de la ECA o los antagonistas de los receptores  $AT_1$  en el periodo juvenil crítico puede atenuar, o aún, prevenir el desarrollo de la hipertensión (31, 35-38). Recientemente se describió que los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  activos constitutivamente desaparecen por la terapia con captopril (31). Por otro lado, la Ang II induce la expresión de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  en células aisladas de músculo liso vascular de la aorta de rata (11) y ellos favorecen el aumento en la síntesis de proteínas (39), sugiriendo que estos 2 sistemas pueden estar relacionados entre sí ("cross talk") y con la génesis de la hipertensión.

Así, planteamos como hipótesis que el captopril, al interferir con la producción de Ang II, disminuye la expresión y la función de los adrenoceptores vasculares  $\alpha_{1D}$  en las ratas jóvenes, pre-hipertensas SHR y que la incubación con Ang II de la aorta de ratas normotensas Wistar, favorecería la expresión de los adrenoceptores  $\alpha_1$ , principalmente del subtipo  $\alpha_{1D}$ .

De esta manera, los objetivos que nos planteamos fueron: caracterizar el efecto del captopril sobre: *i*) la respuesta contráctil adrenérgica  $\alpha_1$ ; *ii*) la expresión del ARNm (mensajero del ácido ribonucleico) que codifica para los adrenoceptores  $\alpha_1$ ; *iii*) sobre la expresión de la proteína  $\alpha_1$  en aorta de ratas normotensas WKY y SHR pre-hipertensas de 5 semanas de edad.

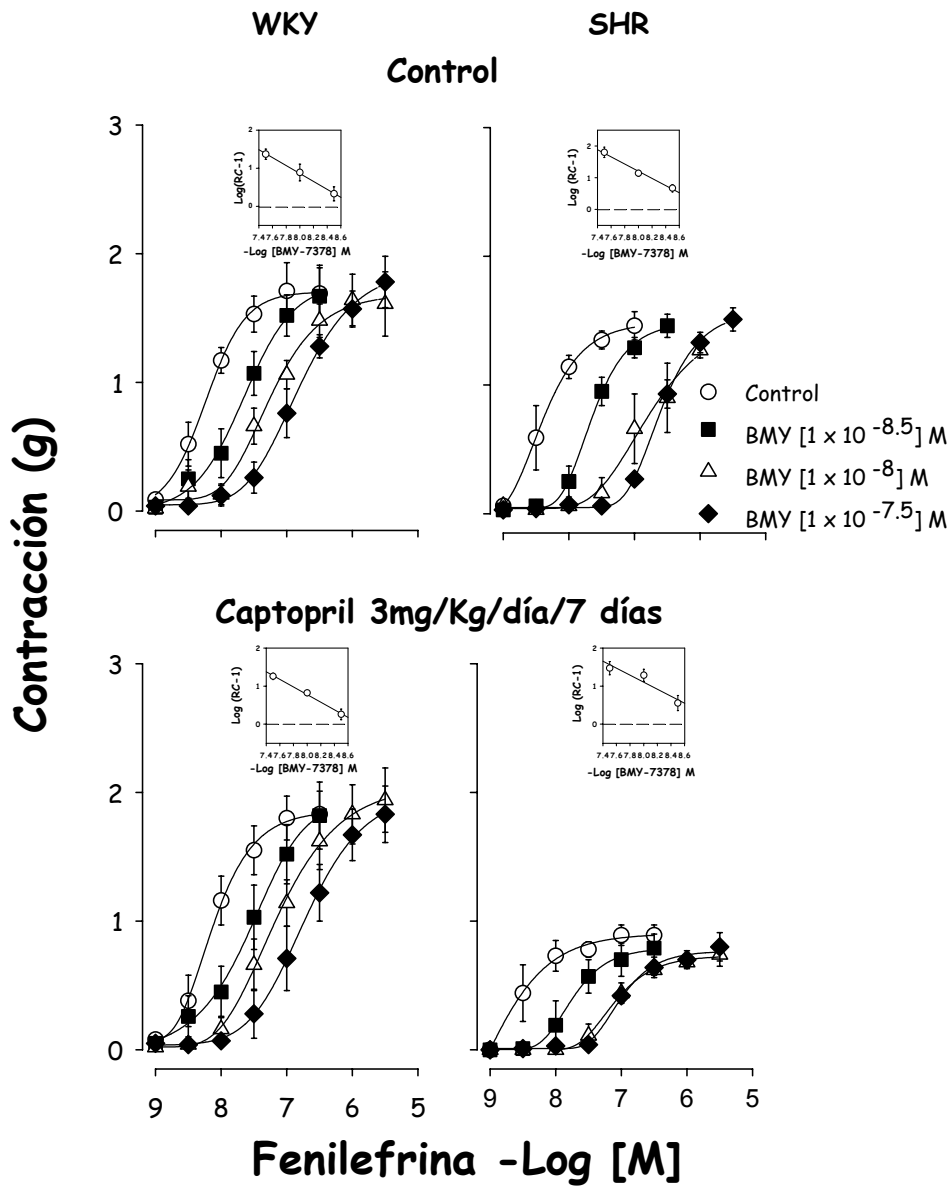
#### **Resultados.**

El captopril no modificó la afinidad aparente ( $-\log EC_{50} = pD_2$ , Tabla 1) a la fenilefrina en la aorta, así como tampoco la afinidad (valores de  $pA_2 = -\log pK_b$  del antagonista, obtenidos por análisis de Schild) del BMY-7378<sup>2</sup> en la aorta (Tabla 1). El BMY-7378 tuvo alta afinidad ( $pA_2$ , 8.63-9.20 entre los grupos) por los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$ , de la aorta de ambas cepas de ratas (Figura 1, Tabla 1) y el RS17053 y la ciclazosina (antagonistas selectivos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , respectivamente), tuvieron baja afinidad (datos no mostrados), lo cual sugiere que no hay participación funcional de estos adrenoceptores en la respuesta contráctil. De manera

---

<sup>2</sup> (un antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$ )

interesante, los efectos máximos a la fenilefrina en la aorta de ratas SHR tratadas con captopril disminuyeron  $\approx 50\%$ , sin presentarse cambios en las ratas WKY.



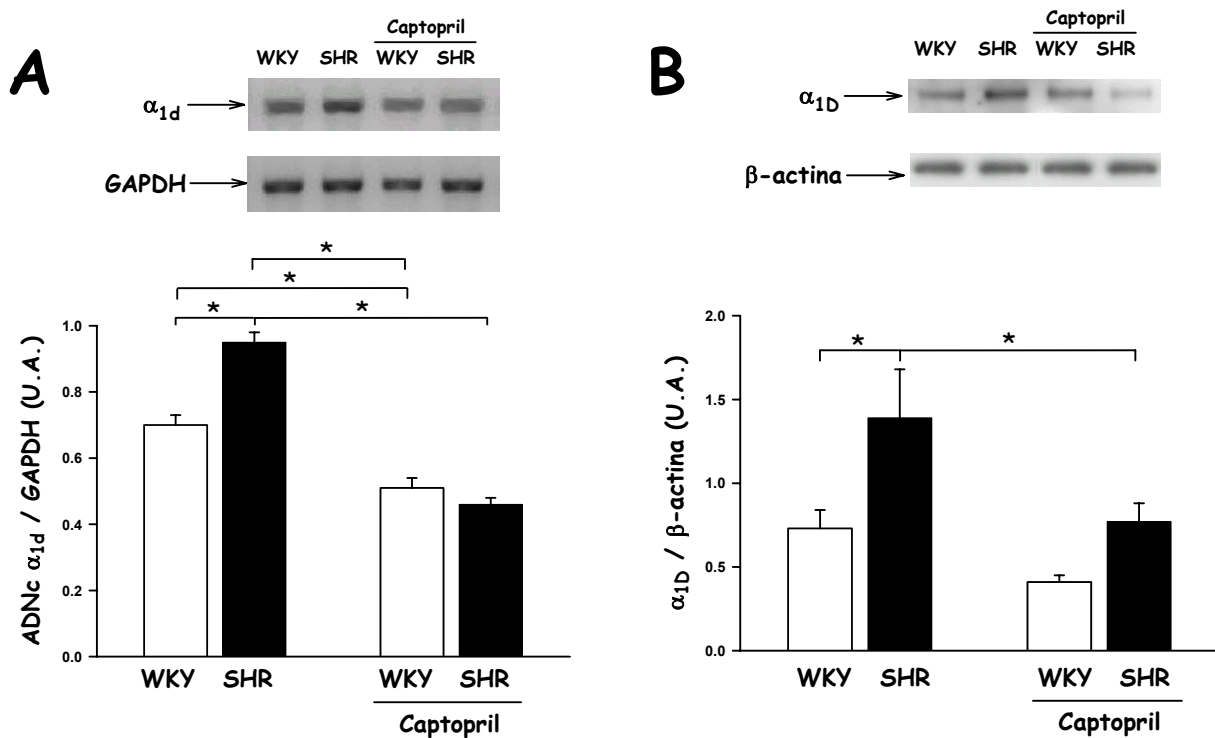
**Figura 1.** Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild ( $pA_2$ ), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY 7378, en arteria aorta de ratas WKY y SHR de 5 semanas, tratadas y no tratadas con captopril.



**Tabla 1.**  $E_{max}$  (g),  $pD_2$  (afinidad aparente a fenilefrina) y  $pA_2$  (afinidad a BMY 7378), en aorta aislada de ratas WKY y SHR de 5 semanas de edad, control y tratadas con captopril (3 mg/Kg/día durante 1 semana).

	Ratas WKY		Ratas SHR	
	control	Captopril	control	Captopril
$pD_2$	$8.37 \pm 0.15$	$8.08 \pm 0.21$	$8.40 \pm 0.11$	$8.41 \pm 0.17$
$E_{max}$ (g)	$1.69 \pm 0.31$	$1.83 \pm 0.23$	$1.46 \pm 0.11$	$0.89 \pm 0.1^*$
$pA_2$	8.8	8.3	9.1	9.2

\* $p < 0.05$  vs las ratas SHR control. Los valores son el promedio  $\pm$  e.s. de 4 experimentos por grupo.



**Figura 2.** ADNc que codifica para el receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  (obtenido del ARN<sub>m</sub> por RT-PCR; Panel A) y receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  (Western Blot; panel B) de aorta de ratas WKY y SHR de 5 semanas, tratadas y no tratadas con captopril. En la parte superior se observan muestras representativas del ADNc del receptor y del gen de referencia (GAPDH), así como, del receptor y la proteína de referencia ( $\beta$ -actina). \*  $p < 0.05$  Student Newman-Keuls.

En la aorta, de manera basal, se observó una mayor expresión del ARNm que codifica para el adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  en las ratas SHR en comparación con las ratas WKY y el tratamiento con captopril disminuyó la expresión de este ARNm en ambas ratas (Figura 2, panel A), sin existir correlación funcional en los animales WKY; esta disminución en la expresión fue más notable en SHR ( $\approx 50\%$ ), mientras que fue menor en WKY ( $\approx 27\%$ ). Al determinar la proteína de los adrenoceptores  $\alpha_1$  se observó una mayor abundancia del adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  en SHR de manera basal, mientras que el tratamiento con captopril la disminuyó ( $\approx 50\%$ ). Además existe una tendencia a disminuir el receptor en WKY tratada con captopril, sin observarse ninguna diferencia estadísticamente significativa (Figura 2, panel B).

### Discusión.

La hipótesis de que los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  vasculares participan en la génesis y/o el mantenimiento de la hipertensión, se basa en: a) el adrenoceptor se ha detectado solo en vasos sanguíneos (16, 19, 25, 26); b) predomina para la contracción de varias arterias aisladas de SHR (14, 18, 25, 31, 42); c) participa en el mantenimiento del tono presor y aparece con la edad (20, 27, 28); d) está presente en la vasculatura de ratas pre-hipertensas (20); e) parece existir una población de adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  constitutivamente activa en arterias de SHR (22, 29, 31), y f) su ausencia genera ratones hipotensos (15).

Se conoce que el bloqueo del sistema nervioso simpático (SNS) durante periodos cortos del desarrollo de SHR produce reducciones en la presión arterial de largo plazo y que la simpatectomía temprana en combinación con prazosina (un antagonista  $\alpha_1$ ), previene completamente la hipertrofia cardíaca (43). Además, la estimulación de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  por noradrenalina, en células aisladas de aorta de rata e *in vivo*, produce hipertrofia (39, 44, 45). Estos reportes indican que al nivel vascular, la presencia y estimulación de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  pueden tener 2 implicaciones en la hipertensión: la hipersensibilidad a los agentes vasoconstrictores y la hipertrofia del músculo liso vascular; estos efectos pueden potenciar efectos similares en la estimulación por Ang II en la hipertensión genética. Estas interacciones pueden ser explicadas, en parte, si los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  existen en gran cantidad en SHR y muestran actividad constitutiva; situación en la que los antagonistas clásicos se comportan como agonistas inversos, es decir disminuyen la actividad del receptor al cambiarlo a su estado inactivo (31, 46). Adicionalmente, coexisten gran cantidad de sitios de unión para Ang II con un incremento en la densidad de adrenoceptores  $\alpha_1$  en la arteria mesentérica de SHR de 4 semanas de edad (32).

D'Ocón y colaboradores reportaron un dato muy interesante, donde la terapia crónica con captopril (50 mg/kg/día, durante 10 semanas), en SHR jóvenes y hasta alcanzar la etapa adulta, evitó el desarrollo de la hipertensión. De manera interesante, las arterias donde predominan los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  no mostraron incremento en el tono basal (ITB) posterior a la adición de calcio — una medida de la actividad constitutiva de esos adrenoceptores (29, 31) —; además el análisis de afinidad para el BMY 7378 (un antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$ ) en esas arterias dio valores bajos:  $pIC_{50}$ , 6.43-7.02, indicando que el subtipo  $\alpha_{1D}$  no está presente en esas arterias (31). Sin embargo, los autores mencionan que la ausencia de ITB se debió a la ausencia de hipertensión, aunque la respuesta también se observó en la rata normotensa WKY, control de la SHR. Resulta claro que la inhibición de la ECA durante 10 semanas, con una dosis alta de

captopril evitó la expresión de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  en las arterias aorta, iliaca y mesentérica en ambas cepas de ratas; mientras que las arterias que expresan a los adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  (caudal y mesentéricas de pequeño calibre) no se modificaron por la terapia (31).

La observación de que la Ang II incrementa el ARNm y la expresión de proteína de los adrenoceptores  $\alpha_1$  en células de músculo liso de aorta de rata (47), sugiere que la inhibición de la ECA, por dosis baja de captopril, puede disminuir la expresión y la función de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$ . Basados en esta interpretación y los resultados de Gisbert y cols. (31), más los obtenidos en este estudio, proponemos una nueva hipótesis: “ la Ang II facilita la hipertensión, indirectamente por estimulación de la expresión y función de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  vasculares, y estos receptores pueden estar involucrados en la hipersensibilidad y la hipertrofia de los vasos sanguíneos”.

Si esa hipótesis es correcta, entonces los ratones deficientes (“knockout”) del receptor para aryl-hidrocarbonos la confirmarán, ya que esos ratones muestran niveles circulantes altos de Ang II, hipertensión e hipertrofia cardiaca (48). Así, se espera que la aorta (en donde existe una predominancia de adrenoceptores  $\alpha_{1D}$ ) responderá con un efecto máximo mayor a los agonistas y mayor será el contenido de ARNm y proteína del subtipo  $\alpha_{1D}$ , comparado con el tipo silvestre.

### **Materiales y métodos.**

#### *Grupos experimentales:*

Se emplearon ratas macho Wistar Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR) de 4 semanas de edad. Los animales se almacenaron en cajas individuales y se dividieron en 4 grupos: WKY + agua, WKY + captopril (3mg/kg/día durante 7días), SHR + agua y SHR + captopril (3mg/kg/día durante 7días). Las ratas se pesaron diario para ajustar la dosis.

Todos los procedimientos se ejecutaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Manejo de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura) y fueron aprobados por el Comité Institucional.

#### *Participación de los adrenoceptores $\alpha_1$ en la respuesta contráctil.*

Los animales se sacrifican y la aorta se diseca, se limpia de tejido conectivo y grasa y se corta en anillos (4-5 mm de longitud), se desnudan de endotelio y se montan en ganchos de nikrom, para fijarlos al fondo de la cámara y a un transductor de tensión isométrica Grass FT03 (Astro-Med, West Warwick, RI, EUA), conectado a un sistema MP100 de adquisición de datos (Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, EUA), para registrar la tensión desarrollada por los anillos aórticos. Las arterias fueron sumergidas en solución Krebs a un pH de 7.4, a una temperatura de 37°C y gaseadas continuamente con  $O_2/CO_2$  (19:1). Los anillos aórticos se sometieron a una tensión inicial de 3 g y se pre-estimularon 3 veces con fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ ) a una concentración sub-máxima ( $3.1 \times 10^{-7}$  M). Se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M), en anillos de aorta torácica, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY-7378 (antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$ ,  $1 \times 10^{-8.5}$  a  $1 \times 10^{-7.5}$  M), en presencia de rauwolscina y propranolol ( $1 \times 10^{-7}$  M, cada uno), para antagonizar a los adrenoceptores  $\alpha_2$  y  $\beta$ , respectivamente. Los valores de pA2 y las pendientes se obtienen por

análisis de Schild (40). Las soluciones se prepararon diariamente y las concentraciones o dosis se calcularon como la base libre de cada sustancia.

*Cuantificación relativa del ARNm de los adrenoceptores  $\alpha_1$  en la aorta de rata.*

Para determinar la expresión del ARNm que codifica para los adrenoceptores  $\alpha_1$ , se utilizó la técnica de RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa). El ARN total se extrajo de la aorta con TRIZOL (Gibco Life Technologies), la transcripción reversa se hizo en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l conteniendo 1  $\mu$ g ARN, 1  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (10 mM), 2  $\mu$ l de buffer para PCR (10x), 1  $\mu$ l Oligo(dT)12-18 (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2  $\mu$ l ditiotreitól (0.1 M), 1  $\mu$ l (200 unidades) de SuperScript II RT (Gibco). Después de la síntesis de la primera cadena de ARN, se amplificaron 2  $\mu$ l de ADNc empleando "primers" específicos para cada adrenoceptor  $\alpha_1$  (17). Para la amplificación del ADNc del adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  la secuencia sentido es 5'-GTA GCC AAG AGA GAA AGC CG-3' (de las bases 628 a 647) y la secuencia antisentido es 5'-CAA CCC ACC AVG ATG CCC AG-3'; para la amplificación del adrenoceptor  $\alpha_{1B}$  la secuencia sentido es 5'-GCT CCT TCT ACA TCC CGC TCG-3' (de las bases 629 a 649) y la secuencia antisentido es 5'-AGG GGA GCC AAC ATA AGA TGA-3' (de las bases 908 a 926); para la amplificación de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  la secuencia sentido es 5'-CGT GTG CTC CTT CTA CCT ACC-3' (de las bases 759 a 779) y la secuencia antisentido es 5'-GCA CAG GAC GAA GAC ACC CAC-3' (de las bases 1042 a 1062). En cada muestra se amplificó el ADNc de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia y se usó para normalizar los productos de amplificación (41); la secuencia sentido es 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (de las bases 562 a 581) y la secuencia antisentido es 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (de las bases 1013 a 1032). La PCR se desarrolló con un kit para PCR (Gibco) y con un termociclador (Gene Cycler, Bio-Rad) a 42 °C por 50 min. La reacción se inactivó a 70 °C por 15 min. Después de la amplificación, los productos de PCR se corrieron en una electroforesis sobre gel de agarosa al 2%, durante 1 h a 100 V. Las bandas correspondientes a los adrenoceptores  $\alpha_1$  (304 bps de longitud) se visualizaron con bromuro de etidio y luz UV y se digitalizaron con una cámara Kodak: las intensidades de las bandas se midieron por densitometría, usando el software Quantity One 1-D Image Analysis (Bio-Rad).

*Cuantificación relativa de las proteínas  $\alpha_1$  en la aorta de rata*

Se aisló la aorta y se homogenizó con un Polytron (Kinematica AG Littau, Suiza) en solución Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford. La proteína se desnaturalizó (100 °C por 10 min) con  $\beta$ -mercaptoetanol y se cargaron (15  $\mu$ g/carril) en un gel de SDS-PAGE al 10% de acrilamida, se sometió a electroforesis a 88 V por 2 h y se electro-transfirió a una membrana de PVDF por 45 min a 15 V, usando un Semi-Dry Transfer Blot (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con solución al 5% de leche (baja en grasa) por 1 h y se incubaron con anticuerpos policlonales de cabra anti adrenoceptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$  o anticuerpos policlonales de conejo anti  $\beta$ -actina (Santa Cruz), diluidos 1:200 y 1:1000, respectivamente, en solución de lavado a 4°C durante la noche. Las membranas se lavaron 3 veces, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-cabra o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano (1:1000) por 2 h a temperatura ambiente y lavadas extensivamente. Las membranas se incubaron con reactivo quimioluminiscente (Amersham Biosciences) y se expusieron a un filme que se reveló inmediatamente. El filme se escaneó con un ScanJet 3200C (Hewlett Packard) y la intensidad de las bandas se midió con el software Quantity-One.

## Agradecimientos

Apoiado parcialmente por el proyecto PAPIIT IN203205-3 y por la Fundación Miguel Alemán, A.C. (RV-M). DG-H es becario doctoral de CONACYT.

## Referencias.

- 1 Marín, J. (1993). Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J. Auton. Pharmacol.* 13: 127-176.
- 2 Williams, G.H. and Braunwald, E. (1994) Harrison's Internal Medicine McGraw-Hill, pp. 1024-1037.
- 3 Secretaría de Salud, México: <http://www.salud.gob.mx/>
- 4 Timiras, P.S. (1995). Definitions, Evolution and Theories, en Hormones and Aging (P.S. Timiras, W.D. Quay and A. Vernadakis, eds.) CRC press, pp. 3-22, 1995.
- 5 Hollenberg, (2000). Hypertension: Mechanisms and Therapy, en Atlas of Heart Diseases, E. Braunwald, Bristol-Myers Squibb.
- 6 de Artiñano A.A., López-Miranda González V. (1999) Endotelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction, *Pharmacol. Res.* 40: 113-124.
- 7 Hoffman, BB. (2001). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists, en Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill pp. 199-248.
- 8 Takata, Y. y Kato, H. (1996). Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life.Sci.* 58: 91-106.
- 9 Weir M. R. y V. J.Dzau (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 12(12 Pt 3): 205S-213S.
- 10 Henrich W.L., y M. Levi (1991). Ontogeny of renal rennin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Am J Physiol.* 260: F530-F535.
- 11 Hu, Z.W., X.Y. Shi, M. Okazaki y B.B. Hoffman (1995). Angiotensin II induces transcription and expression of alpha-1 adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 268: H1006-1014.
- 12 Zicha, J. y J. Kuneš (1999). Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.* 79 (4):1227-1282, 1999.
- 13 García-Sáinz, J.A., J. Vázquez-Prado y R. Villalobos-Molina (1999).  $\alpha_1$ -Adrenoceptor subtypes, signaling and roles in health and disease. *Arch Med Res.* 30: 449-458.
- 14 Guimaraes, S. y D. Moura (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 53: 319-356.
- 15 Tanoue, A., Y. Nasa, T. Koshimizu, H. Shinoura, S. Oshikawa, T. Kawai, S. Sunada, S. Takeo y G. Tsujimoto (2002). The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest.* 109: 765-75.
- 16 Piascik, M.T., M.S. Smith, E.E. Soltis y D.M. Perez (1994). Identification of the mRNA for the novel  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor and two other  $\alpha_1$ -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 46: 30-40.
- 17 Scofield, M.A., F. Liu, P.W. Abel y W.B. Jeffries (1995). Quantification of steady state expression of mRNA for alpha.1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther.* 275: 1035-1042.
- 18 Ibarra, M., J.P. Pardo, J.J. López-Guerrero y R. Villalobos-Molina (2000). Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of  $\alpha_{1D}$ - or  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors in contraction. *Br J Pharmacol.* 129: 653-660.
- 19 Piascik, M.T., R.D. Guarino, M.S. Smith, E.E. Soltis, D.L. Saussy, Jr. y D.M. Perez (1995). The specific contribution of the novel  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 275: 1583-1589.
- 20 Villalobos-Molina, R., J. J. López-Guerrero y M. Ibarra (1999). Functional evidence of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 126: 1534-1536.

- 21 Arévalo-León, L.E., I.A. Gallardo-Ortíz, H. Urquiza-Marín y R. Villalobos-Molina (2003). Evidence for the role of  $\alpha_{1D}$ - and  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors in contraction of the rat mesenteric artery. *Vasc Pharmacol.* 40: 91-96.
- 22 Gisbert, R., M.A. Noguera, M.D. Ivorra y P. D'Ocon (2000). Functional evidence of a constitutively active population of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 295:810-817.
- 23 Gómez-Zamudio, J., M.L., Lázaro-Suárez, R., Villalobos-Molina y H. Urquiza-Marín (2002). Evidence for the use of agonists to characterize  $\alpha_1$ -adrenoceptors in isolated arteries of the rat. *Proc Western Pharmacol Soc.* 45: 159-160.
- 24 Salomonsson, M., K. Brannstrom y W.J. Arendshorst (2000). Alpha-1 adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol.* 278: F138-F147.
- 25 Villalobos-Molina, R. y M. Ibarra (1996).  $\alpha_1$ -Adrenoceptors that mediate contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the  $\alpha_{1D}$  or  $\alpha_{1A}$  subtypes. *Eur J Pharmacol.* 298: 257-263.
- 26 Villalobos-Molina, R., J.J. López-Guerrero y M. Ibarra (1997).  $\alpha_{1D}$ - and  $\alpha_{1A}$ -Adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur J Pharmacol.* 322: 225-227.
- 27 Ibarra, M., J.A. Terrón, J.J. López-Guerrero y R. Villalobos-Molina (1997). Evidence for an age-dependent change in functional expression of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in the pithed rat. *Eur J Pharmacol.* 322: 221-224.
- 28 Zhou, L. y H.M. Vargas (1996). Vascular alpha-1D adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. *Eur J Pharmacol.* 305:173-176.
- 29 Ziani, K., R. Gisbert, M.A. Noguera, M.D. Ivorra y P. D'Ocon (2002). Modulatory role of a constitutively active population of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in conductance arteries. *Am J Physiol.* 282: H475-H485.
- 30 García-Sáinz, J.A. y R. Villalobos-Molina (2004). The elusive  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *Eur J Pharmacol.* 500: 113-120.
- 31 Gisbert, R., K. Ziani, R. Miquel, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, E. Anselmi y P. D'Ocon (2002). Pathological role of a constitutively active population of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 135: 206-216.
- 32 Schiffrin, E.L., F.S. Thomé y J. Genest (1984). Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension.* 6: 682-688.
- 33 van Kleef E.M., J.F.M. Smits, J.G.R. De Mey, J.P.M. Cleutjens, D.M. Lombardi, S.M. Schwartz y M.J.A.P. Daemen (1992).  $\alpha_1$ -adrenoceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circulation Res.* 70: 1122-1127.
- 34 Chen, D.G., X. Q. Jin, H. J. Wang y S. C. Chen (1995). Mechanisms responsible for sustained hypotension after captopril treatment. *J Hypertension* 13: 1113-1121.
- 35 Bergström, G, I. Johansson, A. Wickman, L. Gan y C. Thorup (2002). Brief treatment in young spontaneously hypertensive rats abates long-term blood pressure elevation by effects on renal vascular structure. *J Hypertension* 20: 1413-1421.
- 36 Harrap, S.B., W.M. Van der Merge, S.A. Griffin, F. MacPherson, y A.F. Lever (1990). Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension* 16: 603-614.
- 37 Morton, J.J., E.C. Beattie, y F. MacPherson (1992). Angiotensin II receptor antagonist losartan has persistent effects on blood pressure in the young spontaneously hypertensive rat: lack of relation to vascular structure. *J Vasc Res.* 29: 264-269.
- 38 Paull, J.R.A. y R.E. Widdop (2001). Persistent cardiovascular effects of chronic renin-angiotensin system inhibition following withdrawal in adult spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 19: 1393-1402.
- 39 Xin, X., N. Yang, A.D. Eckhart y J.A. Faber (1997).  $\alpha_{1D}$ -Adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 51: 764-775.
- 40 Arunlakshana, O. y H.O. Schild (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol.* 14: 48-58.
- 41 Chen, G., M. Kamal, R. Hannon y T.D. Warner (1998). Regulation of cyclo-oxygenase in rat smooth muscle cells by catalase. *Biochem Pharmacol.* 55: 1621-1631.

- 42 Ibarra, M., J. J. López-Guerrero y R. Villalobos-Molina (1998). Further evidence of the predominance of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Rev Comm.* 10: 135-142.
- 43 Korner, P., A. Bobik, C. Oddie y P. Friberg (1993). Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension* 22: 243-252.
- 44 Chen, L.Q., X. Xin, A.D. Eckhart, N. Yang y J.E. Faber (1995). Regulation of vascular smooth muscle growth by  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes *in vitro* and *in situ*. *J Biol Chem.* 270: 30980-30988.
- 45 Erami, C., H. Zhang, J.G. Ho, D.M. French y J.E. Faber (2002).  $\alpha_1$ -Adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall *in vivo*. *Am J Physiol.* 283: H1577-H1587.
- 46 García-Sáinz, J.A. y M.E. Torres-Padilla (1999). Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha-1 adrenoceptors. *FEBS Lett.* 443: 277-281.
- 47 Hu, Z.W., X.Y. Shi, M. Okazaki and B.B. Hoffman,(1995). Angiotensin II induces transcription and expression of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 268:H1006-H1014.
- 48 Lund, A.K., M.B. Goens, N.L. Kanagy y M.K. Walker (2003). Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1 and mean arterial blood pressure. *Toxicol Applied Pharmacol.* 193: 177-187.

## **PARTICIPACIÓN DE LOS ADRENOCEPTORES $\alpha_{1D}$ VASCULARES Y LA ANGIOTENSINA II EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

### **Resumen.**

La estimulación de los adrenoceptores  $\alpha_1$  produce contracción del músculo liso vascular. La angiotensina II induce también contracción y favorece la expresión de los adrenoceptores  $\alpha_1$  en células de músculo liso vascular. Además, el captopril (un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ECA) disminuye la respuesta  $\alpha_1$  en la aorta de rata. Se exploraron los efectos del captopril sobre la expresión (ARNm y proteína) de los adrenoceptores  $\alpha_1$  y la contracción muscular inducida por fenilefrina en la aorta de ratas normotensas (WKY) y pre-hipertensas (SHR) de 5 semanas de edad, con y sin tratamiento con captopril (3mg/kg/día durante 7 días), administrado en el agua de bebida. Los resultados funcionales mostraron que el captopril no modificó la afinidad aparente ( $-\log EC_{50} = pD_2$ ) por el agonista fenilefrina, ni la afinidad ( $pA_2 = -\log pKb$ ) del antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$  BMY-7378 ( $pA_2$ , 8.63-9.20 entre los grupos). Sin embargo, los efectos máximos a la fenilefrina en aorta de SHR tratadas con captopril disminuyeron 50%. La expresión basal del ARNm  $\alpha_{1D}$  es 35% mayor en SHR que en WKY; la expresión del ARNm de los adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  fue mayor en WKY, mientras que la expresión del ARNm de los adrenoceptores  $\alpha_{1B}$  fue similar en ambas cepas de ratas; la proteína para los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  también fue similar para ambos grupos. El captopril disminuyó la expresión del adrenoceptor  $\alpha_{1D}$  52% y 27% en SHR y WKY, respectivamente. El receptor se expresó 48% más en SHR que en WKY y el tratamiento con captopril la disminuyó 45%. El ARNm del adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  se incrementó en la SHR y no se observó efecto del captopril en el ARNm y la proteína del subtipo  $\alpha_{1B}$  ni en la proteína del  $\alpha_{1A}$ .

Estos datos sugieren que el adrenoceptor responsable de la contracción en la aorta de WKY y SHR de 5 semanas es el  $\alpha_{1D}$  y que al inhibir la ECA con captopril, disminuye la expresión y la función de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  en la aorta de ratas pre-hipertensas SHR, probablemente al evitar la expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$  por ausencia de angiotensina II. Estos hallazgos pueden

estar relacionados con los cambios vasculares que contribuyen al desarrollo de la hipertensión arterial.

**Palabras clave:** Adrenoceptores  $\alpha_{1D}$ , ARNm, proteína, contracción, captopril, ratas espontáneamente hipertensas

## Semblanza del Dr. Rafael Villalobos-Molina



Rafael Villalobos-Molina ingresó a la Facultad de Ciencias de la UNAM y se graduó como biólogo en 1979. Sus estudios de posgrado los realizó en la misma institución, obteniendo el grado de Maestro en Ciencias en 1982 y de Doctor en Ciencias en 1989, este último con Mención Honorífica. Desde entonces ha estado interesado en el papel de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en la contracción del músculo liso vascular. Ha realizado estancias de investigación en Philadelphia (Hahnemann

University School of Medicine), Baltimore (Gerontology Research Center), Boston (Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University) y Morelia (Inst. Inv. Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo).

Ha desempeñado diversos cargos dentro y fuera de la UNAM desde 1977: Técnico académico en el Inst. Biología, UNAM; Profesor de asignatura en la Fac. Medicina, UNAM; investigador en el Depto. Farmacobiología del CINVESTAV-IPN y actualmente se desempeña como Coordinador de la Unidad de Biomedicina, en la Fac. Estudios Superiores-Iztacala, UNAM.

El Dr. Villalobos-Molina ha publicado 84 artículos de investigación original y 10 artículos de difusión. Asimismo ha impartido 34 cursos de licenciatura y posgrado en diferentes instituciones nacionales, ha dirigido 12 tesis de licenciatura (más 2 en proceso), 15 de maestría (más 7 en proceso) y 5 de doctorado (más 7 en proceso).

Su principal área de investigación se centra en la caracterización y papel funcional de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Su grupo de trabajo fue el primero en demostrar que los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  que se expresan en diversas arterias desempeñan una importante función en el control de la presión arterial, hallazgo que ha servido de base para otros grupos de investigación de diversas partes del mundo. Actualmente colabora con las compañías farmacéuticas Wyeth-Ayerst y Bristol-Myers Squibb (New Jersey, EUA) evaluando el potencial terapéutico de diversos compuestos diseñados para el tratamiento de la hipertensión.

El Dr. Villalobos-Molina pertenece a diversas sociedades científicas, entre las que destacan: Sociedad Mexicana de Bioquímica, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, y la American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Es miembro del Consejo de acreditación del Sistema Nacional de Evaluación Científica y Tecnológica (CONACYT) y ha sido distinguido por el Sistema Nacional de Investigadores como Investigador Nacional nivel 3.





---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## CONTROL MOLECULAR DE LA APOPTOSIS DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LA EXTREMIDAD.

René Fernando Abarca-Buis, Alberto Jesús Rios-Flores, Jesús Chimal-Monroy.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional autónoma de México, Apartado Postal 70-228 México DF 04510.  
[jchimal@servidor.unam.mx](mailto:jchimal@servidor.unam.mx)

### Abstract.

*The developing limb bud is an excellent model to analyze the molecular mechanisms that regulate the programmed cell death or apoptosis. During the formation of the limb appear four apoptotic zones that control the morphogenesis of the limb. The most extensively studied of the apoptotic zones is the interdigital zone. Here the molecular signals that control this process belongs to the family of proteins morphogenetic of smad the bone (BMP), these molecules bind to their receptors and transduce the signal through proteins. The pro-apoptotic activity of BMP signaling requires the interaction with other signaling molecules such as fibroblast growth factors (FGF), Wingless int-related protein (WNT) and retinoic acid. The FGF, WNT and retinoic acid modulate as well the capacity of BMPs to induce the apoptosis in the interdigits.*

**Keywords:** Apoptosis, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), limb morphogenesis, Retinoic Acid, Fibroblast Growth Factor (FGFs).

---

### Introducción

Durante el desarrollo de los organismos multicelulares se generan distintos tipos celulares que darán origen a diferentes tejidos y órganos. De manera que el balance correcto entre la diferenciación, la proliferación y la muerte celular determinan el destino de los distintos linajes celulares y el número de células que conforman un órgano. La apoptosis o muerte celular

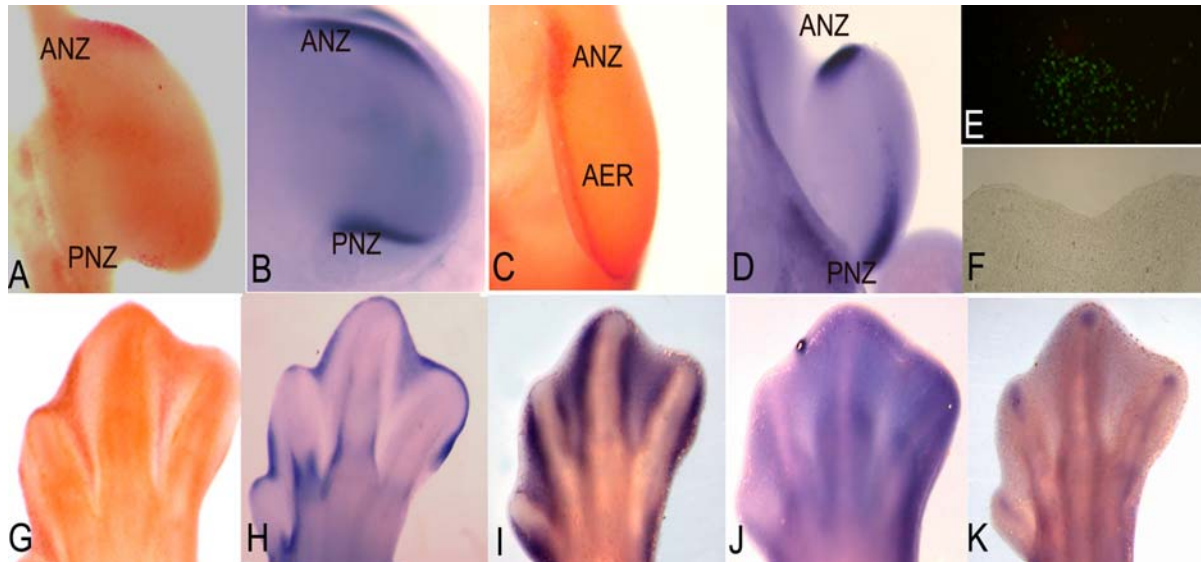
programada es parte esencial de la vida de los metazoarios, a menudo en los organismos se produce un mayor número de células de las necesarias, entonces la apoptosis juega un papel importante al eliminar células que se encuentran en exceso o para esculpir tejidos.

### **La extremidad embrionaria del pollo: un modelo para el estudio de la apoptosis**

La extremidad en desarrollo del pollo ha sido uno de los modelos más recurrentes para el estudio de la apoptosis ya que presenta varias zonas que son eliminadas por este proceso. La zona necrótica anterior (ANZ) y la zona necrótica posterior (PNZ) son áreas del mesodermo que, respectivamente, rodean los bordes anteriores y posteriores de las extremidades embrionarias (Fig. 1A). A pesar de su nombre, estas zonas son eliminadas por apoptosis desde etapas tempranas y se han relacionado con la reducción en el número de dedos en las aves (tres dedos en las alas y cuatro en las patas). En algunas mutantes de pollo que presentan polidactilias (incremento en el número de dedos) no exhiben estas zonas apoptóticas [1]. Además, el pollo mutante característico por la ausencia de alas wingless, presenta durante su desarrollo embrionario una ANZ bastante extendida que correlaciona con la pérdida de las alas [2]. Cabe destacar que en los mamíferos con pentadactilia (cinco dedos) no aparecen estas áreas de apoptosis. El parche opaco es otra zona presente en el mesénquima central de la extremidad embrionaria de aves y de mamíferos que, se piensa, está relacionada en la separación de la ulna y el radio en las extremidades anteriores, y de la tibia y la fíbula en las posteriores. El pollo mutante *talpid3* carece de esta área de apoptosis y exhibe la fusión de estos dos huesos [3]. Debido a su tamaño y acceso, las áreas apoptóticas de las zonas interdigitales de los pollos son los modelos que más se usan para estudiar los mecanismos de la apoptosis *in vivo*. Como su nombre lo indica, las zonas interdigitales ó interdígitos se localizan entre los dedos (Fig. 1 E-G), y dependiendo de la especie, estas zonas se eliminan ó permanecen durante la vida adulta del organismo, participando de manera importante en la morfogénesis de las extremidades de los adultos. Por ejemplo, en especies con dedos separados tales como el pollo [4], el lagarto [5], el ratón y el humano [6,7] la apoptosis se extiende en todo el espacio interdigital, pero en el pato ó la tortuga que presentan este tejido permanentemente, la apoptosis solo se activa en la parte más distal [8,5].

Además del mesodermo, la apoptosis también es activada en el ectodermo, en una región muy importante para el desarrollo de la extremidad denominada Cresta Ectodérmica Apical (AER) (Fig. 1C). La AER es un engrosamiento del ectodermo localizado en la parte más distal de la extremidad embrionaria y es una estructura muy importante ya que dirige el crecimiento próximo-distal de la extremidad. La eliminación de la AER genera el truncamiento de la extremidad mientras que la presencia de dos AER en donde originalmente hay una, genera bifurcación de ella [9]. Se ha observado que la apoptosis regula el tamaño de la AER de tal manera que pueda realizar su función de manera muy precisa durante todo el desarrollo de la extremidad. Con base en esto, el incremento de células apoptóticas en la AER resulta en un truncamiento parcial ó completo de la extremidad [10], proceso que se presenta de forma natural en las serpientes [11]. De acuerdo con estas observaciones, se ha reportado que en etapas del desarrollo donde ocurre la formación de los dedos, se presentan polidactilias o disminución en el número de dedos dependiendo si hay una inhibición o un aumento de la apoptosis en la AER en embriones de ratón [12]. Todas estas observaciones evidencian el importante papel de la apoptosis para que las extremidades se formen correctamente. En este sentido, en la figura 1 mostramos la expresión de algunos genes cuya expresión correlaciona con las zonas de

apoptosis en la extremidad y cuya función está directamente relacionada con el control de éste proceso.

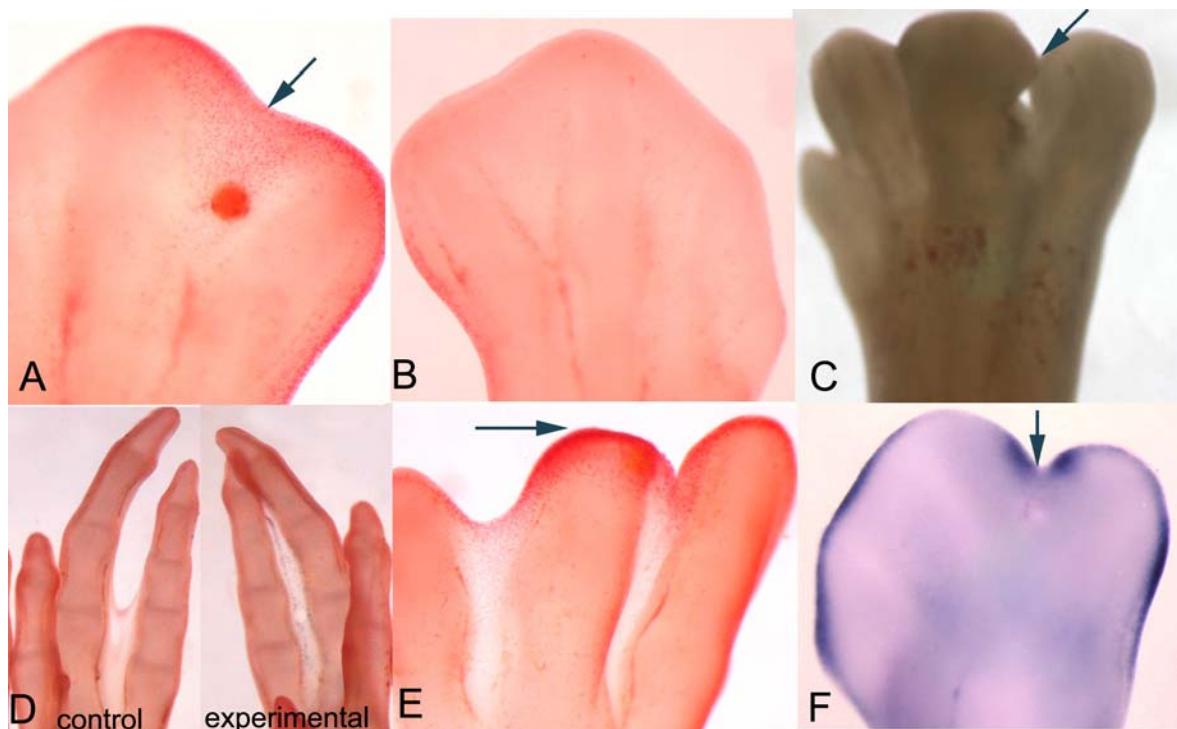


**Figura 1.** La expresión de *Dkk* y moléculas involucradas con el señalamiento de BMPs coinciden con las zonas de apoptosis en la extremidad. En las imágenes A-D la parte superior de la imagen corresponde a la región anterior de la extremidad y la parte inferior corresponde a la región posterior. A) Extremidad de embrión en etapa 22 del desarrollo embrionario (E-22), donde se observan las zonas necróticas anterior y posterior positivas a la tinción de rojo neutro, que tiñe células muertas, en este caso sabemos que mueren por apoptosis. B) Expresión genética de *Dkk* en extremidades de embrión de pollo E-22 en la zona necrótica anterior y posterior. C) Extremidad de embrión de pollo E-23 donde se observa la Cresta Apical Ectodérmica y la zona necrótica anterior positiva a la tinción de rojo neutro. D) Expresión genética de *Dkk* en extremidades de pollo E-23, en donde se observa la expresión en las zonas necróticas anterior y posterior. E) Se muestra la reacción de TUNEL (transferase-mediated dUTP nick end labeling) para evidenciar que las células de los interdógitos son apoptóticas. F) Corte histológico observado en la figura E en campo claro, para mostrar la ubicación del área de apoptosis. G) Extremidad de embrión E-32 donde se observa la muerte celular en los interdógitos, positivos a la tinción de rojo neutro que coincide con la reacción de TUNEL. H-K) La hibridación in situ de *Dkk* (H), de *Bmp7* (I) y de *Alk2* (J) muestra la expresión de estos genes en los interdógitos. Mientras que la expresión del gen *Bmpr1b* (K) se localiza en la punta de los dedos, pero no en las zonas de muerte celular por apoptosis.

### Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) promueven la apoptosis en los interdógitos

Entre las señales que regulan la apoptosis en la extremidad está la perteneciente a la de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). Las BMPs son miembros de la superfamilia de los TGF $\beta$ , moléculas secretadas al medio extracelular, que regulan la proliferación, la

diferenciación, la migración y la apoptosis [13]. Varias isoformas de las BMPs tales como la BMP2, la BMP4, la BMP5 y la BMP7 participan en la regulación de la apoptosis en la extremidad embrionaria de aves y mamíferos [14,15]. El patrón de expresión de estas moléculas coincide con la ANZ, la PNZ y la región interdigital, sugiriendo una posible participación de la señalización de las BMPs sobre el destino de estos tejidos (Figura 1I-K) [15,16]. La aplicación de las formas protéicas de las BMPs en el interdígito resulta en la aceleración de la apoptosis (Figura 2A, B) [15-18].



**Figura 2.** Las BMPs y el ácido retinoico son moléculas que inducen la apoptosis en el interdígito. A) Inducción de la muerte celular en el tercer interdígito por el ácido retinoico en la extremidad de pollo tratada en E-28 y después de 18 horas de la aplicación del ácido retinoico. Las células positivas a rojo neutro son las células apoptóticas. B) Extremidad control de la misma etapa del desarrollo que en A), donde no se observa apoptosis. C) Después de 48 horas de tratamiento con el ácido retinoico se observa regresión acelerada del interdígito. D) Inhibición de la muerte interdigital por la aplicación de noggin, antagonista de BMPs, en E-29 después de 72 horas de su aplicación. Se observa la permanencia de la membrana interdigital mientras que en el control la regresión de la membrana está avanzada. E) Inducción de la muerte por la aplicación de ácido retinoico en la punta del dedo en E-29, después de 72 horas se observa claramente un patrón de muerte en la punta del dedo que genera el truncamiento del mismo. F) Inducción de la expresión de Dkk en el interdígito por la aplicación de ácido retinoico.

Contrariamente, la aplicación de antagonistas de las BMPs, como Noggin ó gremlin en el interdígito, resulta en la inhibición de la apoptosis de este tejido (Figura 2D) [19,20]. De igual

manera, la eliminación de BMP7 en ratones resulta en la inhibición de la muerte celular en el interdígito, generando sindactilias (dedos unidos por las membranas interdigitales) y polidactilias [21] sugiriendo la participación de las BMPs en el control de la apoptosis en los interdígitos y en el número de dedos.

### **Transducción de la señal de las BMPs.**

Las BMPs se unen a receptores de membrana para llevar a cabo su función, la generación de formas constitutivas activas y dominantes negativas de éstos permiten obtener información relevante sobre la función de las BMPs en el control de la apoptosis. Todos los miembros de la familia de las BMPs ejercen su acción celular uniéndose a dos tipos de receptores transmembranales (receptores tipo I y tipo II) que son cinasas de serina/treonina, ambos esenciales para transducir la señal de los ligandos [22,23]. El complejo hetero-oligomérico que inicia la transducción de la señal consiste de dos receptores tipo II, dos receptores tipo I y el ligando que es un homodímero [24]. Los receptores tipo II son cinasas constitutivamente activas que una vez formado el complejo ligando-receptor, fosforilan a los receptores tipo I en un dominio rico en glicinas y serinas, localizado por arriba del sitio de actividad catalítica del receptor, denominado dominio GS [25]. Esta fosforilación activa el sitio cinasa del receptor tipo I que a su vez actúa sobre los sustratos intracelulares, como son las proteínas Smad (Fig. 3) ó proteínas relacionadas a la vía de las cinasas activadas por mitógenos (Fig. 4; MAPK) [26]. De esta manera, los receptores tipo I determinan la especificidad de las señales intracelulares. La sustitución de una treonina o una glutamina por un aminoácido ácido en el dominio GS resulta en la activación constitutiva del sitio cinasa serina/treonina del receptor tipo I, independientemente de la presencia del ligando y del receptor tipo II [27]. Contrariamente, formas dominantes negativas de los receptores tipo I son obtenidas por la sustitución de una lisina por una arginina en el sitio de unión del ATP lo que reduce dramáticamente su actividad cinasa [28]. Existen tres receptores tipo I que transducen la señal de los miembros de la familia de las BMPs. A estos receptores se les ha denominado BMPR-1A ó ALK-3, BMPR-1B ó ALK-6 [29,30] y ALK-2 [31]. La especificidad de la señal intracelular dirigida por el receptor tipo I radica en una región específica presente en el sitio cinasa denominada el asa L45 [32]. El asa L45 de BMPR-1A/ALK-3 y de BMPR-1B/ALK-6 es idéntica y aunque el asa L45 de ALK-2 difiere ligeramente de la de los otros dos receptores, los tres interactúan con sustratos muy similares [33].

Como se ha mencionado, las proteínas Smad son algunos efectores de la transducción de la señal de los miembros de la superfamilia del TGF $\beta$ . Tres tipos de proteínas Smad, la Smad1, la Smad5 y la Smad8 son fosforiladas y activadas por los receptores tipo I de BMPs [34-36]. A estas Smad se les conoce como R-Smad, debido a que son activadas por los receptores tipo I. La activación de las R-Smad induce la formación de un complejo trimérico con la Smad4, generalmente necesario para que estos complejos viajen al núcleo y regulen la transcripción de genes blanco, ya sea por una unión directa al DNA o indirecta por medio de otros cofactores [26]. Otras proteínas relacionadas, las Smad inhibitoras (I-Smad), bloquean la transducción de la señal dependiente de las R-Smad. Se han reconocido dos Smad inhibitoras en vertebrados, la Smad6 y la Smad7 que estructuralmente son diferentes de las otras Smad. Las I-Smad interactúan de manera estable con los receptores tipo I impidiendo la fosforilación de las R-Smad [37,38]. La competencia entre las I-Smad y las R-Smad por los receptores tipo I es un mecanismo de regulación general para todos los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ . La

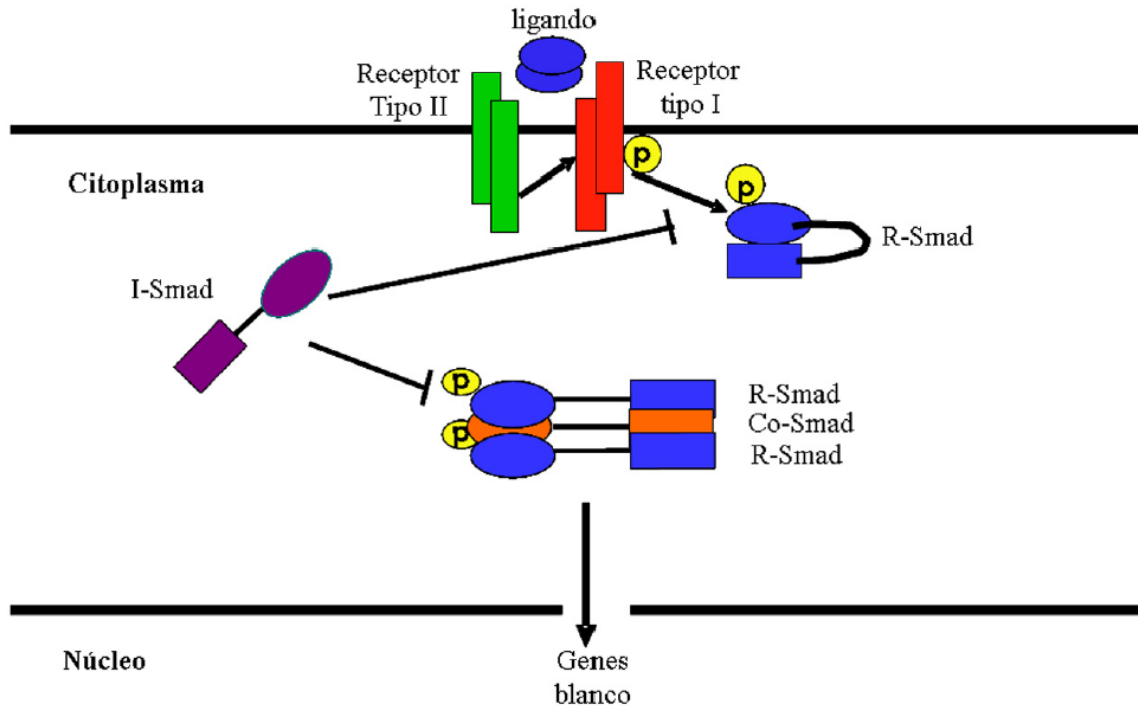
Smad6 actúa también por otro mecanismo, impide la formación del complejo R-Smad de BMPs y la Smad4, inhibiendo la translocación de las R-Smad al núcleo, por lo tanto la Smad6 inhibe preferencialmente la vía de las BMPs (Figura 3) [39].

Otros substratos intracelulares de los receptores tipo I de BMPs son las MAPK. La vía en la que se involucra la MAPK p38 es activada por las BMPs en células de mamífero y de *Drosophila* [40]. Se ha observado que p38 induce la fosforilación del factor de transcripción ATF-2 que puede interactuar con las Smads para activar la transcripción. Otra MAPK activada directamente por el receptor tipo I de BMPs es TAK1. Esta cinasa induce la activación de JNK que a su vez activa a la proteína C-JUN (Figura 4). Tanto C-JUN como p38 se han involucrado en la activación de la apoptosis en algunos modelos experimentales [41,42].

### **Los receptores tipo I de las BMPs controlan la apoptosis inducida por las BMPs en los interdógitos**

La sobre-expresión de las formas dominantes negativas de BMPR-1A/ALK3 y de BMPR-1B/ALK6 en extremidades embrionarias de pollo resulta en el truncamiento de los dedos, así como en la inhibición de la muerte interdigital [18,28]. Por otro lado, la sobreexpresión de las formas constitutivas activas de estos dos receptores produce engrosamiento de los elementos esqueléticos y sólo para el caso de BMPR1B se acelera la muerte interdigital [43]. Estos trabajos demuestran que las BMPs regulan activamente la apoptosis y la condrogénesis (la formación del cartílago) en la extremidad embrionaria.

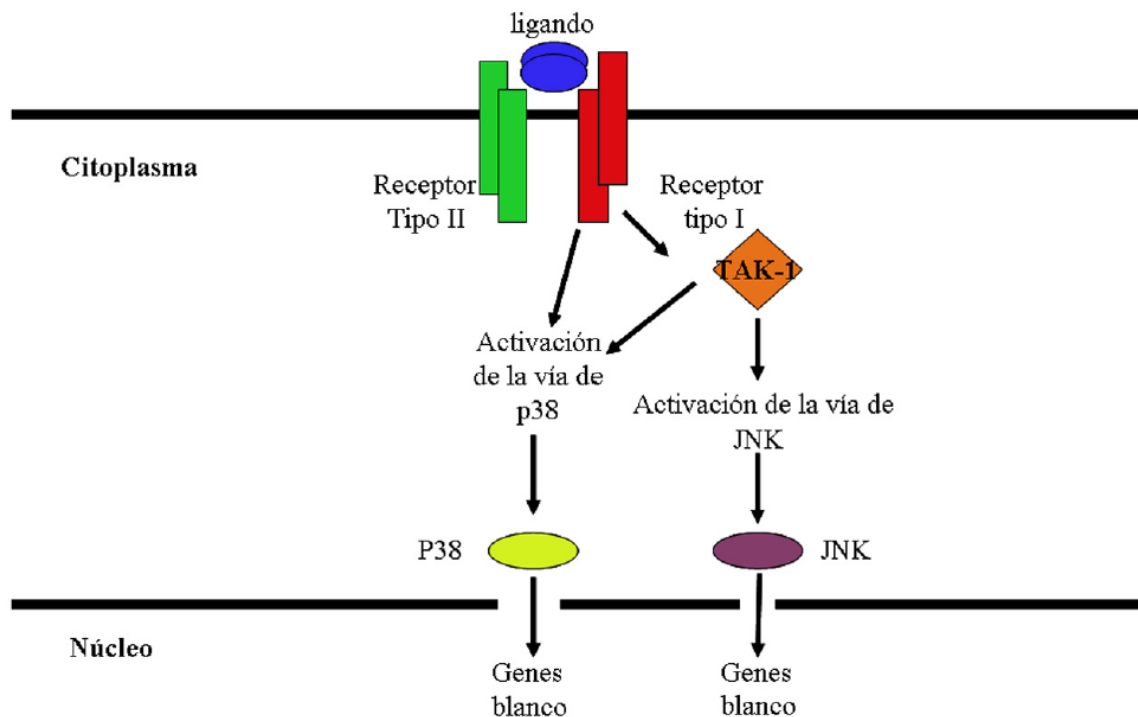
Una vez comprobada la participación de las BMPs tanto en el crecimiento y la diferenciación del cartílago así como en la regresión del tejido interdigital, se sospechó que estas distintas respuestas dependían del tipo de receptor que expresan las células destinadas a diferenciarse ó morir. Trabajos posteriores, propusieron que las BMPs participan en la diferenciación del cartílago en etapas tempranas a través de BMPR-1B/ALK6, mientras que BMPR-1A/ALK3 y ALK2 regulan el establecimiento de la placa de crecimiento de los huesos largos en etapas posteriores del desarrollo [43,44]. Sin embargo, y a pesar de que la sobre-expresión de las formas dominantes negativas de BMPR1A y de BMPR1B inhiben la apoptosis interdigital, los patrones de expresión de los genes que codifican para estos receptores no coinciden con las áreas de muerte en la extremidad del pollo en desarrollo. La expresión endógena de *bmpR-1b* se localiza exclusivamente en las regiones condrogénicas, en donde se forman los dedos (Figura 1K), mientras que *bmpR1a*, se expresa en la parte más distal de la extremidad, en las células subyacentes a la *AER* [19]. Posteriormente este gen es expresado en las células prehipertróficas que forman parte de la placa de crecimiento de los elementos esqueléticos ya establecidos, pero no en las zonas de apoptosis [43]. La aplicación de factores que inducen la condrogénesis, tales como el TGF- $\beta$  en el interdígito generan inhibición de la apoptosis interdigital y la formación de un dedo extra. La aplicación de estos factores dispara la cascada molecular relacionada a la condrogénesis en el que se incluye la inducción del gene que codifica para BMPR-1B/ALK6, lo que indica que este receptor está involucrado en la diferenciación del cartílago, más no en la regulación de la apoptosis [19,45]. Estos resultados descartan la posibilidad de que BMPR-1B y BMPR-1A sean los receptores endógenos por los cuales las BMPs inducen la muerte celular.



**Figura 3.** Vía de transducción de las BMPs dependiente de las Smads. El ligando que puede ser cualquiera de las isoformas de las BMPs se unen a dos receptores transmembranales denominados receptores tipo II y tipo I. Una vez formado este complejo hetero-oligomérico, el receptor II fosforila al receptor tipo I, el cual a su vez activa a las proteínas transductoras de la señal denominadas R-Smad. Las R-Smad forman un complejo trimérico con una Smad acompañante ó Co-Smad que se transloca al núcleo para activar la expresión de genes blanco. Las I-Smad ó smad inhibitoras son antagonistas de la vía de las smads que presentan dos mecanismos de acción: uno es compitiendo por el receptor tipo I con las R-Smad ó impidiendo la formación del complejo R-smad/Co-Smad.

Se conoce que *alk2* se expresa en todo el mesénquima del ala en desarrollo y la sobre-expresión de la forma constitutiva activa de *alk2* inhibe la formación de las articulaciones y promueve la expansión del cartílago, además de retrasar la maduración de los condrocitos en los elementos cartilaginosos ya establecidos [44].

Actualmente, en nuestro laboratorio hemos observado que el patrón de expresión de este receptor coincide claramente con la apoptosis en el interdígito (Fig. 1J), y por lo tanto sugerimos con estas observaciones que este receptor es candidato muy fuerte, por el cual las BMP controlan la apoptosis en el interdígito.



**Figura 4.** Las BMPs transducen su señal por otras vías que no dependen de las Smads. Una vez activado el receptor de BMPs ocurre la activación de las MAPK. Se ha observado que la vía p38 y JNK es activada por TAK-1, un sustrato directo del receptor tipo I. Aunque también la vía de p38 es activada directamente por los receptores de BMPs. Estas vías están involucradas en la apoptosis de varios tejidos.

#### La expresión de antagonistas de las BMPs controlan la apoptosis interdigital

Recientemente, se han reconocido un gran número de antagonistas que regulan temporal y espacialmente la distribución de las BMPs a nivel extracelular en la extremidad en desarrollo, impidiendo la unión de estos factores con sus receptores. Este control de las BMPs es muy importante durante el desarrollo de la extremidad, ya que impide que se presenten malformaciones de ésta, tales como el sobre-crecimiento del cartílago o una expansión en la apoptosis. Noggin, gremlin, DAN, cordina y follistatina son proteínas antagonistas de BMPs que regulan la disponibilidad de BMPs durante el desarrollo de la extremidad. Por ejemplo, el gen *noggin* se expresa en las condensaciones del cartílago y regula el tamaño y la forma del esqueleto [19], cordina regula la formación de las articulaciones [46], follistatina está involucrada en la diferenciación del músculo y tendones [47] y gremlin en la extensión de la AER y en la regresión del interdígito [20]. Estas observaciones indican que la función de las BMPs está regulada específicamente por los diferentes antagonistas y que éstos actúan de una manera complementaria y no redundante.



### **El ácido retinoico induce la apoptosis interdigital a través de las BMPs**

El ácido retinoico, derivado de la vitamina A, es una molécula importante en la inducción de la apoptosis interdigital ya que al administrar un exceso de ácido retinoico en el interdígito se observa aceleración de la apoptosis (Figura 2C). Además, la aplicación del ácido retinoico en la punta del dedo lleva a un truncamiento en el desarrollo de este, debido a que es capaz de disparar la apoptosis en las células condrogénicas que lo constituyen (Figura 2E) [48]. Por otro lado, la eliminación de los receptores del ácido retinoico resulta en sindactilia, como consecuencia de inhibir la apoptosis [49]. En el ratón mutante *Hammertoe* la apoptosis interdigital es inhibida, y la administración de ácido retinoico en hembras preñadas rescata el fenotipo [50]. Esto sugiere que el ácido retinoico es promotor de la apoptosis interdigital. Sin embargo, en embriones de pollo en presencia de un antagonista de BMPs es inhibido el efecto inductor de la apoptosis por el ácido retinoico, sugiriendo que el control de éste sobre la apoptosis está mediado por las BMP [48].

### **Interrelación entre los FGFs y las BMPs durante el control de la apoptosis**

El crecimiento de la extremidad en dirección próximo-distal por acción de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) está estrechamente relacionado con el control de la muerte celular en los interdígitos. El FGF8 es un factor presente en AER, al anular su expresión durante las etapas en las que está ocurriendo el crecimiento de la extremidad se observa truncamiento de ésta, asociada a la presencia de apoptosis masiva, sugiriendo un papel para FGF8 en la sobrevivencia celular. Sin embargo, la aplicación de FGFs en zonas interdigitales promueve dos efectos sobre los interdígitos; el primero a corto tiempo, en que la apoptosis es inhibida durante las primeras 10-12 h y el segundo a largo tiempo, en el que la apoptosis es inducida después de 20 h. Este efecto sobre la muerte celular de FGF es inhibida por la presencia de antagonistas de la señalización de BMPs. Por otro lado, la inhibición de la señalización de FGFs bloquea la apoptosis inducida por BMPs. Estos datos sugieren que los FGFs, por un lado, promueven la sobrevivencia celular al inhibir la apoptosis a tiempos cortos y por otro lado, hace a las células sensibles a la apoptosis inducida por BMPs [51]. Así mismo, en una clara interrelación entre las BMPs y los FGFs durante la apoptosis interdigital, se sabe que las BMPs inducen la expresión del receptor tipo 3 de los FGFs (FGFR3) en el interdígito [51].

### **Otros factores que participan en el control de la apoptosis interdigital**

Además de las BMPs, se ha observado que la señalización del tipo de *Wingless int-related protein (Wnt)* tiene una participación importante en el control de la apoptosis interdigital. El ratón KO de *dkk1*, que codifica para un antagonista de WNT, genera polidactilias y sindactilias, lo que sugiere que la señalización WNT controla negativamente la apoptosis interdigital. Durante el desarrollo de la extremidad, la expresión de *Dkk-1* coincide con las zonas necróticas anterior y posterior, y con las zonas interdigitales donde ocurre la muerte celular programada (Figura 1A-D; 1G,H). Al parecer existe un balance entre *Dkk-1* y el señalamiento de BMPs que regula la muerte celular programada y la forma de la extremidad. Por un lado *Bmp2* induce la expresión de *Dkk*, mientras que la sobre-expresión de *Dkk-1* regula negativamente la

expresión de *Bmp2* en las células del mesénquima y de la cresta ectodérmica apical [52]. De igual manera, el ácido retinoico induce la expresión de *Dkk* en el interdígito (Figura 2F)

En conclusión, la apoptosis que moldea la forma de la extremidad depende del balance fino de señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. En nuestro laboratorio nos hemos enfocado a estudiar los mecanismos moleculares que conllevan a la morfogénesis de las extremidades y en particular a la formación de la mano. Las señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que controlan la presencia o ausencia de los interdígitos están coordinadas con las señales condrogénicas que regulan la formación de los dedos y la forma de éstos.

## Referencias

1. Hinchliffe, J.R. y Ede, D.A. (1967). Limb development in the polydactylous *talpid3* mutant of the fowl. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 17: 385-404.
2. Hinchliffe, J.R. y Ede, D.A. (1973). Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless (*ws*) chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30: 753-772.
3. Hinchliffe, J.R. y Thorogood, P.V. (1974). Genetic inhibition of mesenchymal death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of *talpid3* (*ta3*) mutante chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31: 747-760.
4. Pautou, M.P. (1975). Morphogenesis of the chick embryo foot. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34: 511-529.
5. Fallon, J.F. y Cameron, J. (1977). Interdigital cell death during limb development of turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 40: 285-289.
6. Milaire, J. (1977). Histochemical expression of morphogenetic gradients during limb morphogenesis. *Birth defects: original article series.* 13: 37-67.
7. Kelley, R.O. (1970). An electron microscopic study of mesenchyme during development of interdigital spaces in man. *Anat. Rec.* 168: 43-53.
8. Saunders, J.W. y Fallon, J.F. Cell death in morphogenesis. In: Locke M, editor. *Major problems in developmental biology.* New York: Academic Press; 1967. p. 289-314.
9. Saunders Jr. J.W. (1972). Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. *Ann. NY Acad. Sci.* 193: 29-42.
10. Seto, M.L., Nunes, M.E., MacArthur, C.A., Cunningham, M.L. (1997) Pathogenesis of ectrodactyly in the dactylaplasia mouse: aberrant cell death of the apical ectodermal ridge. *Teratology.* 56: 262-270.
11. Raynaud A. Developmental mechanism involved in the embryonic reduction of limbs in reptiles. (1990) *Int. J. Dev Biol.* 34: 233-243.
12. Klein, K.L., Scott, W.J., Wilson, J.G. (1981). Aspirin-induced teratogenesis: a unique pattern of cell death and subsequent polydactyly in the rat. *J. Exp. Zool.* 216: 107-112.
13. Hogan, B.L.M. (1996). Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10: 1580-1594.
14. Macias, D., Gañan, Y., Sampath, T.K., Piedra, M.E., Ros, M.A., Hurlé, J.M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124: 1109-1117.
15. Zuzarte-Luís, V., Montero J. A., Rodríguez-Léon J., Merino, R., Rodríguez -Rey, J.C. y Hurlé J. M. (2004). A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev. Biol.* 272 (1): 39-52.
16. Laufer, E., Pizette, S., Zou, H., Orozco, O. E., y Niswander, L. (1997). BMP expression in duck interdigital webbing: A reanalysis. *Science* 278, 305.
17. Gañan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A. y Hurlé, J.M. (1996). Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development.* 122: 2349-2357.
18. Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. y Kuroiwa A. (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development.* 122: 3725-3734.
19. Merino, R., Gañan, Y., Macias, D., Economides, A.N., Sampath, K.T. y Hurlé, J.M. (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFβs, and Noggin through BMP signaling. *Dev. Biol.* 200: 35-45.

20. Merino, R., Rodríguez-León, J., Macias, D., Gañan, Y., Economices, A.N. y Hurle, J.M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, condrogénesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*. 126: 5515-5522.
21. Hofmann, C., Lou, G., Balling, R., Karsenty, G. (1996). Analysis of limb patterning in BMP-7 deficient mice. *Dev. Genet.* 19(1): 43-50.
22. Kawabata, M., Imamura, T., y Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9: 49-61.
23. Massagué, J. (1998). TGF $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791.
24. Moustakas, A. y Heldin, C. H. (2002) From mono- to oligo- Smads: the heart of the matter in TGF $\beta$  signal transduction. *Genes Dev.* 16: 67-871.
25. Heldin, C.-H., Miyazono, K., y ten Dijke, P. (1997). TGF $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390: 465-471.
26. Miyazono, K, Ten Dijke, P. y Heldin, C.-H. (2000). TGF $\beta$  signaling by Smad proteins. *Adv. Immun.* 75: 115-154.
27. Wieser, R., Wrana, J.L., y Massagué, J. (1995). GS domain mutations that constitutively active T $\beta$ R-I, the downstream signaling component in the TGF $\beta$  receptor complex. *EMBO J.* 14: 2199-2208.
28. Zou, H. y Niswander, L.(1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science.* 272:738-741.
29. Koenig, B.B., Cook, J.S, Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., Grant, R.A., *et al.* (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5961-5974.
30. Ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L, Ichijo, H., Heldin, C.-H., y Miyazono, K. (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 269: 16985-16988.
31. Macias-Silva, M., Hoodless, P.A., Tang, S.J., Buchwald, M. y Wrana, J.L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* 273: 25628-25636.
32. Feng, X.-H. y Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor $\beta$  (TGF $\beta$ ) type I receptor determines the TGF $\beta$  intracellular signaling specificity. *EMBO J.* 16, 3912-3923.
33. Chen, Y.G., y Massagué, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor  $\beta$  family receptors. *J. Biol. Chem.* 274: 3672-3677.
34. Hoodless, P.A., Haerry, T., Abdollah, S. Stapleton, M., O'Connor, M.B, Attisano, L.y Wrana, J.L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell.* 85, 489-500.
35. Chen, Y., Bhushan A, y Vale, W. (1997). Smad8 mediates the signaling of the receptor serine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12938-12943.
36. Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R. y Yoneda, T. (1998). Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J. Biol. Chem.* 273: 1872-1879.
37. Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J.-I., Kawabata, M. Y Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF $\beta$  superfamily. *Nature.* 389: 622-626.
38. Hayashi, H., Abdollah, S., Qui, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbone, M. A., Jr., Wrana, J. L., y Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF $\beta$ receptor and functions as antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Cell.* 89: 1165-1173.
39. Hata, A., Lagna, G., Massagué, J., y Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 12, 186-197.
40. Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. y Matsumoto, K. (1999). P38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor  $\beta$  superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2322-2329.
41. Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. y Taga, T. (2000) BMP-2 induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J. Biol. Chem.* 275: 1764-17652.
42. Derynck, R. y Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. *Nature.* 425: 577-584.
43. Zou, H., Wieser, R., Masagué, J. y Niswander, L. (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11: 2191-2203.
44. Zhang, D., Schwarz, E. M., Rosier, R. N., Zuscik, M. J., Puzas, J. E. y O'keefe, R. J. (2003). ALK2 Functions as a BMP type I receptor and induces Indian Hedgehog in chondrocytes during skeletal development. *J. Bone and Miner. Res.* 18:1593-1604.
45. Chimal-Monroy, J., Rodríguez-León, J., Montero, J.A., Gañan, Y., Macias, D., Merino, R. y Hurle, J.M. (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* 257: 292-301.

46. Francis-West, P. H., Parish, J., Lee, K. y Archer, C (1999). BMP/GDF- signaling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res.* 296, 111-119.
47. Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Rodríguez-León, J., Economides, A., Rodríguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C. y Hurler, J. M. (1999). Control of digit formation by activin signaling. *Development.* 126: 2161-2170.
48. Rodríguez-León J, Merino R, Macias D, Gañan Y, Santaesteban E, y Hurler J. (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat. Cell. Biol.* 1: 125-126.
49. Dupé V, Ghyselinck NB, Tomás V, Nagy L, Davies PJA, Chambon P, Mark M. (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP7 expression in Mouse autopods. *Dev. Biol.* 208:30-43.
50. Ahuja HS, James W, y Zakeri, Z. (1997). Rescue of the limb deformity in hammetoe mutant mice by retinoic acid-induced cell death. *Dev. Dyn.* 208: 466-481.
51. Montero, J. A. Gañan, Y. Macias, D. Rodríguez-León, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M.A., y Hurler, J.M. (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development.* 128: 2075-2084.
52. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Concepción RE, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang PS, Niehrs Ch, Izpisúa BJC, Westphal H. (2001) Dickkopf1 Is Required for Embryonic Head Induction and Limb Morphogenesis in the Mouse. *Dev. Cell.* 1: 423-434.

## **CONTROL MOLECULAR DE LA APOPTOSIS DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LA EXTREMIDAD**

### **Resumen**

La extremidad embrionaria del pollo es un modelo excelente para analizar los mecanismos moleculares que regulan la muerte celular programada o apoptosis. Durante la formación de la extremidad existen cuatro zonas apoptóticas que controlan la morfogénesis correcta de la extremidad. La más extensa de las zonas apoptóticas es la zona interdigital. Aquí las señales moleculares que controlan este proceso pertenecen a la familia de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), estas moléculas se unen a sus receptores y transducen la señal a través de las proteínas Smad. La actividad pro-apoptótica de BMPs requiere la interacción con otras moléculas de señalización como lo son las señales de la familia los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), llamada en inglés Wingless int-related protein (WNT) y el ácido retinoico. Los FGFs, WNT y el ácido retinoico a su vez modulan la capacidad de las BMPs para inducir la apoptosis en los interdígitos.

**Palabras clave:** Apoptosis, Proteínas Morfogénicas del Hueso (BMPs), morfogénesis de la extremidad, Ácido Retinoico, Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs).

## **Semblanza del Dr. Jesús Chimal Monroy.**

Nació en la Ciudad de México el 19 de enero de 1964. Estudió la carrera de Biólogo en la Facultad de Ciencias de la UNAM. En esta misma Facultad obtuvo la Maestría en Ciencias en la especialidad de Biología Celular y obtuvo su grado de Doctor en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Realizó una estancia Postdoctoral en la Universidad de Cantabria, España en el laboratorio del Dr. Juan Hurlé. Actualmente es investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas al cual ingresó en 1997. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1. Su línea de Investigación está centrada a entender los mecanismos moleculares que controlan la formación de los dedos durante la morfogénesis de la mano en el embrión. Sus trabajos han sido publicados en revistas especializadas sobre biología del desarrollo, como lo son *Development*, *Developmental Biology*, *Developmental Dynamics* etc. Es miembro de las siguientes sociedades científicas; Society for Developmental Biology, International Society of Differentiation, International Society for Matrix Biology, American Society for Matrix Biology y American Association of Anatomists.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## DIFERENCIACIÓN SEXUAL NORMAL Y PATOLÓGICA

Susana Kofman-Alfaro y Gloria Queipo

Servicio de Genética, Hospital General de México, Facultad de Medicina, UNAM

[skofman@servidor.unam.mx](mailto:skofman@servidor.unam.mx)

### Abstract

*Disorders of human sex determination result in malformation of the external and internal genitalia. These malformation may vary from sexual ambiguity to complete sex reversal. Most of the knowledge of the molecular mechanisms involved in the mammalian sex determination pathway has been derived from the genetic analysis of these patients. Until recently, only transcription factors such SRY, SOX9, DAX1, WT1 and SF1 were known to be responsible for abnormal gonadal development. Therefore the molecular approach to these disorders could reveal all the mechanisms leading until now the unknown knowledge of the normal and the abnormal gonadal development.*

**Keywords:** Sexual determination; gonadal development; SRY; transcription factor.

---

### Introducción

En los últimos años se han obtenido numerosos conocimientos en el área de la diferenciación sexual en los mamíferos los cuales sugieren la existencia de diversas interacciones entre las señales genéticas, hormonales y celulares durante el proceso que define la formación del fenotipo masculino o femenino (Figura 1). Se ha establecido que la diferenciación sexual en el humano está sujeta a un programa secuencial de tres etapas: la

genética, la gonadal y la fenotípica. Así, anormalidades en cualquiera de estas tres etapas conducen a una serie de patologías cuyo análisis ha permitido entender mejor el proceso de la determinación y la diferenciación sexual normal.

### **Diferenciación sexual normal**

La primera etapa (genética), se inicia en el momento en que un espermatozoide con un cromosoma X o Y, fertiliza a un óvulo que siempre aporta un cromosoma X. De esta manera se establece el dimorfismo de los mamíferos que corresponde a un complemento cromosómico XX en la hembra y XY en el macho. El desarrollo de la gónada (determinación sexual) comienza con la expresión del factor determinante testicular (FDT) codificado por el gen SRY (*sex determining region on Y-chromosome*) localizado en la posición Yp11.3 (1). Las evidencias que apoyan a SRY como el FDT son: 1) su expresión en la cresta gonadal, la cual coincide con el inicio de la determinación testicular (2); 2) inducción en el desarrollo de los testículos en ratones transgénicos XX a los cuales se les insertó el transgene Sry (3); 3) mutaciones en SRY causan reversión sexual 46,XY (4) y 4) su presencia en algunos individuos 46,XX induce el desarrollo testicular (5). El gen SRY está constituido por un solo exón que codifica para una proteína de 204 aminoácidos con una región central HMG (High mobility group) la cual está altamente conservada durante la filogenia y con la propiedad de unirse al DNA (Capel., 1998). La estructura de SRY así como su expresión espacial y temporal demuestra la existencia de genes que actúan antes y después de la determinación testicular (6).

Existen varios genes de expresión temprana y previa a SRY que participan en el establecimiento y desarrollo de la cresta urogenital. Dentro de este grupo se encuentran WT1 y SF1 (Tumor de Wilms 1 y Factor esteroideogénico 1) (7,8). WT1 está localizado en 11p13 y es un gen tumor-supresor responsable del desarrollo del tumor de Wilms. Las mutaciones en estado heterocigoto en WT1 originan síndromes caracterizados por el tumor tipo Wilms, falla renal y anomalías gonadales y genitales (Síndromes de Denys-Drash y Frasier). Se ha observado que ratones que carecen de ambas copias de Wt1 no desarrollan gónadas ni glándulas suprarrenales, lo que sugiere que su función temprana es necesaria en la formación de estos órganos<sup>7</sup>. El gen SF1 o factor esteroideogénico, se localiza en 9q33 y se expresa en todos los tejidos productores de esteroides (8). La expresión temprana de Sf1 y Wt1 en las gónadas demuestran su clara participación en el mantenimiento de la cresta urogenital.

Se ha observado que en algunos sujetos con reversión sexual XY y gen SRY normal existen duplicaciones de una región denominada DSS (Dosage-sensitive sex reversal) situada en la posición Xp21.3 (9). En esta región se ha localizado también el gen DAX-1 que codifica para un miembro de la familia de los receptores hormonales nucleares y cuyas mutaciones causan hipoplasia suprarrenal congénita e hipogonadismo hipogonadotrópico. La duplicación de DAX-1 en sujetos 46,XY conduce a la disgenesia gonadal pura y como consecuencia a la formación de estrías gonadales bilaterales y fenotipo femenino (9).

Así mismo, se han descrito diferentes genes autosómicos que participan en la diferenciación gonadal. El gen SOX9 en 17q24, codifica para una proteína con un dominio HMG semejante en secuencia al de SRY que al unirse al DNA induce su plegamiento (1). Las mutaciones en SOX9

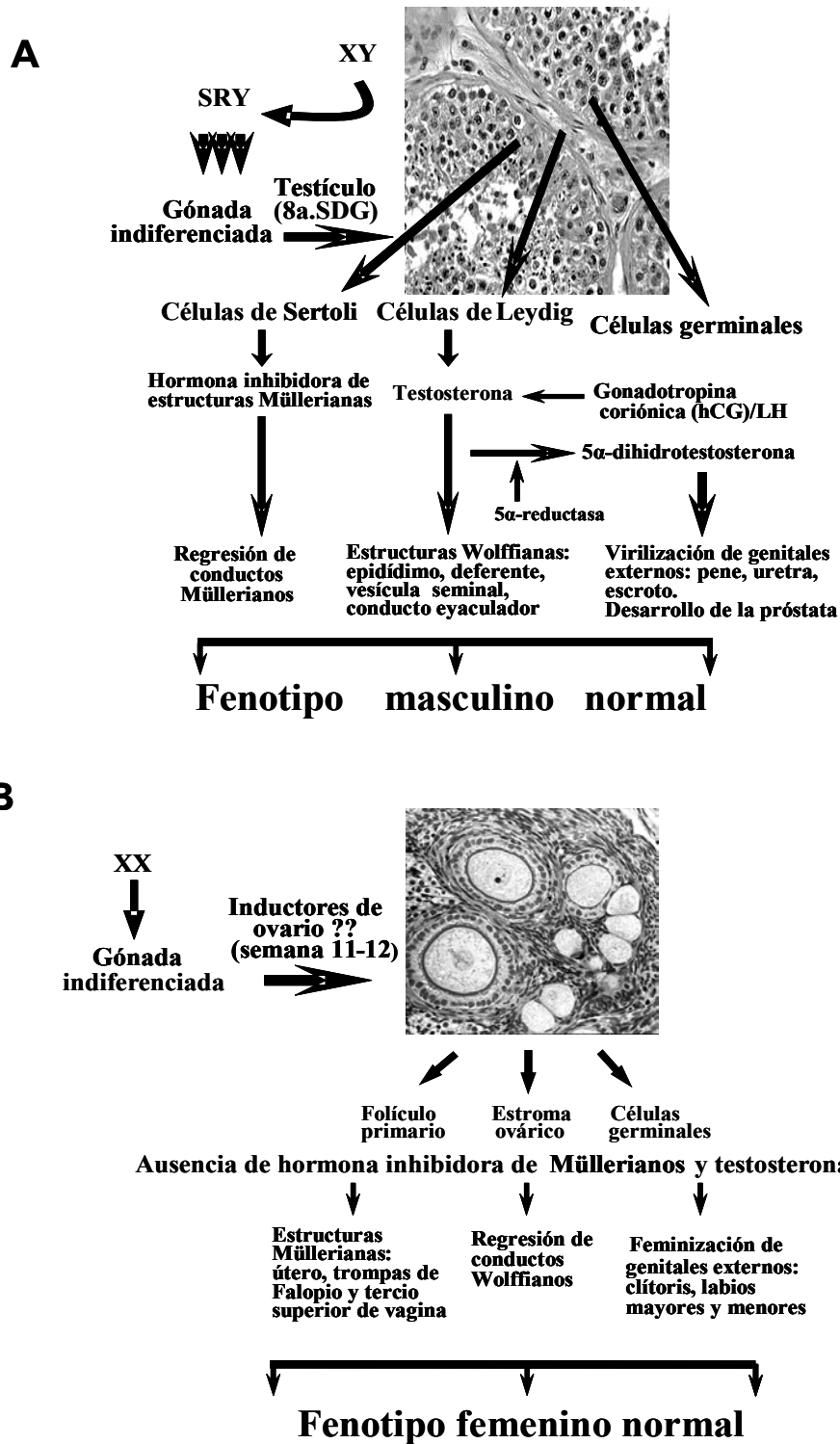


Figura 1: A. Representación esquemática del desarrollo sexual masculino B. Desarrollo sexual femenino.



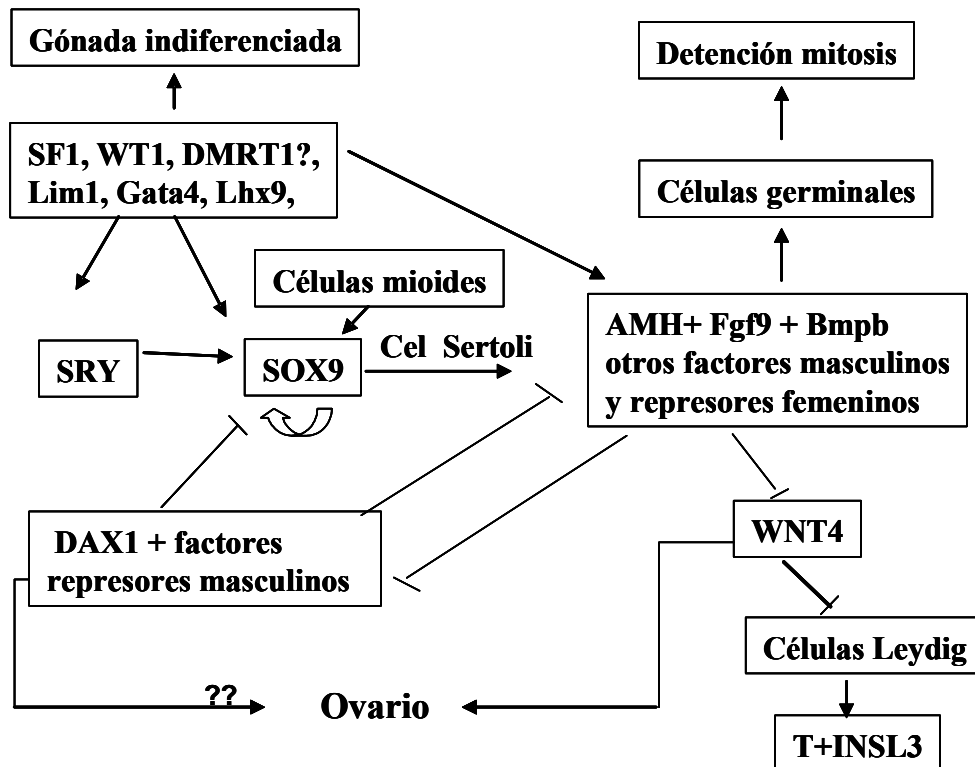
se presentan en pacientes con displasia campomélica, una enfermedad caracterizada por anomalías óseas y en la mayoría de los casos asociadas a la reversión sexual XY (10). Recientemente se ha asociado a la duplicación del gen SOX 9 con la reversión sexual XX-SRY negativa (11). El gen WNT4 (gen del desarrollo homólogo al gen wingless en la drosophila) (1p35) codifica para una molécula de señalización celular que estimula la actividad de otros genes como el de la B-catenina y el factor Lcf). Se ha demostrado que la duplicación de este gen origina la reversión sexual 46,XY en el humano (12), lo que sugiere que, al igual que en la duplicación de SOX9 y DAX1, el efecto de la dosis génica es fundamental en el desarrollo sexual (Tabla 1).

**Tabla 1:** Genes, locus, función y fenotipo de los factores que participan en el desarrollo sexual.

<b>Gen</b>	<b>Locus</b>	<b>Función</b>	<b>Fenotipo</b>
SF1	9q33	Fac. de transcripción	Disgenesia gonadal/ Insuf. suprarrenal
WT1	11p13	Fac. de transcripción	Síndromes de Denys-Drash y Frasier
<b>SRY</b>	<b>Yp11.3</b>	<b>Fac. de transcripción</b>	<b>Disgenesia Gonadal XY</b>
DAX1	Xp21.3	Fac. de transcripción	Disgenesia Gonadal XY (duplicación) Hipoplasia adrenal congénita (mutación)
SOX9	17q24	Fac. de transcripción	Varón XX (duplicación) Dis. campomélica y reversión sexual XY (mut)
DMRT1	9p24	Fac. de transcripción	Disgenesia gonadal XY
HIM	19q13	Fac. de crecimiento	Persistencia de mullerianos
WNT4	1p35	Mol. señalización	Disgenesia gonadal XY (duplicación)

De los genes que participan en la diferenciación fenotípica los mejor caracterizados son los genes que codifican para la hormona inhibidora de estructuras müllerianas ó HIM (19p13.3) y su receptor (12q13), el gen de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (2p23) y el gen del receptor de andrógenos (Xq11-12). La glicoproteína codificada por el gen HIM es producida por las células de Sertoli del testículo fetal. El producto del gen HIM ejerce su efecto a través de un receptor transmembranal localizado en las células mesenquimatosas adyacentes a los conductos müllerianos (13). Después de iniciada la síntesis de HIM, las células intersticiales del testículo fetal se diferencian en las células de Leydig las cuales servirán como sustrato anatómico para la producción de la testosterona (T), andrógeno fundamental en el proceso de la virilización. La T actúa de manera local promoviendo la maduración de los túbulos seminíferos y una vez en el interior de las células blanco, es metabolizada a su forma 5- $\alpha$ -reducida. De esta manera se sintetiza así la tercera hormona fetal que participa en el desarrollo fenotípico del varón, la 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT). Su conversión metabólica es mediada por la enzima 5- $\alpha$ -esteroide reductasa y ambas hormonas se unen de manera específica al receptor de andrógenos en el citoplasma de las células blanco. El complejo andrógeno-receptor es transportado al núcleo, donde interacciona con secuencias específicas del DNA, denominadas elementos de respuesta a hormonas. Este proceso culmina con la síntesis de las proteínas que ejercerán el efecto androgénico o virilizante (14) (Figura 2).

Las alteraciones de la diferenciación sexual constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos que tienen origen en los defectos que ocurren durante las diferentes etapas del desarrollo sexual. Estas alteraciones se clasifican en cromosómicas, gonadales y fenotípicas.



**Figura 2.** Modelo de interacción génica de la diferenciación sexual del ratón. En el centro del esquema se señala la vía necesaria para el desarrollo masculino, el recuadro que contiene a DAX1 y otros represores masculinos son genes anti testículo. Los genes SF1, LIM1, WT1 etc participan en el desarrollo de la gónada indiferenciada y aseguran el desarrollo testicular.

El síndrome de Turner (ST) es una entidad con una incidencia de 1 en 2000 a 3000 recién nacidas que resulta de la ausencia total o parcial de uno de los dos cromosomas X. Las principales características de este padecimiento son: talla baja, disgenesia gonadal, infertilidad y diversas anomalías conocidas como estigmas somáticos del síndrome. Varios cariotipos pueden asociarse al ST siendo el más frecuente 45,X (55-60%), seguido por mosaicos y aberraciones estructurales de los cromosomas X o Y (15). Los estudios moleculares más recientes de nuestro laboratorio han confirmado por PCR que de 10-12% de las pacientes por citogenética convencional, presentan líneas celulares con secuencias del Y (16). En estas pacientes, existe el riesgo de desarrollar tumores de células germinales como el gonadoblastoma ó disgerminoma A pesar de los avances en el conocimiento del ST, aún se

desconocen los mecanismos por los cuales la ausencia total o parcial de un cromosoma sexual origina este cuadro clínico. Se ha sugerido que algunas de las alteraciones físicas observadas en estas pacientes (cuello corto y alado, cardiopatías, linfedema congénito) pudieran ser secundarias al higroma quístico severo durante la embriogénesis, causado por hipoalbuminemia e hipoplasia de los conductos linfáticos (17).

Aún se conoce poco acerca de los aspectos moleculares del ST, pero es evidente que la haploinsuficiencia de ciertos genes podría ser la causa del fenotipo. Los genes candidatos deben escapar al proceso de inactivación del X y tener un homólogo funcional en el cromosoma Y, pero hasta el momento solo se han identificado dos genes que cumplen con estas características: el RPS4X (Xq13) y el SHOX (PAR1) (18,19).

El tratamiento de las pacientes con ST está dirigido a aumentar la talla final (por medio de la administración de la hormona de crecimiento), corregir las anomalías somáticas, inducir las características sexuales secundarias y las menstruaciones (por medio de la administración de estrógenos-progesterona) y prevenir las complicaciones asociadas.

Los síndromes de reversión sexual son entidades poco frecuentes que afectan el desarrollo gonadal (mujeres XY, varones XX y hermafroditas verdaderos XX) y constituyen un capítulo importante dentro de la patología de la diferenciación sexual. Son originados por diferentes mecanismos tales como las mutaciones y efectos de dosis de algunos de los genes que participan en el desarrollo de la gónada. Un ejemplo de estos padecimientos es el hermafroditismo verdadero (HV).

Este estado intersexual se presenta clínicamente con ambigüedad genital la cual se caracteriza por la coexistencia de tejido testicular y ovárico en un mismo individuo, ya sea en una sola gónada (ovotestes) o de manera separada (20). En 60% de los HV el cariotipo es 46,XX, mientras que los casos restantes corresponden a 46,XY/46,XX, 46,XY o diversos mosaicos (21). Sólo el 10% de los HV 46,XX presentan el gen SRY en su genoma, lo que sugiere la existencia de genes autosómicos o ligados al X, con participación en la diferenciación testicular. Se han propuesto varios mecanismos que conducen al desarrollo del tejido testicular y ovárico en un mismo individuo: 1) mutaciones puntuales en la región codificante de SRY, observadas en tres casos esporádicos de HV con cariotipo 46,XY (22, 23) y 2) mosaicos, en los cuales el gen SRY es negativo en sangre periférica pero positivo en la gónada (24).

El tratamiento para estos pacientes depende del fenotipo, la edad al momento del diagnóstico, la funcionalidad de las gónadas y el sexo de asignación e identidad. La ambigüedad de genitales requiere de tratamiento quirúrgico, así como tratamiento hormonal sustitutivo.

Las anomalías de la diferenciación fenotípicas se dividen en dos grandes grupos: los pseudohermafroditismos masculinos (SHM) en los que se presenta un cariotipo 46, XY, el desarrollo testicular bilateral y fenotipo femenino o ambiguo y los pseudohermafroditismos femeninos (SHF) con complemento sexo cromosómico 46,XX, ovarios bilaterales y grados variables de virilización de los genitales externos. Dentro de los SHM los más frecuentes y mejor estudiados son los síndromes de insensibilidad a la acción de los andrógenos, heredados en forma recesiva ligada al cromosoma X, los cuales son productos de mutaciones en el gen del receptor de andrógenos (25,14). En los casos de insensibilidad completa a la acción de los

andrógenos (ICAA) las pacientes presentan fenotipo femenino con testículos bilaterales en la cavidad abdominal o en la región inguinal. En la pubertad se observa un desarrollo mamario y *habitus* exterior femenino, con escasez o ausencia de vello axilar y púbico, en los genitales se observan, los labios mayores y menores son hipoplásicos y la vagina corta termina en fondo de saco. La insensibilidad de las células blanco a la acción de los andrógenos impide la diferenciación de los conductos wolffianos, en cambio la acción de la HIM es normal (25). El tratamiento quirúrgico en estas pacientes consiste en extirpar los testículos criptorquídicos, preferentemente después de la edad de la pubertad, para evitar su posible malignización e iniciar tratamiento sustitutivo basado en combinados de estrógeno-progestágeno. Dado que el padecimiento se transmite en forma recesiva ligada al X, es necesario identificar el estado de portadoras en mujeres de la línea materna.

La insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos (IPAA) incluye a un grupo heterogéneo de pacientes con un amplio espectro clínico que varía desde un fenotipo femenino con desarrollo parcial de estructuras wolffianas, seudovagina, labios mayores y menores hipodesarrollados, ginecomastia y discreto vello púbico y axilar, hasta un fenotipo masculino con datos de virilización incompleta como hipospadias y/o ginecomastia. Mutaciones en el gen del receptor de los andrógenos son las responsables de ambas formas de SHM. Este gen consta de 8 exones, siendo las mutaciones en el exón 1 muy raras y la mayoría caen en los exones 2-8 (26).

Dentro de los SHF, la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa es la causa más frecuente de los bloqueos enzimáticos que producen hiperplasia suprarrenal congénita (90% de los casos). Debido a su elevada frecuencia, a la severidad del padecimiento y a la posibilidad de prevenir las complicaciones con un manejo temprano adecuado, los recién nacidos con ambigüedad genital y cariotipo 46,XX siempre deberán considerar la HSC como primera opción diagnóstica (27). El examen físico revela diversos grados de virilización de los genitales externos con la presencia de ovarios y genitales internos femeninos. El gen que codifica para la 21-hidroxilasa (CYP21B) se encuentra en la posición 6p21 y en la misma región existe un seudogen CYP21A. El gen y el seudogen tienen una homología de secuencia de 98 % en sus 10 exones.

Las diferencias en secuencia entre ambos son muy pequeñas y los codones de terminación en el seudogen hacen que su producto, aunque se transcriba, no sea funcional. La mayoría de las mutaciones en el gen CYP21B en los pacientes con deficiencia de la 21-hidroxilasa son las mismas que se observan en el seudogen (28). Esto permite concluir que las diferentes mutaciones son generadas por eventos de recombinación ilegítima y conversión génica, resultando de la transferencia de mutaciones deletéreas del seudogen al gen funcional. El abordaje terapéutico de la HSC se enfoca sobre todo a solucionar la deficiencia de cortisol, la pérdida de sal y el desequilibrio hidroelectrolítico, la sobreproducción de ACTH, el crecimiento acelerado y la ambigüedad genital. El tratamiento con glucocorticoides como la hidrocortisona o sus derivados sintéticos, reemplaza la disminución de glucocorticoides y suprime la producción de ACTH, así como disminuye las alteraciones sobre el crecimiento y desarrollo debidos al incremento en la síntesis de andrógenos.

En la variedad perdedora de sal (es el nombre médico), la administración de los mineralocorticoides, como la fluorohidrocortisona y de cargas de sal, corrigen las anomalías hidroelectrolíticas al normalizar la actividad de la renina en el plasma (28).

## Referencias

1. Sinclair, A.H, Berta, P., Palmer, M.S., et al. (1991) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346: 240-244.
2. Capel, B. (1998) Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 497-523.
3. Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., et al. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 348: 450-452.
4. Veitia, R., Ion, A., Barboux, S., et al. (1997) Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum. Genet.* 99: 648-652.
5. Huang, B., Wang, S., Ning, Y. et al. (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87: 349-353.
6. Hiort, O., Holterhus, P-M. (2000) The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur. J. Endocrinol.* 142: 101-110.
7. Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., et al. (1993) WT1 is required for early kidney development. *Cell*. 74: 679-691.
8. Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 77: 481-490.
9. Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., et al. (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.* 7: 497-501.
10. Schafer A. J., Dominguez-Steglich M. A., Guioli S., Kwok C., Weller P. A. Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I. D., Goodfellow P. N. (1995) The role of SOX9 in autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 350: 271-278.
11. Hamaguchi, K., Arikawa, M., Yasunaga, S., et al. (1999) Novel mutation of the DAX1 gene in a patient with X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Am. J. Med. Genet.* 397: 349-353.
12. Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S.T., et al (2001) Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1102-1109.
13. Josso, N., Lamarre, I., Picard, J-Y. (1993) Anti-Müllerian hormone in early human development. *Early. Hum. Dev.* 33: 91-99.
14. Zhou, Z-X., Wong, C-I., Sar, M., Wilson, E.M. (1994) The androgen receptor: an overview. *Recent. Prog. Horm. Res.* 49: 249-274.
15. Lippe, B. (1991) Turner syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 20: 121-152.
16. Gravholt, C.H., Fedder, J., Naeraa, R.W., Muller, J. (2000) Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material a population study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 3199-3202.
17. Ogata, T., Hasegawa, T., Matsuo, N. (1997) Further clinical model for the possible impairment of a putative lymphogenic gene(s) for Turner stigmata. *Hum. Genet.* 99: 290.
18. Zinn AR, Ross JL. (1998) Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Opin Genet Dev* 8: 322-327.
19. Ogata, T., Matsuo, N., Nishimura, G. (2001) SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. *J. Med. Genet.* 38: 1-6.
20. Van Niekerk, W., Retief, A. (1981) The gonads of true hermaphrodites. *Hum. Genet.* 58: 117-122.
21. López M., Torres L., Méndez J. P., Cervantes A., Pérez-Palacios G., Erickson R. P., Alfaro G., Kofman-Alfaro S. (1995) Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin. Genet.* 48: 29-34.
22. Hiort, O., Gramss, B., Klaubert, G.T. (1995) True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the SRY gene. *J. Pediatr.* 126: 1022.
23. Maier, E.M., Leitner, C., Lohrs, U., Kuhnle, U. (2003) True hermaphroditism in an XY individual due to a familial point mutation of the SRY gene. *J. Pediatr Endocrinol. Metab.* 16: 575-80.
24. Queipo, G., Zenteno, J.C., Pena, R., et al., (2002) Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum Genet.* 111: 278-83.
25. Quigley, C.H., DeBellis, A., Marschke, K., et al. (1995) Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives. *Endoc. Rev.* 16: 271-321.
26. Gottlieb, B., Beitel, L., Lumbroso, R., Pinsky, L., Triffiro M. (1999) Update of the androgen receptor gene mutations database. *Hum. Mutat.* 14: 103-114.
27. Donohue, PA., Parker, K., Migeon, C.J. (1995) Congenital adrenal hyperplasia. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited diseases*. Nueva York: McGraw Hill, 2929-2966.

28. Miller, W.L. (1994) Genetics, diagnosis, and management of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 78: 241-246.

## DIFERENCIACIÓN SEXUAL NORMAL Y PATOLÓGICA

### Resumen.

La diferenciación sexual en el humano es un proceso complejo finamente regulado por la acción de diversas señales genéticas que en conjunción con señales hormonales promueven el desarrollo masculino o femenino. A diferencia de especies como peces o aves, los factores ambientales no influyen en la determinación sexual humana y por esta razón las anomalías de este proceso en nuestra especie son resultado de alteraciones moleculares específicas cuya identificación ha permitido establecer un modelo génico jerárquico de desarrollo sexual. Un aspecto de gran importancia es que las mutaciones que afectan a estos genes no son letales y sólo originan individuos con estados intersexuales o con infertilidad, lo que ofrece una oportunidad única para estudiar los efectos fenotípicos resultantes permitiendo además identificar el periodo de desarrollo en que un gen particular interviene en la diferenciación sexual.

**Palabras clave:** Determinación sexual; desarrollo gonadal; SRY; factores de transcripción.

### Semblanza de la Dra. Susana Kofman-Alfaro.

La Dra. Susana Kofman-Alfaro nació en la ciudad de Buenos Aires, República de Argentina, cursando la licenciatura de médico cirujano en la Universidad de dicha capital y la especialidad en pediatría en el Instituto Giannina Gaslini, en la Universidad de Degli Studi, en Génova Italia. Posteriormente, realizó una estancia en el laboratorio del Dr. Jean de Grouche, en el Hospital des Enfants Maladies en Paris, Francia, iniciando así su entrenamiento formal en genética médica. Su formación como investigadores en esta disciplina la realizó en la Clinical and Population Cytogenetics Unit, del Western General Hospital de Edimburgo, en Escocia, Gran Bretaña y con apoyo del Medical Research Council, desempeñándose como estudiante becaria de posgrado y posteriormente como investigadora. En 1973 se incorporó al servicio de Genética del Hospital General de México y a la Facultad de Medicina de la UNAM. La Dra. Kofman ha dirigido siete tesis de licenciatura, 11 de especialidad, 15 de maestría y 3 de doctorado. Actualmente es Investigadora Nacional nivel III y su producción científica se encuentra plasmada en por lo menos 135 publicaciones en revistas periódicas especializadas de circulación internacional. Ha publicado 29 capítulos de libro especializado en el área de genética, su trabajo de investigación la ha hecho acreedora a 12 premios.

### Semblanza de la Dra. Gloria E. Queipo García.

La Dra. Gloria E. Queipo García nació en la Cd. de México, cursando la licenciatura en Medicina en la Universidad la Salle, dentro del área médica la Dra. Queipo realizó un año de especialización en medicina interna en el Hospital ABC así como la residencia en Genética

Médica en el Hospital General de México dentro del programa de residencias de la Facultad de Medicina UNAM donde realizó su entrenamiento formal dentro de la Genética Humana. La realización de una Maestría en Investigación Biomédica Básica en el Instituto de Investigaciones Biomédicas inició su formación dentro de la investigación, los estudios de Doctorado fueron realizados bajo la tutoría de la Dra. Kofman en el programa de Ciencias Médicas de la Facultad de Medicina-UNAM, en el año 2002 realizó una estancia en la Universidad de Los Ángeles California con lo que culminó su preparación. Actualmente la Dra. Queipo realiza sus actividades de asistencia, docencia e investigación en el Servicio de Genética del Hospital General de México, es Investigador Nacional nivel I. Dentro de su productividad científica se encuentran 9 artículos en revistas internacionales especializadas en el área, dirige 6 estudiantes de posgrado y ha sido acreedora a tres premios por Investigación clínica.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## APOLIPOPROTEÍNAS HUMANAS EN LA INTERFASE AIRE/AGUA

Juan Xicohtencatl-Cortés<sup>1</sup>, Juan Pablo Reyes-Grajeda<sup>1</sup>, Abel Moreno<sup>2</sup>,  
Rolando Castillo<sup>3</sup> y Jaime Mas-Oliva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-243, México D.F. 04510,

<sup>2</sup> Instituto de Química, UNAM,

<sup>3</sup> Instituto de Física, UNAM.

[jmas@ifc.unam.mx](mailto:jmas@ifc.unam.mx)

### HUMAN APOLIPOPROTEINS AT THE AIR/WATER INTERFACE

#### Abstract

*The study of exchangeable apolipoproteins (AI, AII, CI, CIII and E3) employing Langmuir monolayers has been important to explain the relationship between structure and function of amphipathic proteins. The secondary structure prediction analysis of these proteins and circular dichroism (CD) of them show a high percentage of amphipathic  $\alpha$ -helix that is preserved at very high ionic force. The amphipathic character conserved in different apolipoproteins allow them to be orientated at the air/water interface to form Langmuir monolayers, however, in a water/lipid interface the apolipoproteins penetrate the monolayer to form binary Langmuir monolayers. During the lateral pressure in monolayers we observed organizational changes, known as phase transitions, which can be observed directly with Brewster angle microscopy (BAM) and atomic force microscopy (AFM). Langmuir monolayers formed with apolipoproteins (C1 and AII) onto a highly ionic subphase, showed structural changes at high lateral pressures. Therefore, these structural changes could have a correlation to the changes of superficial tension from a nascent or discoidal HDL to a mature spherical HDL.*

*These differences in surface tension of HDL directly related to the different structural conditions of apolipoproteins might be involved with the exchangeability process as observed with this class of apolipoproteins, as well as with recognition by specific receptors at the cell surface.*

**Keywords:** Apolipoprotein, Langmuir monolayers,  $\alpha$ -Helix, Lipoproteins.



## Introducción

Las apolipoproteínas (apos) del plasma se encuentran en todos los mamíferos y se clasifican en dos grandes grupos: apos intercambiables y apos no intercambiables. Las apos no intercambiables, se caracterizan por estar siempre unidas a un tipo particular de lipoproteína, como a las B48 y B100, mientras que las apos intercambiables se caracterizan por presentar un gran dinamismo para poder ser transferidas de una lipoproteína a otra. Presentan la capacidad de transferir lípidos entre diferentes partículas lipoproteícas y llevan a cabo el reconocimiento a receptores celulares. Miembros de este grupo son las apos AI, AII, CI, CII, CIII y E3. Es importante mencionar que aún falta mucho por conocer acerca de la función fisiológica de estas proteínas, donde posiblemente existe una relación directa con cambios de conformación a nivel de estructura secundaria y terciaria. Con diferentes métodos de predicción de estructura secundaria como los desarrollados por Chou y Fasman, Garnier y Robson y Rost [1, 2, 3], se ha observado una gran correspondencia a nivel de estructura secundaria entre las diferentes apos y la proteína transferidora de esteres de colesterol (CETP), encontrado altos porcentajes de estructura hélice  $\alpha$  [4, 5, 6]. Estas hélices  $\alpha$  son de tipo anfipático ya que presentan arreglos característicos, donde los residuos de aminoácidos con propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, se orientan asimétricamente en direcciones opuestas formando dos regiones bien definidas. Esta distribución de los residuos de aminoácidos a lo largo de la hélice  $\alpha$  está directamente relacionado con valores del momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ ) [7, 8, 5, 6], el cual ha sido propuesto como un parámetro importante para obtener un análisis cuantitativo del grado de anfipaticidad de ciertos segmentos helicoidales, en donde segmentos con valores de  $\mu\text{H}$  por arriba de 0.2 kcal/mol son considerados como propensos a formar una hélice  $\alpha$  de tipo anfipática [9]. Recientes estudios muestran que no sólo la contribución de una región anfipática que interacciona directamente con lípidos debe ser considerada, pues al parecer existe una cooperatividad entre las múltiples regiones helicoidales  $\alpha$  que conforman una apolipoproteína, y que nos permiten explicar tanto su grado de afinidad como su especificidad a lípidos. Asimismo, se ha demostrado que el momento dipolar de una hélice  $\alpha$  contribuye al valor promedio del momento dipolar total de una proteína. Por lo tanto, el valor del  $\mu\text{H}$  de cada hélice  $\alpha$  contribuye al momento hidrofóbico total de una proteína [10].

Existe una serie de proteínas con características anfipáticas que forman películas de Langmuir, las cuales han sido estudiadas intensivamente mediante técnicas experimentales como microscopía de fluorescencia polarizada, difracción de rayos X, microscopía de ángulo de Brewster (MAB) y microscopía de fuerza atómica (MFA) [11, 12, 13, 14, 15]. De las proteínas más estudiadas con estas técnicas encontramos a las siguientes: citocromo c [16, 17, 18], acetilcolinesterasa [19], estreptavidina [20], proteína surfactante humana SP-B [21], proteína hemo tetra helicoidal  $\alpha$  ( $\alpha\text{ss}\alpha$ ) [22] y recientemente las apos CI, AII, CIII, AI y E3 estudiadas por nuestro grupo [5, 6].

Las monocapas de Langmuir son películas de una molécula de espesor localizadas en una interfase aire/agua. Comúnmente para su formación se usan moléculas anfifílicas con una región hidrofílica y otra hidrofóbica que permiten formar un sistema en dos dimensiones manejando dos variables termodinámicas: la temperatura y la presión lateral (diferencia de tensión superficial del agua pura y el agua con la monocapa en la superficie). Únicamente cambiando la cabeza o la cola de las moléculas o bien cambiando el pH y la fuerza iónica de la

subfase, se puede variar la interacción de la monocapa con el sustrato y la interacción intermolecular.

Durante el comienzo de la compresión lateral de una monocapa se obtiene una isoterma (presión contra área), en donde se presentan diferentes estados de organización de la monocapa. A bajas presiones laterales se observa una fase de baja compresibilidad conocida como fase gaseosa (*G*), con un incremento en la presión se presenta una fase líquida expandida (*L*), al reducir aún más el área/molécula de la monocapa da lugar a otra transición de un líquido expandido a una fase condensada (*L/LC*), hasta alcanzar un colapso. Los cambios de fase o de organización de la monocapa por efecto de la presión lateral pueden ser observados mediante microscopía de ángulo de Brewster.

La microscopía de ángulo de Brewster es una técnica relativamente nueva que permite la observación directa de las monocapas en la interfase agua/aire durante la compresión lateral. Esta técnica se basa en el estudio de la luz reflejada proveniente de una interfase iluminada por un rayo láser polarizado  $p$  en el plano de incidencia, formando un ángulo  $\theta$  de 53.1 grados conocido como ángulo de Brewster. Cuando el ángulo de incidencia del rayo láser es el ángulo de Brewster no se refleja luz en una interfase limpia y perfecta; es decir, el índice refractivo cambia abruptamente de un medio a otro. Para una interfase real se tiene una región de transición, donde el índice refractivo cambia suavemente de un valor a otro. La intensidad de luz reflejada en el ángulo de Brewster es mínima, pero no desaparece completamente. Esta luz reflejada depende fuertemente de las características de la interfase, densidad molecular y anisotropía molecular. Estas propiedades son modificadas particularmente cuando una monocapa se localiza en la interfase aire/agua. Por lo tanto, una monocapa sobre una interfase es capaz de producir un reflejo de luz en fases inclinadas, donde la anisotropía es suficientemente fuerte como para tener reflexión, y hacer visible el mosaico de texturas debido a los dominios inclinados. Las transiciones de fase son más visibles cuando se presenta un cambio en el grado de contraste, alteración repentina del mosaico de texturas o como cambios en los dominios de los bordes.

En esta revisión, se mostrarán una serie de propiedades comunes de algunas de las apos intercambiables mediante el análisis comparativo de secuencias primarias, análisis de estructura secundaria, comparación en su grado de anfifilicidad, tipos de hélices  $\alpha$  anfipáticas que presentan isotermas presión-área, así como su análisis con MAB y MFA.

### **Apolipoproteína AII**

La apo AII humana es la segunda proteína más abundante de las HDL, cerca del 25 % de la masa de la lipoproteína corresponde a esta proteína. Se sintetiza principalmente en el hígado y en menor porcentaje en el intestino delgado [23, 24, 25]. Se encuentra como dímero y esta constituida por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 77 residuos de aminoácidos, unidas por un puente disulfuro en la posición 6, y entre los dos monómeros presentan una masa molecular de 17.4 kDa con un punto isoelectrónico de 4.9. Esta proteína juega un papel importante en el metabolismo de las HDL, regula a lipasa hepática, desplaza a la apo AI de la superficie de las HDL y compete por los sitios de unión de las HDL en la superficie celular. Sin embargo el desplazamiento de la apo AI puede dañar la capacidad de transporte reverso del colesterol y por lo tanto aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades isquémicas [25].

La apo All al igual que otras apos intercambiables y diferentes tipos de proteínas transferidoras de ésteres de colesterol (CETP), proteínas que incrementan la permeabilidad bactericida (BPI), proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) presentan actividades comunes, como la unión y la transferencia de lípidos, pero no guardan entre si homología a nivel de estructura primaria [10]. Sin embargo, resulta muy interesante observar como estas proteínas presentan altos porcentajes de homología a nivel de estructura secundaria [10, 6]. Con diferentes algoritmos de predicción se ha observado que la apo All presenta dos segmentos hélice  $\alpha$  entre los aminoácidos 7-27 y 32-67, observando una orientación y distribución asimétrica de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de su eje. Aunado a esto, los análisis teóricos han demostrado que las hélices  $\alpha$  de esta proteína presentan valores de  $\mu H$  por arriba de 0.2 kcal/mol por residuo, donde la región 7-27 presenta un valor de  $\mu H$  de 0.49 kcal/mol por residuo y la región 32-67 corresponde a un valor de 0.34 kcal/mol por residuo y un valor promedio de  $\mu H$  de 0.415 kcal/mol por residuo (Tabla 1) [6].

**Tabla 1.** Cálculo de los valores del  $\mu H$  de las regiones de las hélices  $\alpha$  anfipáticas, de las apos All y CI intercambiables.

Apoproteínas	Número de aminoácidos	Masa molecular (Da)	Segmentos helicoidales	Valores de $\mu H$
Apo CI	57	6 630	4-30	0.54
			35-53	0.36
Apo All	77	8 708	7-27	0.49
			32-67	0.34

Los análisis teóricos de estructura secundaria de la apo All guardan una correlación directa con los resultados obtenidos con difracción circular (DC). Los espectros de DC revelan dos valores mínimos: el primero se observa a 222 nm que corresponde a una hélice  $\alpha$   $n-\pi$  y el segundo se observa a 208 nm que corresponde a un tipo de hélice  $\alpha$   $\pi-\pi^*$  y una vuelta al azar del tipo  $\pi-\pi^*$ . Cuando la proteína se somete a temperaturas de 20 a 90 °C con incrementos de 10 °C entre cada intervalo, se observa un carácter de reversibilidad donde se recupera el 100 % de la conformación nativa, presentan un punto isodicroico a 204-205 nm, un sólo estado de transición (208 y 222 nm) y muestra que la integridad de la estructura hélice  $\alpha$  anfipática es dependiente de la temperatura (6, 26). Cuando se asocia a fosfolípidos se observa una mayor estabilidad, con un incremento en los porcentajes de su estructura secundaria, lo cual puede ser importante para entender los procesos de reconocimiento y transferencia de lípidos.

La apo All tiene la capacidad de orientarse en una interfase aire/agua para formar monocapas de Langmuir, cuando se dispersa en una solución de fosfatos 20 mM, pH 8.0 y con 3.5 M de KCl. Durante la compresión lateral de la monocapa se presentan incrementos en la presión lateral (la cual es medida usando un galvanómetro acoplado a una placa de Wilhelmy, que no es más que una tira de papel filtro que se encuentra perpendicularmente en contacto con la monocapa), observándose cambios de organización en la monocapa conocidos como transiciones de fase. Estas transiciones de fase se pueden observar en isotermas típicas al

graficar el área contra la presión lateral y en imágenes de MAB. La isoterma de la apo All muestra varias características (Figura 1). Después de dispersar a la proteína en la subfase se forma una monocapa presentando propiedades de una fase gaseosa (*G*), donde no existen interacciones intermoleculares e intramoleculares. Con un incremento en la presión lateral se presenta una primera transición de fase de un estado gas a un estado líquido expandido (*L*), comenzando aproximadamente con una área inicial de  $5000 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Con una presión lateral mayor justo después de la transición de fase *G/L*, se presenta una fase *L* típica de baja compresibilidad (Fig. 1a), en donde se observan defectos en la monocapa que cambian a una velocidad lenta y son similares a los que se encuentran en la coexistencia *G/L*, revelando las diferentes viscosidades de ambas fases (Figura 1b). Con un incremento mayor en la presión lateral a una  $\Pi \sim 30\text{-}35 \text{ mN/m}$  y una  $a \sim 1000\text{-}2500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , se observa una segunda transición de fase típica entre dos fases condensadas *L/LC*. Los dominios que presentan una textura de color oscuro de bajo contraste corresponden a la fase *L* y los dominios que presentan una textura de gran brillantez con alto contraste corresponden a la fase *LC*. Las observaciones realizadas con MAB revelan que durante la compresión lateral de la monocapa, la fase *L* comienza a nuclearse para formar a una fase *LC* de gran brillantez cubriendo a toda el área de la monocapa. Los dominios de la fase de *L* presentan una fluidez que cambia a dominios sólidos y brillantes conforme incrementa la presión lateral. En la figura 1c se observa que al final de la compresión lateral de la monocapa de la apo All a una  $\Pi \sim 47 \text{ mN/m}$  y una  $a \sim 500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , aparecen defectos que se asemejan a un colapso típico posiblemente asociada a la formación de multicapas.

La segunda transición de fase *L/LC* que muestra la monocapa de la apo All, es probablemente la misma transición de fase que se observa en la monocapa de la apo C1 donde una región hélice  $\alpha$  anfipática de la proteína se desprende de la interfase aire/agua para ocupar una menor área de superficie [5]. La pérdida de área durante la transición de fase y los cambios de reflectividad muy probablemente se deben a cambios de conformación de la proteína, como una consecuencia de la compresión lateral de la monocapa al separarse de la interfase un fragmento de la apo. Las hélices  $\alpha$  desprendidas de la interfase aire/agua probablemente no guardan ninguna correlación intra o supramolecular, porque no se observan texturas diferentes en los dominios de las fases condensadas. Los segmentos hélice  $\alpha$  32-67 de la apo All se encuentra fuera de la interfase con dirección hacia el aire mostrando un valor de momento hidrofóbico de  $0.34 \text{ kcal/mol}$  por residuo, mientras que el segmento que se encuentra sobre la interfase muestra un valor de  $0.49 \text{ kcal/mol}$  por residuo.

Las monocapas de la apo All fueron transferidas sobre mica hidrofílica a  $25^\circ\text{C}$ , durante la fase *L* a una presión lateral de  $20 \text{ mN/m}$ , justo antes de la segunda transición de fase *L/LC*. La figura 1d muestra una imagen de MFA en modo compacto, observándose como las moléculas de la apo All se auto-organizan en líneas brillantes dispuestas horizontalmente sobre la superficie de la mica. El grosor de las líneas brillantes que se observan en la figura 1d es de  $17 \text{ \AA}$  y la diferencia promedio de altura entre los dominios brillantes y los dominios oscuros es del orden de  $5.4 \text{ \AA}$ . Sin embargo, en diferentes monocapas de Langmuir de la apo All se han observado líneas que pueden alcanzar hasta un grosor de aproximadamente de  $20 \text{ \AA}$ . La diferencia en los valores de diámetro de las líneas brillantes que se observan mediante MFA, posiblemente se debe a que la apo All es una proteína formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas, unidas por un puente disulfuro en la posición 6 donde cada una esta formada por dos regiones hélice  $\alpha$  y una región estructurada en forma irregular. Si bien, se esperaba que las cadenas polipeptídicas de la apo All pudieran presentar una dirección semejante a como se habían observado en las

monocapas de la apo CI, el puente disulfuro probablemente establece un límite para la conformación de los grados de libertad de la apo AII. Pero el grosor de las líneas corresponde al doble valor de diámetro de una cadena hélice  $\alpha$  y las imágenes de MFA sugieren que estas líneas están formadas por dos cadenas polipeptídicas. Estas cadenas polipeptídicas están alineadas paralelamente sobre la superficie del agua, con las regiones hidrofóbicas expuestas hacia el aire y las regiones hidrofílicas interaccionando con la superficie de la mica. Sin embargo, las hélice  $\alpha$  en ambas cadenas polipeptídicas localizadas en el extremo opuesto del puente disulfuro, pueden presentar diferentes conformaciones por lo que no necesitan estar completamente paralelos y tampoco cercanos uno a otro.

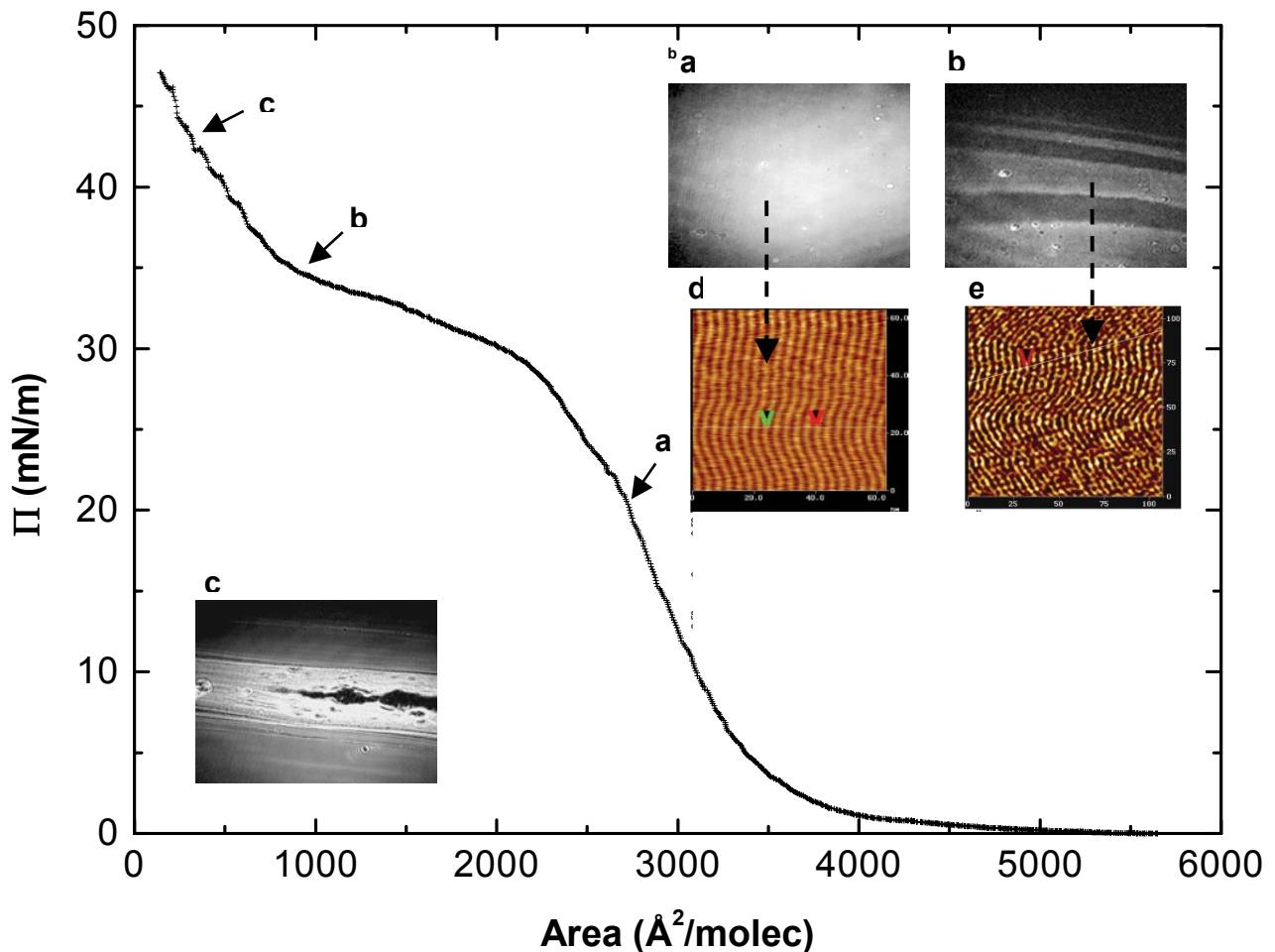
La figura 1e muestra una imagen de MFA de una monocapa de apo AII, transferida en mica a 25 °C durante la fase LC, a una presión lateral de  $\sim 38$  mN/m. En esta imagen se observa claramente la formación de líneas brillantes y oscuras, indicando las diferentes alturas entre la mica plana y la proteína. La altura a lo largo de las líneas brillantes (proteína) presenta una textura poco uniforme, debido a la extensión de los dominios brillantes de aproximadamente 2.0-2.5 nm de largo, indicando que la inclinación de las hélices  $\alpha$  no está ordenada a lo largo de toda su longitud. Las líneas brillantes en forma de dominios elongados tienen un grosor promedio de 2 nm, que corresponden aproximadamente al diámetro de la proteína dimérica y presentan una distancia promedio entre centro-centro de las líneas oscuras de  $35.2 \pm 4$  nm [27]. En este caso, es muy probable que las dos hélices  $\alpha$  de la proteína desprendidas de la superficie, le confieran un incremento de tamaño a los dominios blancos debido a que la apo AII contiene dos cadenas polipeptídicas idénticas y cada una de ellas contiene dos hélices  $\alpha$  unidas por fragmento polipeptídico poco estructurado. Este cambio de conformación donde las dos hélices  $\alpha$  desprendidas de la interfase agua/aire y el otro par de hélices  $\alpha$  interaccionado con la superficie del agua, puede explicar la pérdida grande de área por partícula en la isoterma durante la transición de fase L/LC. Estos resultados coinciden con las imágenes obtenidas con MAB, ya que es una técnica muy sensible para diferenciar el grosor de la monocapa durante la transición de fase L/LC, donde los diferentes niveles de reflectividad entre los dominios de la fase LC (más altos) y los dominios de la fase L (más bajos), revelan las diferencias de altura de la monocapa. Sin embargo, es muy complicado poder definir con exactitud qué par de hélices  $\alpha$  se encuentra desprendida de la superficie del agua, si son los residuos de la región 7-27 o los residuos de la región 32-67 o si ambas hélices  $\alpha$  forman la pareja desprendida en alguna extensión o dirección. Considerando los valores de momento hidrofóbico, la región de hélice  $\alpha$  32-67 se encuentra sobre la interfase agua/aire con un valor de 0.49 kcal/mol por residuo, mientras que la región de hélice  $\alpha$  7-27 se orienta hacia el aire con un valor de 0.34 kcal/mol por residuo [6]. Las observaciones hechas con MFA confirman este hecho y las imágenes obtenidas durante la fase LC muestran líneas oscuras con una distancia promedio de separación de 35.2 Å muy cercanas a la longitud de las hélices  $\alpha$  cortas (31.5 Å) y aún más cortas con respecto a la longitud de las hélices  $\alpha$  grandes (54.0 Å).

### **Apolipoproteína CI**

La apo CI es una proteína que contiene 57 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 6.7 kDa, se encuentra distribuida principalmente en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y en menor proporción en HDL. Es una proteína activadora secundaria de la enzima lecitin colesterol acil transferasa (LCAT), es responsable para la formación de los esteres

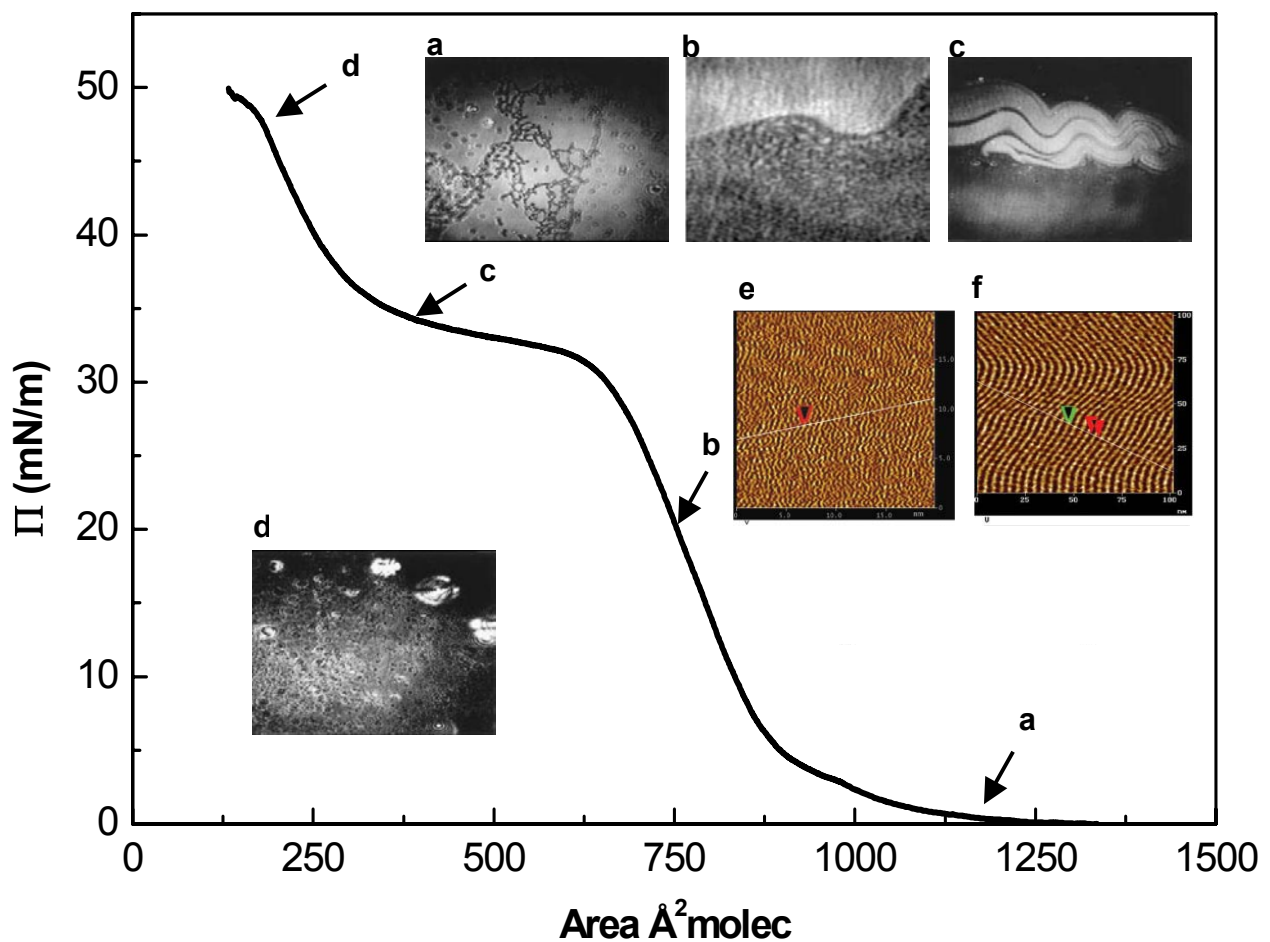
de colesterol, inhibe a la fosfolipasa  $A_2$ , a la lipasa hepática y estimula el crecimiento celular [28, 29]. Participa en la asimilación adecuada de los quilomicrones por parte de las células hepáticas, en la modulación que ejerce sobre la apo E durante su interacción con partículas  $\beta$ -VLDL e inhibe el metabolismo celular dependiente de apo E de las VLDL a través de los receptores de la LDL [30].

Asimismo, análisis de predicción de estructura secundaria muestran en esta proteína dos segmentos hélices  $\alpha$  entre los residuos de aminoácidos 4-30 y 35-53 [5, 6]. A lo largo de estas hélices  $\alpha$  se ha observado una gran abundancia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos que están distribuidos solo hacia una dirección. Esta distribución está relacionada directamente con los valores de momento bipolar ( $\mu H$ ) de esta proteína, lo cual puede ser un parámetro importante



**Figura 1.** Isotherma e imágenes de MAB y AFM de la apolipoproteína AII. a) Imagen de MAB durante la fase L a una  $\Pi \sim 20$  mN/m. b) Imagen de MAB en la coexistencia L/LC a una  $\Pi \sim 33-35$ . c) Imagen de MAB de un colapso típico a una  $\Pi \sim 47$  mN/m. d) Imagen de AFM a una  $\Pi \sim 20$  mN/m. e) Imagen de AFM después de la transición de fase L/LC.

para la unión a lípidos. El  $\mu\text{H}$  promedio de esta proteína es de 0.45 kcal/mol por residuo, mientras que en las regiones 4-30 y 35-53 presentan valores de 0.54 y 0.36 kcal/mol por residuo, respectivamente (Tabla1) [10, 5]. Los porcentajes de hélice  $\alpha$  calculados teóricamente guardan una gran correlación con los resultados de DC, en donde se observan porcentajes altos de estructura hélice  $\alpha$  altamente estable. Durante los procesos de desplegamiento y replegamiento por calor, los espectros de DC indican que para esta proteína existen dos estados intermedios, mientras que un punto isodicroico a 204-205 nm sugiere que siempre son los mismos [5, 6, 31]. En esta región se puede observar los diferentes estados de replegamiento de la proteína, conocidos como glóbulos fundidos, los cuales se ha observado que a pesar que haber perdido



**Figura 2.** Isotherma e imágenes de MAB y AFM de la apolipoproteína CI. a) Imagen de MAB a una presión  $\Pi \sim 0$  mN/m. b) Imagen de MAB durante la fase L a una  $\Pi \sim 20$  mN/m. c) Imagen de MAB en la coexistencia L/LC. d) Imagen de MAB de un colapso típico a una  $\Pi \sim 47$  mN/m. e) Imagen de AFM a una  $\Pi \sim 20$  mN/m. f) Imagen de AFM después de la transición de fase L/LC.

parte del contenido de su estructura secundaria, la proteína sigue llevando a cabo su función biológica, como el reconocimiento a lípidos [32]. Con DC se ha observado que la apo CI no sufre cambios de conformación al igual que las apos AI, CIII, E3 y AII cuando son dispersadas en una solución de 3.5 M de KCl [5, 6]. Sin embargo, se ha demostrado que en presencia de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o con un incremento en la concentración de proteína, se favorece el aumento en los porcentajes de estructura secundaria, asociado con un incremento en la entalpía y en la energía de activación [32].

Las propiedades fisicoquímicas que presenta la apo CI son muy importantes para la formación de monocapas de Langmuir en una interfase aire/agua [5]. En la figura 2 se muestra una isoterma típica de la apo CI a 25 °C, el cual presenta varias características: Una primera transición *G/L* a una  $\Pi \sim 0$  mN/m y una  $a \sim 1250$  Å<sup>2</sup>/molec. Con MAB se observan pequeños dominios oscuros que corresponde a la fase gaseosa, mientras que los dominios brillantes corresponden la fase *L* (Figura 2 a). Saliendo de la coexistencia *G/L*, a una presión de  $\Pi \sim 20$  mN/m justo durante la fase *L*, se observa a una monocapa sin contraste y con dominios poco definidos (Fig. 2 b). Con un incremento en la presión lateral a una  $\Pi \sim 33-35$  mN/m y una  $a \sim 525-355$  Å<sup>2</sup>/molec, se presenta una segunda transición de fase *L/LC*. Con MAB se observan grandes dominios brillantes con una alta reflectividad que crecen conforme la fase líquida expandida cambia a una fase líquida más condensada (Fig. 2c). Durante la segunda transición de fase hay una pérdida de área del orden de 200 Å<sup>2</sup>, valor que corresponde al área de la región hélice  $\alpha$  4-30 (202.5 Å<sup>2</sup>/molec). Al final de la compresión de la monocapa a una  $\Pi \sim 47$  mN/m y una  $a \sim 550$  Å<sup>2</sup>/molec se presenta un colapso típico, observado anillos de Newton, dominios que forman multicapas con gran brillantes y totalmente sólidas (Figura 2d) [5].

Las monocapas de la apo CI fueron transferidas en mica hidrofílica durante la fase *L* a  $\Pi \sim 20$  mN/m, justo antes de la segunda transición de fase *LC*. La figura 2e muestra una imagen de MFA obtenida a alta resolución. En esta imagen se observan líneas poco ordenadas con un grosor de 4 a 9 Å, que corresponden aproximadamente a el diámetro de una molécula de apo CI de 0.5 nm. Sin embargo, la longitud de estas líneas no se puede determinar con exactitud, porque no son líneas completamente continuas y ordenadas. A lo largo de estas imágenes se observan algunas líneas, con una longitud que corresponde al valor de una molécula de apo CI de 85 Å o de sus dos hélices  $\alpha$  40 y 28 Å [27]. Se ha observado que estas líneas cambian de dirección continuamente y se ha sugerido que el orden posicional que guardan las moléculas proteicas no es de largo alcance.

La falta de orden de las películas de LB, la fluidez observada con MAB [5] y la falta de picos de difracción de rayos X [27] parecen confirmar la naturaleza de un líquido bidimensional para la fase *L*. Se ha propuesto que las moléculas de la apo CI en la fase *L* a 20 mN/m, se disponen paralelamente a la superficie de la mica. Por lo tanto, las dos hélices  $\alpha$  de la apo CI se encuentran dispuestas sobre la superficie del agua interaccionando con su cara hidrofílica, mientras que la cara hidrofóbica se orienta hacia el aire. Esta organización de la proteína en la interfase aire/agua se fundamenta en su carácter anfipático.

La figura 2f muestra una imagen de MFA obtenida de una monocapa de apo CI transferida en mica durante la transición de fase *LC*. En esta imagen se observan líneas brillantes separadas por líneas oscuras, localizadas en diferentes niveles de altura como se pueden apreciar con los distintos valores de contraste. Las líneas brillantes presentan un grosor



de 1.5-2.0 nm y parecen estar formadas por dominios que se encuentra relativamente cercanos entre sí, formando líneas continuas a la resolución del MFA. Esto se debe probablemente a un arreglo de las hélices  $\alpha$  desprendidas de la superficie de la subfase con una altura coherente, indicando que la inclinación de las hélices  $\alpha$  no está ordenada a lo largo de toda su longitud. La distancia promedio entre centro-centro de las líneas oscuras es de  $41.1 \pm 2.8$  Å, valor que corresponde con la longitud del segmento de hélice  $\alpha$  7-30 de la apo CI. Estas líneas oscuras no corresponden a la mica, por lo tanto en un perfil vertical de la imagen se observan arreglos perpendiculares al eje de las líneas negras y estructuras no planas donde muestran dominios pequeños con un grosor cercano al diámetro de una hélice  $\alpha$ . Si bien estas medidas presentan un poco de ruido, es muy claro que la distancia promedio entre los dominios pequeños es de  $11.7 \pm 2.6$  Å.

### Discusión

El mecanismo de intercambio de las apos intercambiables entre partículas lipoproteicas sigue siendo una pregunta a discusión. Sin embargo, con fundamento en el trabajo realizado en nuestro laboratorio durante los últimos años, consideramos que estos mecanismos se fundamentan en las propiedades de las hélices  $\alpha$  anfipáticas contenidas en las apos, en el número de copias de apos presentes en la superficie de las lipoproteínas, así como en los cambios de tensión superficial debido al tamaño y/o forma de las lipoproteínas. Las partículas HDL sintetizadas por hepatocitos y enterocitos como partículas en forma de discos, contienen una cantidad mínima de colesterol libre, no presentan ésteres de colesterol y son ricas en apos.

Durante los últimos años en el laboratorio del Dr. Mas-Oliva se ha estudiado de manera intensiva la estructura de las apos, con el propósito de definir las características clave que permitan explicar fenómenos básicos, tales como el reconocimiento a receptores y la actividad de transferencia de lípidos llevada a cabo por las apos intercambiables. Estos estudios han consistido en definir cambios de conformación de las apos en interfases aire/agua y lípido/agua; con la finalidad de obtener una idea aproximada de los cambios estructurales que pudieran explicar este fenómeno. Esto se ha logrado empleando monocapas de Langmuir, las cuales han sido estudiadas mediante MAB, AFM, incidencia de rayos de X rasantes [5, 6, 27, 33].

De acuerdo con nuestros resultados, las apos AI, AII, CI y CIII, independientemente de sus diferencias de tamaño y contenido de hélice  $\alpha$  anfipática en cada una de ellas, cuando se colocan en una interfase aire/agua y se comprimen lateralmente muestran cambios estructurales importantes detectadas en un intervalo amplio de presiones laterales de entre  $3-35$  mN/m y cambios de área de  $100-2500$  Å<sup>2</sup>/molécula [5, 6]. Al considerar las diferencias estructurales entre las diferentes apos así como el tamaño y el número de regiones hélice  $\alpha$  anfipática en relación con su estado monomérico o dimérico, resulta interesante observar como las diferentes regiones helicoidales de las apos intercambiables se disponen en el plano de la interfase aire/agua. Sin embargo, durante la compresión lateral de la monocapa se observa una considerable pérdida de área en las isothermas típicas y cambios de contraste en las imágenes de MAB, sugiriendo el desprendimiento de un segmento de hélice  $\alpha$  de la interfase para orientarse hacia el aire. Datos recientes revelan una interesante propiedad de las monocapas de Langmuir binarias de DPPC/apos en la interfase aire/agua, mostrando diferentes transiciones de fase [33].

Pensamos que los cambios conformacionales observados en las monocapas de las apos CI y AII durante la compresión lateral, pudieran guardar una relación directa con los cambios de tensión superficial de estas proteínas en la superficie de las lipoproteínas. De esta forma, en respuesta a cambios de tensión superficial de la partícula lipoproteica, las apos podrían presentar cambios de estructura. Resulta interesante como nuestra hipótesis de trabajo es de relevancia cuando se extrapolan los cambios conformacionales observados en interfaces aire/agua y lípido/agua a la superficie de una partícula lipoproteica [33, 34]. En este caso, debido al pequeño tamaño y a la rica composición en proteínas de las HDL discoidales (pre  $\beta$ -2HDL), se propone que la presión lateral en las monocapas de fosfolípidos de estas partículas que interaccionan con las diferentes apos (AI, AII, CI y E3) y otras proteínas (LCAT, CETP, PLTP), muy probablemente sea alta y sólo disminuye en paralelo a los cambios en tamaño y forma de estas lipoproteínas cuando comienzan a acumular ésteres de colesterol para formar HDL esféricas ( $\alpha$ -HDL). Los resultados obtenidos del estudio de las apos en las interfases aire/agua y lípido/agua permiten postular que la presión lateral de la monocapa de fosfolípidos asociada a proteínas en la superficie de las diferentes partículas de HDL, podrían ser muy diferentes dependiendo de su tamaño y forma [33, 34]. El hecho de que estas apos pudieran presentar una diferente conformación en las lipoproteínas recién sintetizadas con formas discoidales a cuando se encuentran en un estado maduro con forma esférica podría ser un dato importante en el entendimiento de sus propiedades fisiológicas como lo son direccionalidad y reconocimiento a receptores.

Con base en los resultados obtenidos que sustentan nuestra hipótesis de trabajo, consideramos que esta primera etapa de nuestra propuesta de investigación ha sido exitosa.

Los péptidos modelo sintetizados *in vitro* y diseñados con la finalidad de “congelar” a estas moléculas en las dos estructuras claves de nuestra propuesta, serán seleccionados con base a su estabilidad para su posterior utilización en la preparación de lipoproteínas artificiales. Sin duda, esta estrategia será de gran importancia en la comprobación de nuestra hipótesis de trabajo al momento de estudiar las características de estos péptidos modelo colocados en la superficie de lipoproteínas artificiales, en el reconocimiento a receptores así como en su capacidad de transferencia de lípidos.

## Referencias

1. Chou PY y Fasman GD (1974). Prediction of Protein Conformation. *Biochem.* 13:222-245.
2. Garnier J, Osguthorpe DJ y Robson B (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *JMB.* 120:97-120.
3. Rost B, Sander C y Scheider R (1993). Phd - an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Comput. Appl. Biosci.* 10:53-60.
4. Rost B y Sander C (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins.* 19: 55-72.
5. Bolaños-García VM, Mas-Oliva J, Ramos S y Castillo R (1999). Phase Transitions in Monolayers of Human Apolipoprotein C-I. *J Phys Chem B.* 103: 6236-6242.
6. Bolaños-García VM, Xicohtencatl-Cortes J, Ramos S, Castillo R y Mas-Oliva J (2001). Monolayers of Exchangeable Apolipoproteins at the Air/Water Interface. *J Phys Chem B.* 105: 5757-5765.
7. Eisenberg D, Weiss RM., and Terwilliger TC (1982). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature.* 23: 371-374.
8. Eisenberg S (1984). High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 25:1017-1058.
9. Segrest JP., Jones MK., De Loof H., Brouillette CG., Venkatachalapathi YV y Anantharamaiah GM (1992). The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33: 141-166.

10. Bolaños-García VM, Soriano-García M y Mas-Oliva J (1997). CETP and exchangeable apoproteins: common features in lipid binding activity. *Mol Cell Biochem.* 175:1-10.
11. Knobler CM (1990). En: advances in Chemical Physics, LXXVII. (I Prigogine y SA Rice Eds). New York. Interscience. 77: 397-449.
12. Höning D y Möbius D (1991). Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *Phys Chem.* 95: 4590-4592.
13. Henon S y Meunier J (1991). Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Review of Scientific Instruments.* 62: 936-939.
14. Arakawa H, Umemura K y Ikai A (1992). Protein images obtained by STM, AFM and TEM. *Nature.* 358: 171-173.
15. Engel A y Muller DJ (2000). Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol.* 7: 715-718.
16. Tanaka H, Hayashi K, Akatsuka T, Toyama J, Noda K, Kida T, Ogoma Y, Fujii T y Kondo Y (1995). Morphology of a cytochrome c-adsorbed stearic acid monolayer on Brewster angle microscopy. *J Biochem.* 117:1151-1155.
17. Tanaka H, Akatsuka T, Murakami T, Ogoma Y, Abe K y Kondo Y (1997). In situ observation of bovine serum albumin-adsorbed stearic acid monolayer by Brewster angle microscopy. *J Biochem.* 121: 206-211.
18. Tanaka H, Akatsuka T, Ohe T, Ogoma Y, Abe K y Kondo Y (1998). In situ observation of protein-adsorbed stearic acid monolayer by Brewster angle microscopy and fluorescence microscopy. *Polym Adv Technol.* 9: 150-154.
19. Dziri L, Boussaad S, Wang S y Leblanc RM (1997). Surface Topography of Acetylcholinesterase in Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *J Phys Chem B.* 101: 6741-6748.
20. Frey W, Schief WR Jr y Vogel V (1996). Two-Dimensional Crystallization of Streptavidin Studied by Quantitative Brewster Angle Microscopy. *Langmuir.* 12:1312-1320.
21. Lipp MM, Lee KY, Waring A y Zasadzinski JA (1997). Fluorescence, polarized fluorescence, and Brewster angle microscopy of palmitic acid and lung surfactant protein B monolayers. *Biophys J.* 72: 2783-2804.
22. Chen X, Moser CC, Pilloud DL y Dutton PL (1998). Molecular Orientation of Langmuir-Blodgett Films of Designed Heme Protein and Lipoprotein Maquettes. *J Phys Chem B.* 102: 6425-6432.
23. Schonfeld G, Patsch W, Rudel LL, Nelson C, Epstein M y Olson RE (1982). Effects of dietary cholesterol and fatty acids on plasma lipoproteins. *J Clin Invest.* 69: 1072-1080.
24. Hussain MM y Zannis VI (1990). Intracellular modification of human apolipoprotein All (apoAll) and sites of apoAll mRNA synthesis: comparison of apoAll with apoCII and apoCIII isoproteins. *Biochemistry.* 9: 209-217.
25. Lopez J, Latta M, Collet X, Vanloo B, Jung G, Deneffe P, Rosseneu M y Chambaz J (1994). Purification and characterization of recombinant human apolipoprotein A-II expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 225: 1141-1150.
26. Gursky O y Atkinson D (1996). High and low temperature unfolding of human high-density apolipoprotein A-2. *Protein Sci.* 5: 1874-1882.
27. Ruiz-Garcia J, Moreno A, Brezesinski G, Mohwald H, Mas-Oliva J y Castillo R (2003). Phase Transitions and Conformational Changes in Monolayers of Human Apolipoproteins CI and All. *J Phys Chem B.* 107: 11117-11124.
28. Rozek A, Buchko GW, Kanda P y Cushley RJ (1997). Conformational studies of the N-terminal lipid-associating domain of human apolipoprotein C-I by CD and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy *Protein Sc.* 6: 1858-1868.
29. Rozek A, Sparrow JT, Weisgraber KH y Cushley RJ (1998). Sequence-specific <sup>1</sup>H NMR resonance assignments and secondary structure of human apolipoprotein C-I in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Biochem. Cell Biol.* 76: 267-275.
30. Swaney JB y Weisgraber KH (1994). Effect of apolipoprotein C-I peptides on the apolipoprotein E content and receptor-binding properties of beta-migrating very low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 35: 134-142.
31. Gursky O y Atkinson D (1998). Thermodynamic analysis of human plasma apolipoprotein C-1: high-temperature unfolding and low-temperature oligomer dissociation. *Biochemistry.* 3: 1283-1291.
32. Gursky O, Ranjana y Gantz DL (2002). Complex of human apolipoprotein C-1 with phospholipid: thermodynamic or kinetic stability? *Biochemistry.* 41: 7373-7384.
33. Xicohtencatl-Cortes J, Mas-Oliva J y Castillo R (2004). Phase transitions of phospholipid monolayers penetrated by apolipoproteins. *J Phys Chem B.* 108: 7307-7315.
34. Xicohtencatl-Cortes J, Castillo R y Mas-Oliva J (2004). In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 324: 467-470.

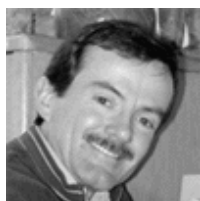
## APOLIPOPROTEÍNAS HUMANAS EN LA INTERFASE AIRE/AGUA

### Resumen

Estudiar a las apolipoproteínas (apos) intercambiables (CI, AII, CIII, E3 y AI) en sistemas de monocapas de Langmuir ha resultado ser de importancia en el entendimiento de la relación entre la estructura y la función de estas proteínas anfipáticas. El análisis de predicción y experimentos de dicroísmo circular con estas apos, muestran altos contenidos de estructura hélice  $\alpha$  anfipática. En presencia de una fuerza iónica elevada conservan su carácter anfipático y mantienen el contenido de estructura secundaria hélice  $\alpha$  el cual favorece para que puedan orientarse sobre una interfase aire/agua de una subfase concentrada de KCl para formar monocapas de Langmuir. En una interfase lípido/agua, las apos difunden y penetran la monocapa del 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DPPC) para formar monocapas de Langmuir binarias. Durante la compresión lateral de estas monocapas se observan cambios de organización conocidas como transiciones de fase, las cuales se pueden observar directamente con microscopía de ángulo de Brewster y microscopía de fuerza atómica. Las monocapas de Langmuir formadas con las apos (CI y AII) en una subfase altamente iónica y en presencia de fosfolípidos muestran cambios estructurales a altas presiones laterales. Estos cambios de conformación pudieran guardar una relación importante con cambios de tensión superficial de partículas lipoproteínas de alta densidad (HDL) al madurar de una forma discoidal a una forma esférica. Más aún, estas diferencias en tensión superficial de las HDL en relación directa con los diferentes estados estructurales de las apos, a su vez también pudieran estar involucradas en el mecanismo de reconocimiento y transferencia de lípidos así como de reconocimiento de estas partículas a sus receptores en la membrana celular.

**Palabras clave:** Apolipoproteína, monocapas de Langmuir, hélice  $\alpha$ , lipoproteínas.

### Semblanza del Dr. Jaime Mas Oliva.



Es Médico Cirujano por la Facultad de Medicina, UNAM (1976); obtuvo su Doctorado en Bioquímica, en National Heart and Lung Institute, Imperial College for Science, Medicine and Technology, Universidad de Londres, Inglaterra (1980). Se ha hecho acreedor a varios premios y distinciones entre las que destacan: El Premio Nacional de Ciencias "Puebla" (1986). El Premio de la Academia Mexicana de Ciencias (1988). La Beca John Simon Guggenheim (1987). El Premio Manuel Noriega Morales, Organización de los Estados Americanos (1993). El Premio "Aida Weiss (1993), El Premio CANIFARMA, Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (1994 y 1999). El Premio "Dr. Jesús Kumate Rodríguez (2000). El Premio Silanes-INMEGEN (2002). Es nivel III en el Sistema Nacional de Investigadores. Actualmente trabaja como Investigador Titular "C" en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular y es Coordinador del Programa Universitario de Investigación en Salud de la UNAM. Su línea de Investigación abarca las Membranas Biológicas, la Estructura y la Función de Proteínas que unen lípidos así como los Sistemas de Transporte de calcio en células normales y neoplásicas. Ha dirigido 24 tesis (11 de licenciatura, 6 de maestría y 10 de doctorado). Cuenta con 90 trabajos publicados y más de 900 citas.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## **EL PLACER DE INVESTIGAR**

### **Entender causa placer, un incentivo para la investigación y la didáctica**

Héctor G. Riveros  
Instituto de Física  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 20-364, Ciudad Universitaria, México, D.F., 01000, México  
[riveros@fisica.unam.mx](mailto:riveros@fisica.unam.mx)

#### **THE PLEASURE OF RESEARCH**

**Understanding as a source of pleasure, an incentive to the research and teaching**

#### **Abstract**

*In scientific research we want to find answers to questions about the nature, generating even more questions. When we understand something, we felt pleasure, and that is the motivation which has brings us to our actual knowledge. The arts have three common characteristics. the pleasure experienced by the artist while he produces a work of art, the pleasure felt by the audience who observes such a work, and the need for aptitude or inspiration. In a similar way, when we understand something, we also experience a kind of pleasure, and such a pleasure can be transmitted, and it need inspiration. Therefore, we could say that thinking is an art.*

*With demonstrations, experiments and question we will show that understanding is pleasurable. That pleasure motivates the researcher, as an artist. When we research a topic interesting to us, we have better ideas just because we think about it without effort. There are two profound consequences if scientific work is an art: in its teaching, because teaching an art is quite different as forming craftsman. In the profession, to practice an art is agreeable. When choosing a profession it is very important that we like its practice, we will found an increased efficiency.*

**Keywords:** Vocation; research; art; science; reasoning; data interpretation; demonstration.

## Introducción

Investigar es buscar la respuesta a las preguntas que nos hacemos sobre los temas que nos interesan. Investigación científica implica que las preguntas son acerca de la naturaleza que nos rodea, lo que llamamos fenómenos naturales. Estudiamos las relaciones entre objetos, aunque no sepamos con precisión su naturaleza. Sabemos como se atraen dos cargas eléctricas aunque no sepamos exactamente como están constituidas. Nuestro concepto inicial de átomo como elemento fundamental, evolucionó a protones, neutrones y electrones como partículas básicas de la materia, aunque ahora sabemos que son los quarks los fundamentales, pero seguimos sin saber que es la materia, sabemos como se comporta y podemos predecir que va a pasar en ciertas situaciones, pero escondemos nuestra ignorancia básica en el invento de nuevas palabras. La Filosofía es la que busca el por qué de las cosas, las ciencias naturales se ocupan solamente de las relaciones entre conceptos o variables, que observamos en nuestro entorno. Podemos decir que la Ciencia se basa en la duda como la Religión se basa en la fe, lo que en el pasado causo problemas de interpretación.

Los científicos son seres humanos y pueden tener todas las virtudes y defectos característicos de la humanidad, se puede decir que todos queremos obtener el éxito en la vida. Lo que cambia es como definimos la palabra éxito. Para algunos puede consistir en obtener un Premio Nobel, llegar a puestos académicos importantes, amasar una fortuna o alguna otra meta personal. Se ha demostrado que 2/3 de los premios Nobel se adjudican a discípulos de premiados anteriores y sólo 1/3 a investigaciones sobre campos nuevos; así, coexisten la política y la "grilla" académica local, universitaria y/o nacional, unas pocas fortunas se han hecho a partir de investigaciones científicas, hay plagio y falsificación de datos experimentales, así como hay notables ejemplos de caballeridad y honradez. Hay quien se contenta con disfrutar cada día, con el placer que se obtiene al obtener resultados satisfactorios en sus investigaciones.

Generalmente se piensa que el trabajo científico es un trabajo muy difícil, y reservado a mentes excepcionales. La manera como se enseña la Física, la Química y las Matemáticas contribuye a que los niños las aborrezcan. Pero a lo largo de los siglos, las ciencias han sido cultivadas por el placer que proporcionan. Conviene entonces que recordemos que éste es el incentivo que a lo largo de los siglos nos ha llevado al estado actual del conocimiento. Espero demostrar que pensar es un arte, que el arte causa placer en el ejecutante y en el espectador; y que es la principal motivación del trabajo científico o el *arte de pensar*.

Las actividades artísticas reconocidas incluyen a: la música, la pintura, la poesía, la danza, el teatro, la literatura, el cine, la escultura, etc. ¿Cómo podemos reconocer las actividades artísticas de las que no lo son? Podemos acudir a un diccionario, pero no es fácil encontrar definiciones satisfactorias. El Diccionario de la Lengua Española<sup>1</sup> define arte como: "Virtud, disposición y habilidad para hacer alguna cosa. // Acto o facultad mediante los cuales, valiéndose de la materia, la imaginación o del sonido, imita o expresa el hombre lo material o lo inmaterial, y crea copiando o fantaseando". La Enciclopedia Británica<sup>2</sup> (1995) por su parte dice: "El uso de habilidades e imaginación en la creación de objetos estéticos, en el entorno que pueden ser

---

<sup>1</sup> Real Academia Española (1992). Diccionario de la Lengua Española. Vigésima primera edición. Espasa Calpe. Madrid.

<sup>2</sup> Enciclopedia Británica (1995). Enciclopedia Británica Inc.

compartidos con otros". Estas definiciones son un tanto vagas para nuestros fines. Los científicos definimos acudiendo a buscar características comunes y diferenciadoras.

Operacionalmente las actividades artísticas son muy diferentes pero tienen tres características en común: el placer que siente el artista al trabajar en su arte, el placer que siente el auditorio que observa el resultado de su trabajo y la inspiración presente en los artistas. El pensar tiene también estas propiedades: el pensar causa placer en quien lo realiza, por eso jugamos ajedrez, hacemos crucigramas o hacemos trabajo científico; es transmisible, un estudiante siente placer cuando entiende algo, le brillan los ojos, etc.; y diferentes personas interpretan o se inspiran, obteniendo diferentes resultados de los mismos datos experimentales. La inspiración asociada a los grandes descubrimientos científicos es similar a las grandes obras de arte. Por tanto, pensar es un arte.

Recientemente la revista *Nature* publica tres artículos referentes al tema del arte y la ciencia:

- **A tale of two loves (1)**  
The arts and sciences provide complementary ways of looking at the world,
- **From science in art to the art of science (2)**  
Shared intuitions about the natural world drive the pursuits of artists and scientists
- **Experimental physics, experimental art (3)**  
What happens when artists and particle physicists are brought together to exchange ideas?

El entender el por qué y cómo se pueden utilizar nuestros conocimientos, es placentero. Este es un aspecto artístico de las actividades intelectuales, que conviene tomar en cuenta en el momento de escoger una profesión. El trabajar en un tema de interés personal, convierte en un placer la obtención de resultados, y por lo tanto, mejora nuestra eficiencia. Además de contribuir grandemente a la tranquilidad espiritual necesaria, para que nos llegue lo que llamamos inspiración. Si el trabajo científico es un arte tiene dos consecuencias profundas: en su enseñanza, porque enseñar un arte es muy diferente de formar artesanos, y en la profesión, porque ejercer un arte debe ser placentero. Al escoger una profesión es muy importante que nos guste su ejercicio, para que podamos trabajar muchos años, si es que al placer se le puede llamar trabajo.

Al acabar los estudios de licenciatura, mientras se realiza la tesis profesional llega el momento de la gran decisión, de grandes consecuencias: me pongo a trabajar o prosigo estudios superiores, o una combinación de ambas. Esta decisión que parece única en realidad está compuesta de muchas preguntas ¿Qué me gusta más?: ejercer la Medicina o investigarla, lo básico o lo aplicado, la docencia o la investigación. Pero no hay investigación sin docencia y no debería haber docencia sin investigación. Hay que considerar también si hay quien trabaje en los temas que me interesan. ¿Existen becas, empleos o tengo que irme al extranjero? En resumen ¿Qué voy a hacer el resto de mi vida?

Como médicos podemos trabajar en la iniciativa privada o en organismos gubernamentales, estos últimos pueden ser organismos descentralizados o instituciones de investigación y/o enseñanza. Generalmente se separan las actividades en investigación y en

docencia; pero en realidad, ambas son dos caras de una misma moneda. El trabajo del investigador necesita transmitirse de la manera más clara posible, lo que es un aspecto fundamental en la docencia; y el profesor necesita encontrar los mejores métodos para que el estudiante aprenda así cómo también evaluar el aprendizaje, lo que esencialmente es investigar. Investigar es preguntarnos el cómo pasan las cosas para poder mejorar los procesos involucrados, hacer hipótesis tentativas, proponer y resolver los modelos correspondientes, predecir resultados que permitan escoger el equipo experimental requerido para verificar los modelos calculados, realizar experimentos e interpretarlos, etc. Bajo este punto de vista, todo lo que hacemos podemos llamarlo investigación.

En sus inicios todas las Ciencias comenzaron como pasatiempos agradables, aunque actualmente hay quienes consideran que el trabajar en alguna ciencia es difícil, pero en realidad es un placer para quien tiene vocación para realizarlo. Es este aspecto el que conviene difundir para que se entienda que la ciencia es arte, ya sea en sus formas básicas o aplicadas, y ambos aspectos forman parte de la cultura del hombre moderno. Esto es particularmente importante para la formación de los niños y jóvenes que tratan de encontrar su vocación. Pero debemos tomar en cuenta que lo que un adulto entiende por entender es diferente de lo que piensa un niño, por ejemplo, cuando un adulto observa una hélice girando en el extremo de un palito explica el giro en término de vibraciones y fases en las ondas; cuando un niño observa el mismo fenómeno y pregunta el por qué, lo que en realidad quiere entender es qué tengo que hacer para que la hélice también gire conmigo.

Las demostraciones, experimentos o preguntas se pueden usar para demostrar que el entender el por qué de las cosas es placentero. Y que este placer es el motivador del investigador, como un artista, obtiene placer de su arte. Cuando se investiga en los temas que nos interesan, tenemos mejores ideas simplemente por que todo el tiempo estamos pensando en el tema sin esfuerzo de nuestra parte. Podemos comentar algunas demostraciones que pueden servir para crear un ambiente en que los espectadores puedan entender lo que está pasando. Si entienden solos el funcionamiento del dispositivo, sentirán el placer de pensar de primera mano; o al menos, al entender la explicación correspondiente.

### **Demostraciones:**

Sonido en tubo girando.-

- Se produce sonido al hacer girar un tubo corrugado
- El tono se hace más agudo al aumentar la velocidad de giro
- El cambio de tono no es gradual, es a saltos
- ¿El sonido se produce adentro o afuera del tubo?

Pulso de aire.-

- Lata cilíndrica con membrana elástica en un extremo y agujero circular pequeño en el otro extremo
- Golpeando la membrana se produce un pulso de aire capaz de apagar una vela
- Llenando con humo al recipiente, se observa que el pulso mantiene su forma de dona y que va perdiendo velocidad por fricción con el aire.
- ¿Que viaja más rápido, el pulso o el sonido?



#### Fantasma en cuerda.-

- Al girar una cuerda en el aire y usando un proyector adecuado, puede aparecer la imagen de una muchacha como si hubiera una pantalla en donde gira la cuerda
- ¿Cómo se logra esto?

#### ¿Control Mental?-

- Palito con muescas y una hélice en un extremo.
- La hélice gira cuando se golpea las muescas con el ritmo adecuado
- Se dice que se controla el sentido de giro de la hélice mediante las ondas emitidas por la mente
- ¿Por qué gira la hélice?

#### Gatito con pelota.-

Al acercar el gatito a la pelota, ésta se aleja girando. Dentro del gatito y la pelota deben estar unos imanes que produzcan las fuerzas y torcas necesarias. Pero ¿Cómo están colocados los imanes dentro del gatito y la pelota?

#### Imán levitado.-

Para entender la demostración conviene recordar que tenemos imanes duros y blandos. Duros son los imanes permanentes que mantienen un campo magnético remanente al sacarlos del campo magnetizante, y blandos se usan como núcleo de los electroimanes en que casi desaparece el magnetismo al quitar la corriente eléctrica que los magnetiza

La demostración más conocida de levitar un imán es colocarlo sobre un material superconductor con cero resistividad eléctrica. Estos materiales repelen a los imanes.

- Paramagnetismo- Se presenta en materiales cuyas moléculas se comportan como imanes aun en la ausencia de campos magnéticos. En un campo magnético se orientan en la dirección del campo magnético externo
- Diamagnetismo- Moléculas sin magnetismo, el campo magnético inducido es en sentido contrario al campo magnético externo
- ¿Podemos levitar un imán, sin usar un superconductor?



**Figura 1.** Imán levitado entre dos placas de grafito.

Águila en vidrio o ¿cuarzo?

- Figura tridimensional hecha con puntos en medio de un bloque de vidrio o cuarzo
- El vendedor dice que es de cuarzo ¿Podemos distinguir el vidrio del cuarzo?
- ¿Cómo la hicieron?



**Figura 2.** Águila tridimensional en un bloque de vidrio o cuarzo

Romper periódico con regla de madera

- Se intenta romper un periódico con una regla de madera
- Con rapidez, la regla debe poder romper la hoja de periódico
- ¿Puede el periódico romper la regla?

Si al cabo de un cierto tiempo, el espectador no entiende lo que está pasando, conviene explicar la situación. Es muy molesto quedarse sin entender y de todos modos es placentero entender una explicación. Es mejor hacerlo después de cierto tiempo para incrementar la probabilidad de que llegue la inspiración al espectador para entender lo que pasa por él solo. Ahora mencionaremos las explicaciones pendientes:

Sonido en tubo girando.-

El sonido lo produce el flujo del aire en el interior del tubo corrugado. Para que el aire del interior gire con el tubo hace falta una fuerza centrípeta que no existe. Si tapamos con la mano, el sonido desaparece y se hace un vacío en el interior que proporciona la fuerza centrípeta necesaria para mover las moléculas remanentes. Quitando la mano, al girar el tubo, el aire es expulsado en el extremo girando y por lo tanto es aspirado por el centro, lo que provoca que choque con las corrugaciones internas produciendo rebotes a una frecuencia proporcional a la velocidad de flujo. El sonido se produce cuando entra en resonancia a las frecuencias de un tubo abierto por ambos extremos. La velocidad del flujo del aire en el interior aumenta con la velocidad de giro del tubo, lo que justifica el cambio en el tono. Un tubo corrugado se puede usar

como velocímetro en el auto, colocando un extremo paralelo al coche, el aire entra en el tubo a la velocidad del coche y se producen las diferentes resonancias conforme el coche pasa por las velocidades correspondientes.

#### Pulso de aire.-

Permite mostrar la diferencia entre velocidad del pulso y velocidad del sonido. El ruido que genera el pulso llega a todo el cuarto antes de apagar la vela. El sonido viaja más rápido. Al golpear la membrana elástica se produce una dona de aire, que se mueve sin mezclarse con el aire estático, como se demuestra al llenar de humo el recipiente. La onda de compresión que se produce al golpear la membrana viaja en su interior con un diámetro constante hasta llegar al orificio de salida, en donde se ve constreñida a fluir por el orificio. La mayor parte del material sale por el borde, la fricción con el orificio al salir, le produce un giro que hace estable a la dona. El humo no se mezcla con el aire, mientras se desplaza a través de él.

#### Fantasma en cuerda.-

Enfocando una transparencia de una muchacha a un metro del proyector, un hilo girando puede servir como pantalla. La persistencia de las imágenes en el ojo, hace que la figura se vea completa. La imagen puede observarse en ambos lados de la cuerda ya que dispersa la luz en ambas direcciones.

#### ¿Control Mental?

Hasta ahora no se ha demostrado que el cerebro emita ondas que permitan controlar algún proceso. La observación de que la hélice gira nos lleva a qué movimiento debe tener el clavo que la soporta para hacerla girar. ¡Debe tener un movimiento de oscilaciones en círculo! Un movimiento así, se logra con dos movimientos armónicos simples (oscilaciones) perpendiculares entre sí, digamos uno vertical y el otro horizontal. Si retrazamos 90 grados a uno de los movimientos logramos un movimiento circular en el clavo con un sentido de giro, retrazando el otro cambiamos el sentido de giro. La explicación usual usa este hecho como base para justificar el movimiento. Al golpear las muescas con el ritmo adecuado se logra la resonancia en las ondas que se propagan por la madera, con componentes verticales y horizontales. El objeto con que se golpea se agarra de manera que el dedo índice o el dedo pulgar puedan frotar el costado del palito con muescas. Dependiendo de cual dedo fricciona, se cambia el sentido de giro. Cuando en un oscilador armónico metemos un término de fricción reducimos la frecuencia natural de oscilación, y este cambio en frecuencia se puede ver, a corto plazo, como un cambio en la fase de dos ondas, lográndose el efecto de onda circularmente polarizada. Nótese que el término fase entre dos ondas, tiene sentido solamente para ondas de la misma frecuencia. ¡Seguimos sin probar que existen ondas mentales!

#### Gatito con pelota.-

Si colocamos el imán de la pelota en posición horizontal, en una superficie con poca fricción, la pelota se convierte en una brújula. Esto hace que al acercar otro imán acercándolo por el polo opuesto para que lo repela, la pelota gira convirtiendo la fuerza en atracción. Por lo tanto, el imán dentro de la pelota debe de estar vertical, digamos con el polo norte arriba. Si acercamos otro imán vertical con el polo norte arriba se produce una repulsión que empuja a la pelota en el plano

vertical, la pelota se inclina hasta que la torca<sup>3</sup> producida por el peso compensa la torca producida por los imanes. Para producir el giro necesitamos girar el imán que acercamos sacándolo de la vertical hacia la derecha o hacia la izquierda. En este caso, además de la repulsión se produce la torca que ocasiona el giro que aleja a la pelota girando en un sentido, con el imán desviado a la izquierda, o en sentido contrario con el imán desviado a la derecha.

Imán levitado.-

El imán que se levita es un imán cúbico de alta remanencia sostenido por un imán cerámico en forma de toroide colocado cerca de 25 mm arriba. Este imán tiene una tuerca que permite ajustar su posición con mucha precisión. La tuerca baja el imán toroide hasta que levanta el imán cúbico. Este equilibrio es sumamente inestable, lo normal es que el imán levantado se pegue en el que lo levanta. La estabilidad se logra mediante las placas de grafito diamagnético, cuando el imán se acerca a la placa superior induce el diamagnetismo en sentido opuesto al campo polarizante que lo regresa al centro. Si se acerca a la placa inferior sucede lo mismo lográndose un equilibrio estable. Se requiere que el grafito sea muy puro, que no tenga fierro que al magnetizarse cubra el débil efecto diamagnético

Águila en vidrio o ¿cuarzo?

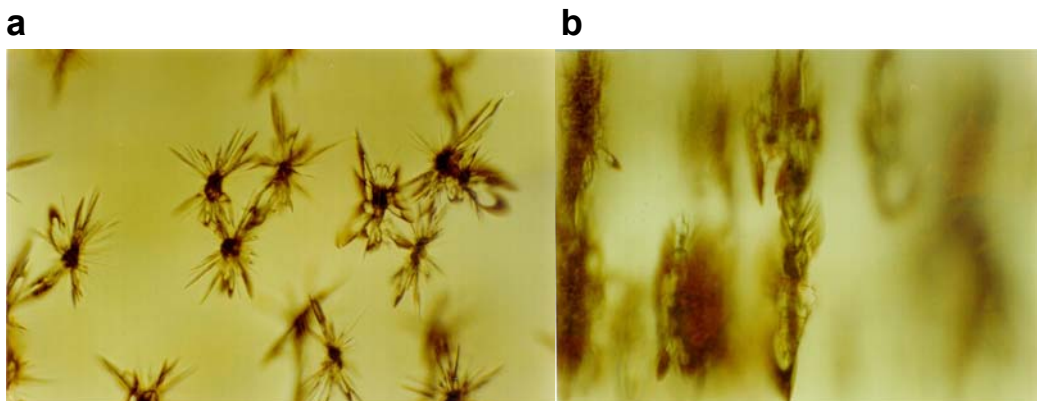
Podemos distinguir entre vidrio y cuarzo si conocemos el índice de refracción y la densidad de ambos. Sus valores son cercanos pero diferentes, por lo que midiendo con cuidado puede verificarse que son de vidrio. Viendo la figura con los ojos parece estar formada por burbujas, lo que sugiere que se formaron a través de un proceso local de muy alta temperatura. La ausencia de bordes indica que no fue hecha con molde por lo que debió de ser hecha calentando cada punto. Un láser de alta potencia enfocado al máximo permite altas densidades energéticas que permiten calentar localmente el vidrio. Observando con un microscopio óptico se nota que no son burbujas sino rupturas debidas a esfuerzos térmicos indicando una concentración a 10 micras del haz del láser (Figura 3). Otro tipo de fuente luminosa no puede enfocarse a un diámetro tan pequeño. Las rupturas están en el plano perpendicular al flujo de calor como puede notarse comparando con la fotografía microscópica tomada a 90 grados de la primera.

Romper periódico con regla de madera

Al intentar romper un periódico con una regla de madera, la regla arrastra el periódico sin romperlo. Con más rapidez en la regla se debe poder romper la hoja de periódico. Para darle más rapidez al movimiento de la regla podemos colocarla en el borde la mesa sobresaliendo 5 cm. y 25 cm sobre la mesa, este brazo de palanca quintuplica la velocidad. El periódico se coloca aplanándolo sobre la mesa. Al golpear el extremo de la regla esta se parte dejando el periódico intacto. Muchos libros dicen que se debe a que la presión atmosférica de casi un kilo por centímetro cuadrado (10 Newtons por centímetro cuadrado) sujeta a la regla contra la mesa, ya que si se levanta se haría un vacío entre el papel y la mesa. Esta es una explicación razonable, pero no necesariamente cierta.

---

<sup>3</sup> Recordemos que una torca (del latín *torquere*, torcer) se refiere al efecto de rotación de una fuerza aplicada a un cuerpo rígido; dicha tendencia a girar depende de la fuerza y del ángulo con que se aplica dicha fuerza con respecto al centro de giro y se mide como brazo de palanca por fuerza.



**Figura 3.** Vista microscópica de la figura del águila, a) vista de frente. b) vista de perfil

Si repetimos el experimento colocando los pedazos de la primera regla en ambos lados de la otra nueva, podemos separar el periódico de la mesa y al pegarle a la regla podría partir el periódico. Se observa que la regla vuelve a partirse, por lo que no es la presión atmosférica la que lo sujeta. Una hoja de papel periódico pesa cerca de 10 gramos, la regla pesa 22 gramos, por lo que su masa no es despreciable. Repitiendo el experimento con una masa de 10 gramos en plastilina sobre la regla se vuelve a partir la regla confirmando que es la inercia del periódico la que cuenta. La densidad del aire en ciudad de México es cercana a un gramo por litro, suponiendo que se mueven 500 centímetros cuadrados de área por 1 cm de espesor, la contribución en masa es de 0.5 gramos, despreciable comparada con las otras masas. De hecho, es posible romper la regla sin ninguna masa extra, ayudando a la mano con un martillo para obtener mayor velocidad en el golpe.

Las leyes de la Física son de aplicación universal por lo que su aplicación en los problemas cotidianos ayuda a entender sus implicaciones, por ejemplo la conservación de la energía es indispensable para entender el metabolismo en los seres vivos, medido a través de la energía consumida en las diversas actividades humanas.

- La ley de la conservación de la energía vale para todos los procesos, cuando incluimos a la masa como otro tipo de energía
- La energía en los alimentos se mide en calorímetros, en donde se determina el cambio en temperatura producido por la combustión del alimento estudiado. La energía disipada es la misma ya sea que la oxidación sea rápida en la llama o lenta en las células del cuerpo humano



**Figura 4.** Secuencia de fotografías mostrando el rompimiento de una regla, separadas 1/15 de segundo. Nótese la inercia del papel.

La Tabla 1 muestra algunos datos sobre el cambio en el metabolismo como función de la edad y el sexo; la Tabla 2 muestra el gasto de energía que una persona desarrolla al realizar diversas actividades y la Tabla 3, el consumo *per cápita* de diferentes bebidas alcohólicas en algunos países, así como la cantidad de calorías que aporta el etanol contenido en ellas.

**Tabla 1.** Requerimientos energéticos diarios de una persona como función de la edad y su sexo.

Edad (años)	Mujer (kcalorías/día)	Peso (kg)	Hombre (kcalorías/día)	Peso (kg)
11 a 14	2200	46	2700	45
15-18	2100	55	2800	66
19-22	2100	55	2900	70
23-50	2000	55	2700	70
51>	1800	55	2400	70
Basal	1300		1800	

Las cifras indicadas corresponden a las recomendadas por el Instituto Nacional de la Nutrición.

**Tabla 2.** Potencia y consumo de energía requerido por un individuo adulto en función del sexo y el tipo de actividad desarrollada.

Actividad	Mujer		Hombre	
	Consumo energético Kcal • kg <sup>-1</sup> • h <sup>-1</sup>	Potencia <sup>a</sup> (Watts)	Consumo energético Kcal • kg <sup>-1</sup> • h <sup>-1</sup>	Potencia <sup>b</sup> (Watts)
Basal	0.98	62.9	1.07	87.1
Escribir	1.3	83	1.5	122
Caminar	2.6	166	2.9	236
Marchar	4.1	262	4.3	349
Jugar Fútbol	8.1	517	8.4	683

Datos calculados con base en información proporcionada en Lehninger AL (1984). *Principios de Bioquímica*. Omega. Barcelona.

<sup>a</sup> Potencia desarrollada considerando un peso corporal de 55 kg.

<sup>b</sup> Potencia desarrollada considerando un peso corporal de 70 kg.

Considere que watts equivalen a joules/segundo

**Tabla 3.** Consumo anual per capita de etanol total (calculado como alcohol absoluto), vino, cerveza y bebidas destiladas en algunos países.

País	Consumo total de alcohol (litros de etanol absoluto)	Consumo de vino (litros)	Consumo de bebidas destiladas	Consumo de cerveza (litros)	Aporte calórico del etanol (Kcalorías)
Francia	13.0	75.1	5.75	56.2	72 800
España	12.7	54.0	7.5	64.5	71 100
Alemania	10.6	25.8	5.5	144.2	59 400
Italia	10.0	79.0	2.75	33.3	56 000
Argentina	8.9	58.1	3.25	40.0	49 800
EE UU	7.6	9.1	6.0	90.1	42 600

Las cifras de consumo de bebidas alcohólicas y etanol son tomadas de Pyörälä [Br. J. Addict. (1990) 85: 469-477], de acuerdo a estimaciones realizadas en 1987.

Con estos datos podemos calcular que el consumo promedio diario en etanol oscila entre 116 y 200 Kcalorías, que constituyen entre el 6% y 10% del consumo energético diario. Para una alimentación sana se requiere que sea balanceada, incluyendo carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas. El subir o bajar de peso depende de si se consume más o menos calorías de las que se queman durante las actividades diarias. Si queremos controlar el peso mediante el ejercicio conviene tomar en cuenta, que en una hora caminando una mujer de 55 kg disipa 143 kcal (2.6x55) y un hombre de 70 kg disipa 203 kcal (2.9x70). Dado que una tortilla contiene 70 kcal, el consumir una tortilla extra requiere que la mujer camine 30 minutos (el hombre 20 minutos) para disiparlas. Generalmente el efecto del ejercicio es producir más hambre, por lo que se puede inclusive ¡subir de peso!

Instrumentación para el diagnóstico y la curación de los enfermos.

Para obtener la máxima información de los instrumentos es necesario tener nociones de los principios físicos de su funcionamiento, que nos permitan interpretar adecuadamente los resultados observados. En los últimos años la instrumentación médica se ha desarrollado con mucha rapidez, lo que indica que no importa demasiado qué instrumento usemos como ejemplo de instrumentación, lo que importa son los métodos de razonamiento asociados a su uso e interpretación, razonamiento que será necesario para un uso eficiente de los instrumentos del futuro.

La cirugía a corazón abierto solo fue posible hasta que se encontró la manera de mantener la sangre fluyendo, agregándole oxígeno y eliminando el dióxido de carbono, sustituyendo el conjunto del corazón y los pulmones simultáneamente. Esto debe lograrse sin alterar a la sangre, que es sensible al daño por esfuerzos cortantes que se producen si se le agita demasiado, que tiene que regresar al cuerpo humano a la temperatura corporal compensado el calor perdido, y se requiere un volumen pequeño de sangre extra para reducir la necesidad de sangre de donadores.

En la Figura 5 se muestra un diseño que consiste en un conjunto de discos que giran a baja velocidad semi-sumergidos en sangre, la que se pega al disco en una película delgada, que se expone a un flujo de oxígeno para el intercambio gaseoso. Además, se requiere la bomba que mueve la sangre y los calentadores para mantener la temperatura de la sangre en movimiento.

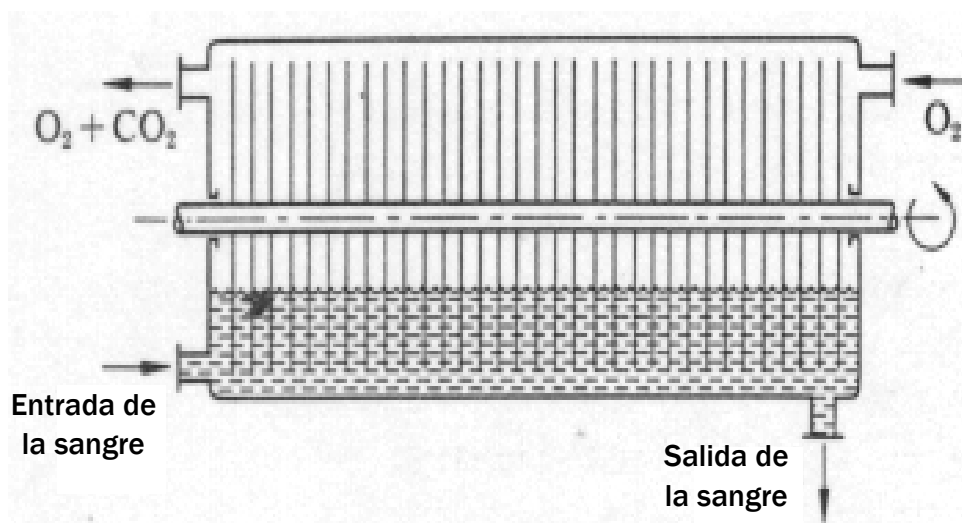


Figura 5. Oxigenador de sangre de disco rotatorio. Esquema tomado de (4).

Las demostraciones también pueden usarse para fomentar la discusión e incentivar el razonamiento colectivo. Una demostración muy efectiva es dejar caer juntas, una pelota de ping-pong sobre una de hule duro. Sorprende a los espectadores que la pelota de ping-pong suba hasta 5-6 veces la altura de la caída. Para la colisión entre una pelota ligera y una pesada en reposo, se observa que la pelota ligera invierte su velocidad. Si el choque fuera completamente elástico, la magnitud de la velocidad sería la misma. ¡Una pelota rebotando en la Tierra elásticamente mantendría la misma altura! Si choca una pelota pesada con una ligera en reposo, esta sale con el doble de velocidad; lo que podemos justificar cambiando el sistema de



---

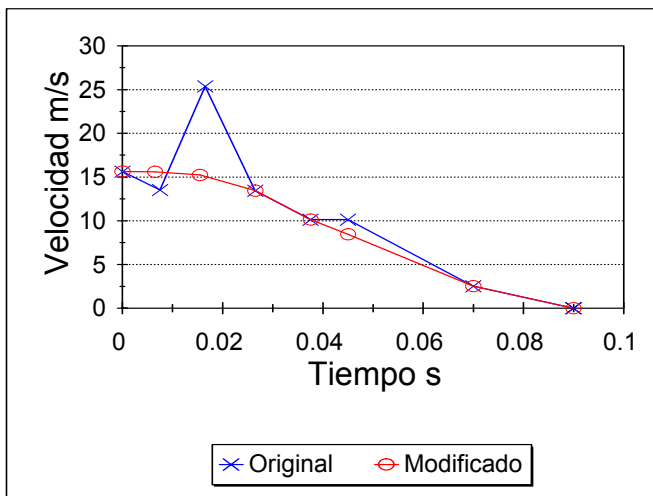
referencia a la pelota pesada. En el caso de que las dos lleven la misma velocidad pero direcciones opuestas, se puede calcular que la velocidad de la pelota ligera es tres veces mayor. Esto es, rebota con nueve veces la energía cinética original, o que si el choque fuera elástico rebotaría hasta 9 veces la altura original. El que no suba tanto nos indica que el choque no es completamente elástico. Este es el momento para comentar los peligros de chocar con el gordito del grupo en el patio de la escuela, o con un camión pesado en la carretera. El objeto liviano rebota con dos veces la velocidad si está en reposo, o tres veces si los dos llevan la misma velocidad.

### Interpretación de datos – errores y equivocaciones

Las revistas son una fuente de datos interesantes para fomentar el razonamiento en la vida diaria. Analizando datos publicados en la revista *Popular Science* (5) referentes a la colisión de un vehículo mediano con un poste, se entienden las ventajas del cinturón de seguridad. Aunque la velocidad es relativamente pequeña ( $54 \text{ km/h} = 15 \text{ m/s}$ ), se pierde en un tiempo cercano a una décima de segundo incrustándose el poste cerca de  $75 \text{ cm}$ ; la aceleración promedio durante el choque llega a  $150 \text{ m/s}^2 = 15$  veces la aceleración de la gravedad. Esto es, si el coche pesa una tonelada, el poste lo detuvo con una fuerza de 15 toneladas. Antes de ver estos números, siempre había pensado que en caso de una colisión poniendo las manos sobre el tablero podía detener el cuerpo; pero es claro que no tengo fuerza suficiente para cargar 15 veces mi propio peso. Si lo intento, los brazos pueden desprenderse de los hombros, y torso y cabeza se incrustan en el parabrisas, en un tiempo cercano a una décima de segundo. ¡Es una muerte rápida!

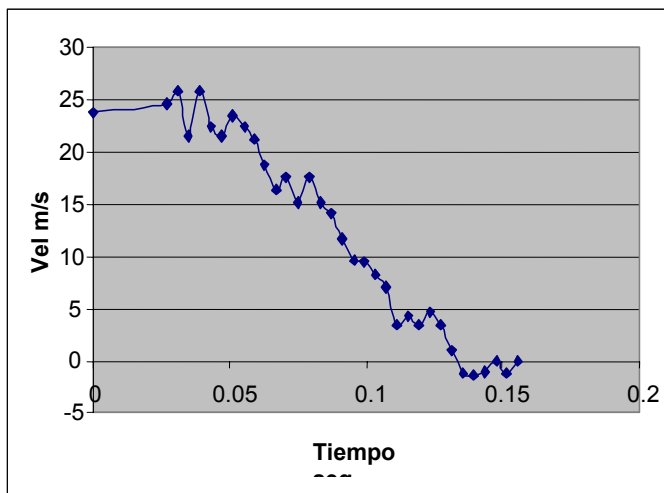
Con el cinturón de seguridad se incrementa la duración de la colisión, reduciendo a 10 veces la aceleración de la gravedad la fuerza necesaria. Esto incrementa notablemente las posibilidades de sobrevivir el choque. Con un peso de  $80 \text{ kg}$ , el cinturón de seguridad aplica cerca de  $800 \text{ kg}$  provocando moretones y costillas rotas. En este sentido, la bolsa de aire causa menos daño ya que distribuye la fuerza en un área mayor, pero tiene que aplicar la misma fuerza que el cinturón de seguridad, por lo que puede causar la muerte de un niño pequeño.

Dado que los datos analizados en el ejemplo anterior incluyen el tiempo y la deformación producida, se puede calcular la velocidad media entre tiempos consecutivos (Figura 6), encontrándose que la velocidad se incrementa casi al doble para el tercer dato lo que nos indica que la deformación o el tiempo correspondiente están equivocados. Puesto que la velocidad solamente puede disminuir, es posible estimar los valores correspondientes para encontrar una curva suave. Esto nos recuerda la conveniencia de analizar todos los datos experimentales para encontrar las equivocaciones. Dado que la palabra error se usa para estimar la incertidumbre en una medida, se usa equivocación para indicar un dato defectuoso. La figura 6 muestra no sólo la gráfica de velocidad media de los datos originales, sino también la corrección estimada.



**Figura 6.** Velocidad de un automóvil durante la colisión con un obstáculo. Los datos mostrados corresponden a: (x) los valores calculados a partir de los datos originales publicados en (5), y (o) los valores estimados al generar una curva suave. El tiempo cero corresponde al instante de la colisión.

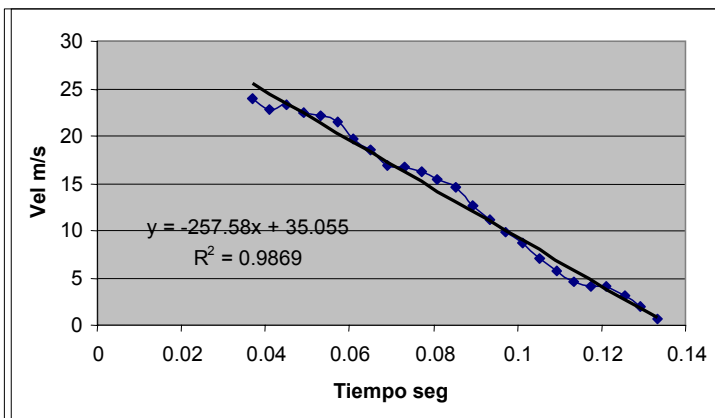
En otra serie de datos, un grupo de estudiantes registró la posición contra tiempo de un automóvil impactándose a 86 km/h contra un poste (6), obteniendo una gráfica con curvas suaves, sin ninguna irregularidad. Sin embargo la curva de velocidad promedio (Figura 7) muestra cambios bruscos de velocidad que no corresponden a aceleraciones reales, sino que son producidas por las estimaciones realizadas al medir la posición de la defensa trasera en la pantalla de la computadora en la que se realizan las medidas.



**Figura7.** Velocidad media de un automóvil al impactarse contra un poste a 86 km/h. La velocidad se calculó dividiendo deformaciones consecutivas entre el intervalo de tiempo. Las variaciones de corto plazo se deben a la incertidumbre en las posiciones medidas. Datos experimentales tomados de Bell y cols., (6).

El efecto de las variaciones debidas a la incertidumbre se reduce si se hace un promedio móvil sobre cuatro puntos. La Figura 8 muestra el efecto sobre la curva de velocidad promedio. Se pierden los primeros y los últimos tres puntos.

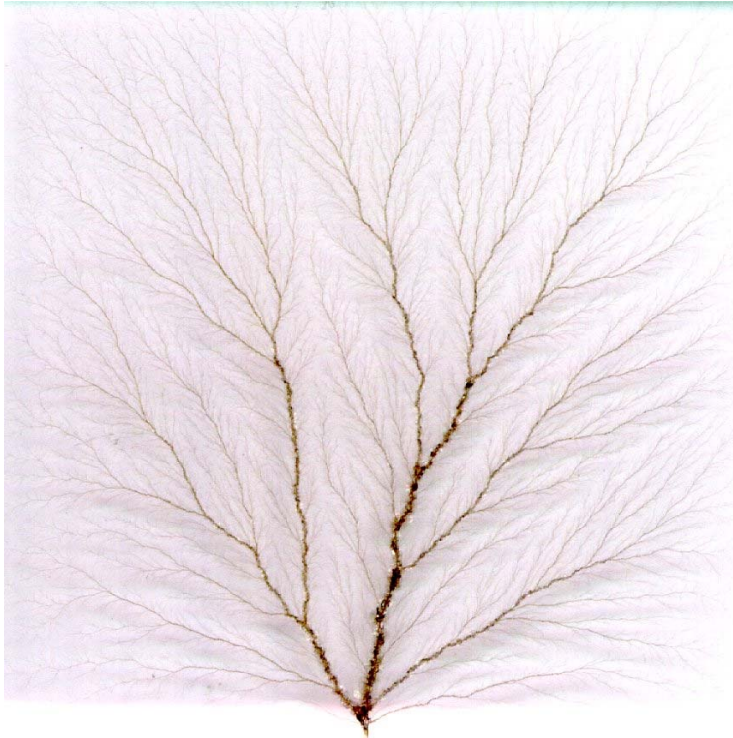
**Figura 8.** Velocidad de un automóvil al colisionar con un poste a 86 km/h. Los puntos mostrados corresponden al promedio móvil sobre cuatro puntos de los datos mostrados en la Figura 7. El promedio móvil sobre cuatro puntos reduce las variaciones debidas a la incertidumbre de los puntos individuales. Nos confirma que la aceleración promedio durante la deformación del motor es constante, o sea, fuerza constante. La recta corresponde al ajuste por regresión lineal de la velocidad contra tiempo.



Podemos ver que la aceleración promedio para este choque corresponde a cerca de 26 veces la aceleración de la gravedad. No hay cuerpo humano que la resista. En un choque el cambio en velocidad es igual a la velocidad inicial y en un choque de frente su duración es cercana a una décima de segundo. Lo pequeño del tiempo de colisión es lo que mata. Moraleja: si logramos incrementar el tiempo de colisión las aceleraciones son pequeñas, lo que se logra en colisiones de costado, que destrocen los lados del vehículo. En resumen, la Física puede salvar nuestras vidas.

### Motivación mediante preguntas

Como pregunta motivadora podemos plantear: qué pasa si bombardeamos una placa de plástico transparente, de 6 mm de espesor, con electrones acelerados por un millón de voltios. Se observa que los electrones no atraviesan la placa, si no que son detenidos en su interior. Dado que el plástico es un material aislante, los electrones al detenerse quedan atrapados en el volumen. Con el tiempo, la densidad local de electrones crece linealmente si la corriente de bombardeo es constante. Pero los electrones se repelen entre sí, lo que nos indica que si la densidad de electrones inyectados crece lo suficiente, crea un campo eléctrico interno capaz de moverlos. Si la energía que toma del campo es mayor que la energía que lo sujeta, un electrón acelerado libera a otro creando dos, los dos liberan a cuatro, y así sucesivamente, creando el proceso de avalancha que llamamos descarga eléctrica, con la consiguiente liberación de calor a lo largo de la trayectoria de la descarga. Esto funde al plástico momentáneamente para después volver a solidificar. En el plástico mostrado en la Figura 9, se introdujo un clavo para facilitar la salida de la corriente de la descarga. Puede observarse que las trayectorias se engruesan al acercarse al clavo, como un río se engruesa con sus afluentes.



**Figura 9.** Descarga eléctrica producida en el interior de una placa de plástico bombardeada con electrones de un millón de voltios. Cortesía de Esbaide Adem y Enrique Cabrera (Inst. Física, UNAM).

De la revista *Physics Teacher* (7) tomaremos un ejemplo acerca de la fuerza que ejerce un objeto cargado eléctricamente sobre un chorrito delgado de agua. El experimento, sencillo de hacer, es frotar un globo con una bolsa de plástico. Acercando el globo cargado al chorrito se observa una fuerza de atracción. La pregunta es: ¿Si acercamos la bolsa de plástico al chorrito, éste: se atrae, se repele o no le pasa nada?

El *Physics Teacher* y la mayoría de los libros que lo mencionan dicen que la fuerza de atracción se debe al carácter dipolar de la molécula del agua, que se orientan bajo la acción de los campos externos. Esta respuesta se olvida de que el agua es conductora por la presencia de iones (8); lo que implica que los campos eléctricos no penetran en el seno del líquido, sin posibilidad de orientar a los dipolos moleculares. La fuerza observada es la fuerza normal entre una carga inducida y la carga inductora, lo cual sirve como ejemplo para ilustrar que no siempre lo que está impreso es cierto.

¿Virar o frenar?

Supongamos que un automovilista a una velocidad de  $54 \text{ km/h} = 15 \text{ m/s}$  se acerca a una intersección, en la cual se detiene un trailer impidiendo el paso de frente, tal y como se ilustra en la Figura 10. ¿Qué le conviene al conductor, tratar de frenar en línea recta o girar el volante, siguiendo el círculo de mínimo radio?

La fuerza de fricción entre las llantas y el piso, la podemos utilizar para reducir la velocidad del coche en línea recta o para cambiar la dirección del movimiento haciendo girar el volante. Si utilizamos la máxima fuerza de fricción posible, sin que el coche patine, podemos

seguir una trayectoria que sea un arco de círculo con el mínimo radio posible. Si intentamos que gire en un radio menor, solamente lograremos que el coche patine perdiendo el control del mismo.

La fricción entre dos superficies es proporcional a la fuerza normal de contacto, en este caso, el peso del coche y a la constante de proporcionalidad le llamamos coeficiente de fricción. Supongamos que el coeficiente de fricción es de 0.8, ya sea para frenar o para girar, y la distancia inicial entre coche y trailer es de 14 metros.

¿Qué pasa si el conductor da un volantazo tratando de que gire más rápido de lo que permite la fuerza de fricción?

Recordemos que al frenar disipamos energía, pero el movimiento en círculo la conserva.

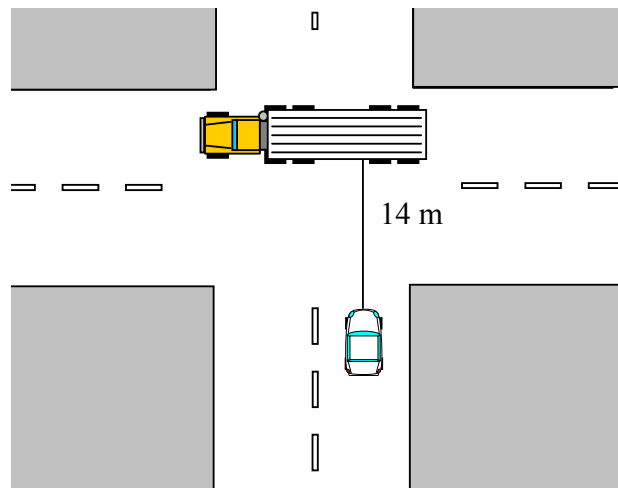


Figura 10. Diagrama trailer coche.

Respuestas:

Choque.-El conductor del coche puede usar la fuerza de fricción para detener al coche en línea recta o para tratar de desviarlo en una trayectoria circular. El radio de la trayectoria circular no puede ser más pequeño que cierto valor. Si el conductor da el volantazo excediendo este valor, el coche se patinara como si solo hubiera frenado, con riesgo de volcarse (¿Por qué?). El radio de giro (R) está dado por la fuerza centrípeta aplicada por la fuerza de fricción de las llantas con el piso.

Así, tenemos que igualando la fuerza centrípeta a la fuerza de fricción:

$$\frac{mv^2}{R} = \mu m g \quad \text{por lo tanto} \quad R = \frac{v^2}{\mu g}$$

en donde:

m = masa del coche (kg)

v = velocidad del coche (15 m/s)

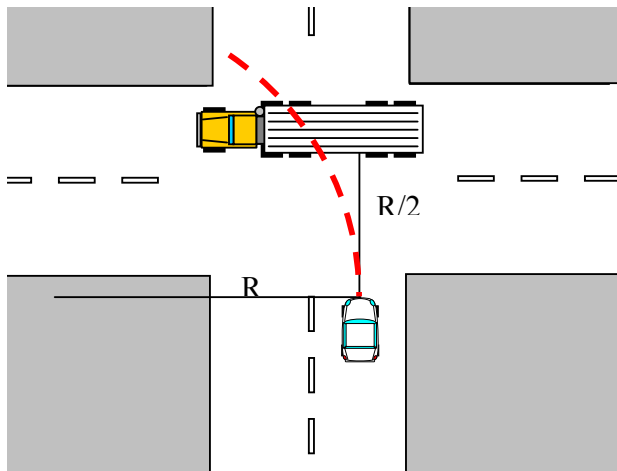
R = radio de giro (m)

g = constante de aceleración de la gravedad (9.81 m/s<sup>2</sup>)

μ = coeficiente de fricción (0.8)

Ahora si hubiera frenado en línea recta la deceleración (a) producida es igual a  $\mu \cdot g$  y la distancia (x) necesaria para frenar esta dada por:

$$x = \frac{v^2}{2a} = \frac{v^2}{2\mu g}$$



**Figura 11.** Diagrama trailer coche las dos posibles trayectorias extremas: frenando o girando.

Substituyendo valores numéricos se encuentra que hacen falta 14 metros para frenar mientras que el radio de giro es de 28 metros. La figura 11 muestra que la diferencia de las trayectorias es muy pequeña (11% de la distancia de frenado) y que el coche moviéndose por la trayectoria circular se estrella con toda su velocidad mientras que si hubiera frenado no hubiera chocado. Si la distancia es más de 14 metros frenando no tiene ningún problema. Si la distancia es menor de 14 metros, .....

Esto es un claro ejemplo de que la Física funciona en la vida diaria siempre y cuando el análisis lo hayamos hecho antes del evento; durante el choque no tenemos tiempo de pensar.

#### Cohete de aire

Como demostración experimental se puede utilizar el disparo de un cohete impulsado por aire, consistente en un tubo de media pulgada de PVC acoplado a la boca de una botella de plástico desechable de dos litros. Como proyectil se utiliza un acetato enrollado al diámetro del tubo de PVC y tapado en su extremo con una cinta de enmascarar. Apretando súbitamente la botella desechable se incrementa la presión interna, acelerando a  $1000 \text{ m/s}^2$  al proyectil, que sale a  $20 \text{ m/s}$  al separarse del tubo de PVC. Considerando como tiro parabólico el tiempo de vuelo es cercano a 4 segundos.

Lo interesante es calcular numéricamente el vuelo del cohete, aprovechando que se tienen computadoras con posibilidades de manejar bases de datos. Para poder calcular la fuerza de fricción con el aire, se requiere de un experimento extra para medir el coeficiente de fricción experimentalmente, ya sea considerando un modelo en donde la fricción es proporcional a la velocidad, o bien, al cuadrado de su velocidad. Filmando la caída del cohete y una piedra desde una altura de 8 metros, se miden tiempos y posiciones. Esta información, depende esencialmente del coeficiente de fricción con el aire. Así, una manera simple de calcularlo es

resolver numéricamente las ecuaciones de movimiento, ajustando las constantes para reproducir el movimiento experimental.

Podemos suponer una fuerza de fricción proporcional a la velocidad o al cuadrado de la velocidad. Esto es:  $F_f = k \cdot v$  o bien  $F_f = k \cdot v^2$

La fuerza total ( $F_t$ ) será el peso, estimado como el producto de la masa por la gravedad ( $m \cdot g$ ) menos la fuerza de fricción ( $k \cdot v$  o bien  $k \cdot v^2$ ):

Si en una primera aproximación, consideramos que:  $F_f = k \cdot v$

Entonces:

$$F_t = m \cdot a = m \cdot dv/dt = m \cdot g - k \cdot v$$

Considerando que  $dv/dt$  puede sustituirse por  $\Delta v/\Delta t$  si se toman intervalos de tiempo muy pequeños, entonces al despejar de la ecuación anterior  $\Delta v$  se obtiene:

$$\Delta v = (g - k \cdot v/m) \Delta t$$

Por otra parte

$$\text{Velocidad final} = \text{Velocidad inicial} + \Delta v$$

Si consideramos  $\Delta z$  como el desplazamiento del cohete con velocidad promedio  $\langle v \rangle$  en el intervalo  $\Delta t$ , entonces:

$$\Delta z = \langle v \rangle \Delta t \quad \text{y puesto que} \quad \text{Altura final} = \text{Altura inicial} + \Delta z$$

Tomando como cero la altura y velocidad iniciales, podemos calcular las velocidades y posiciones cada centésima de segundo ( $\Delta t = 0.01$ ). Para la caída libre la aceleración es constante e igual a  $g$  (recordemos que  $g = -9.8 \text{ m/s}^2$ ).

Si hay fricción la aceleración es  $g - k \cdot v/m$ .

Para  $t = 0.01$  s, el cambio en velocidad es  $-0.098$  m/s

La velocidad final es  $-0.098$

El cambio en altura es  $-0.000049$  m, usando la velocidad media en el intervalo

La altura final es  $-0.000049$  m.

Para  $t = 0.02$  s, se repiten exactamente las mismas operaciones pero con los nuevos valores. Si hacemos esto en una base de datos, podemos darle a la computadora la orden de copiar en renglones posteriores, con lo que se repiten automáticamente las operaciones. Dando un valor estimado a la constante  $k$  de fricción podemos calcular la trayectoria con fricción y comparar con la altura calculada para la caída libre. Si el atraso a los 8 metros de caída libre es mayor de 0.3 m nos indica que el coeficiente  $k$  es mayor que el valor real. Cambiando el valor de esta constante, la computadora rehace el cálculo y en unas cuantas iteraciones podemos obtener un valor ajustado para la constante  $k$ .

La tabla 4 nos muestra los valores calculados para los primeros intervalos de integración. Las primeras columnas se refieren a la caída libre, las siguientes a una fricción proporcional a la velocidad. La última columna es una comparación con la solución analítica del problema verificando que una centésima de segundo es suficiente para que los errores estén en la cuarta cifra significativa. La Figura 12 muestra los resultados completos del experimento de simulación mostrado en la Tabla 4, considerando tanto el caso en donde la fricción con el aire es directamente proporcional a la velocidad ( $k \cdot v$ ) o al cuadrado de la misma ( $k \cdot v^2$ ).

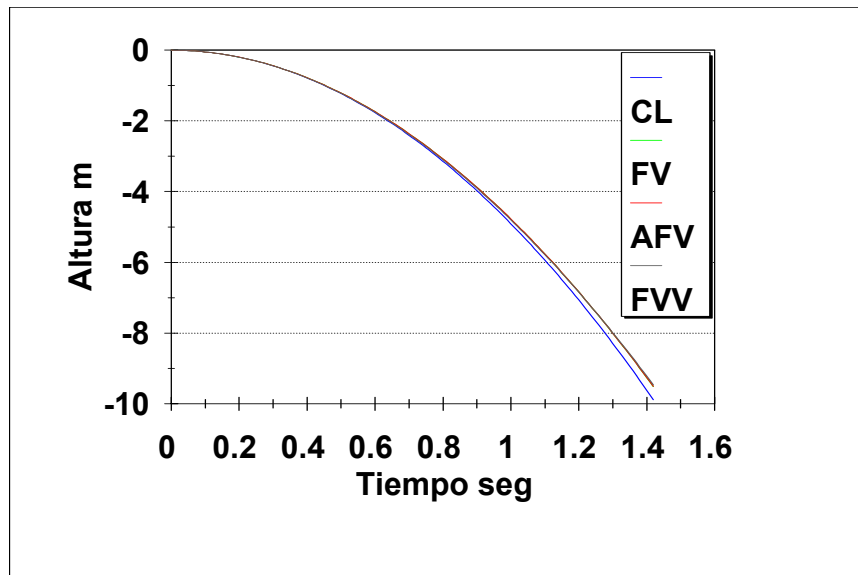
**Tabla 4.** Ejemplo de un ajuste numérico del coeficiente de fricción mediante un procedimiento iterativo aplicado a la caída libre de un cohete de aire.

Caída libre sin fricción					Caída libre considerando la fricción con el aire					Solución Analítica
$\Delta v$ (m/s)	Velocidad (m/s)	$\Delta Z$ (m)	Z Caída Libre (m)	Tiempo (s)	$\Delta v$ (m/s)	Velocidad (m/s)	$\Delta Z$ (m)	Zfricción V (m)	ZfricciónV (m)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-0.098	-0.098	-0.00049	-0.00049	0.01	-0.098	-0.098	-0.00049	-0.00049	-0.00049	-0.00049
-0.098	-0.196	-0.00147	-0.00196	0.02	-0.097918	-0.195918	-0.00147	-0.00196	-0.001959	-0.001959
-0.098	-0.294	-0.00245	-0.00441	0.03	-0.097837	-0.293755	-0.00244	-0.004408	-0.004406	-0.004406
-0.098	-0.392	-0.00343	-0.00784	0.04	-0.097755	-0.39151	-0.00342	-0.007834	-0.007831	-0.007831
-0.098	-0.49	-0.00441	-0.01225	0.05	-0.097674	-0.489184	-0.00440	-0.012238	-0.012233	-0.012233
-0.098	-0.588	-0.00539	-0.01764	0.06	-0.097592	-0.586776	-0.00538	-0.017618	-0.017611	-0.017611
-0.098	-0.686	-0.00637	-0.02401	0.07	-0.097511	-0.684287	-0.00635	-0.023973	-0.023963	-0.023963
-0.098	-0.784	-0.00735	-0.03136	0.08	-0.09743	-0.781717	-0.00733	-0.031303	-0.03129	-0.03129

Los resultados mostrados corresponden a los cálculos obtenidos en las primeras ocho centésimas de caída libre.

La masa del cohete de aire considerada es de 0.012 kg

El valor de la constante de fricción utilizada en el ajuste numérico mostrado es de 0.001



**Figura 12.** Ajuste numérico del coeficiente de fricción con el aire considerando varias alternativas. La fricción lineal, la cuadrática y la solución analítica son casi iguales en este intervalo. Caída Libre CL, Fricción  $kV$  FV, Solución Analítica  $kV$  AFV, Fricción  $kV^2$  FVV.



Este ejercicio muestra el poder de la computadora para simular experimentos y hace muy claro la integral como sumatoria. Esto hace accesible al estudiante cualquier problema de calcular la trayectoria de un objeto conociendo la fuerza que lo mueve. También ilustra el hecho de que los resultados experimentales no siempre permiten discriminar claramente entre dos modelos alternativos, ya que en este caso es evidente por los resultados de la Figura 12, que las curvas obtenidas considerando la fricción con el aire casi se sobreponen, siendo ligeramente mejor el ajuste para la fricción directamente proporcional a la velocidad ( $k \cdot v$ ); mejorando la precisión o midiendo un intervalo mayor será mas clara la discriminación,

Equilibrio, cristales y energía de activación (9)

Estos conceptos se pueden aclarar con la ayuda imanes flotando en agua, en un recipiente circular. Si el recipiente es transparente se puede colocar sobre el retroproyector para que se pueda ver en un auditorio grande. Rodeando al recipiente se colocan muchos imanes con sus ejes verticales o una bobina con corriente directa. Si colocamos un imán flotando con su eje vertical, este o es repelido al centro (equilibrio estable) o es atraído al borde del plato, según cual sea el polo en la parte superior. En este ultimo caso, el imán colocado en el centro tiene un equilibrio inestable.

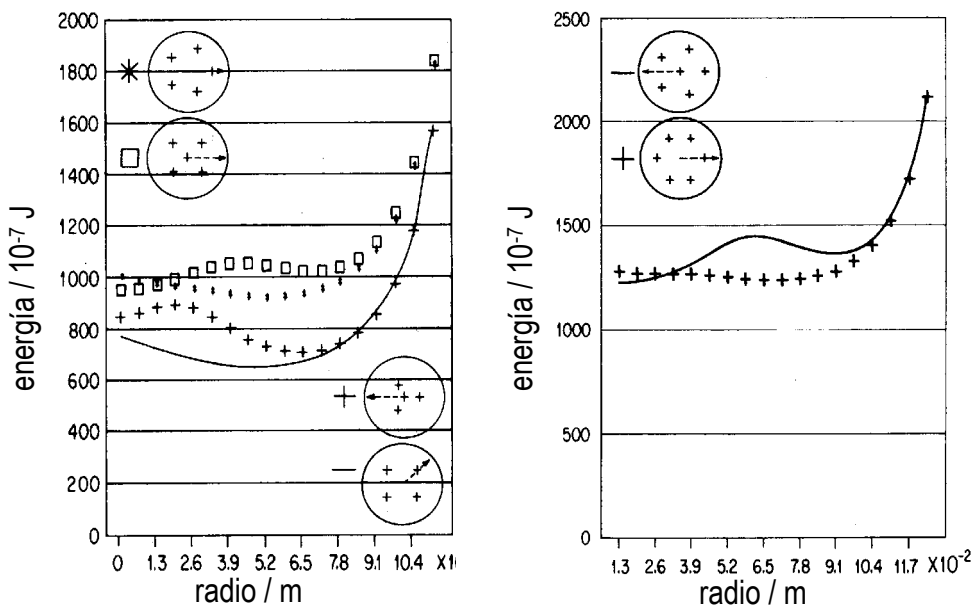


Figura 13. Energía magnética de cuatro, cinco y seis imanes, moviéndose uno de ellos a lo largo de la línea radial indicada en el inserto. Figura tomada de Riveros y cols. (9).

El caso del equilibrio estable corresponde a que todos los imanes periféricos lo repelen y solamente en el centro se cancela la suma de todas las fuerzas. Tenemos que hacer trabajo para sacarlo del centro, indicando un mínimo en la energía potencial. El equilibrio estable corresponde a mínimos en la energía potencial. Si colocamos tres imanes flotando, que se repelen entre sí, se forma un triángulo equilátero. Cuatro se acomodan en un cuadrado, con

cada imán flotando en una posición de equilibrio estable. Cinco se acomodan en un pentágono o en cuadrado con un imán al centro. Tenemos dos configuraciones de equilibrio con diferentes energías potenciales. Con seis, las configuraciones son hexágono o pentágono centrado (Figura 13).

El hecho de que se formen figuras simétricas se debe a la simetría del pozo de potencial en que tenemos a los imanes, pero eso pasa en la naturaleza con las sustancias cristalinas, que tienen una celda elemental bien definida. El hecho de que tengamos dos configuraciones de equilibrio indica que necesitamos dos energías de activación para pasar de un estado a otro.

### **Conclusión.**

Si el investigar es un arte tiene dos consecuencias profundas: en su enseñanza, enseñar un arte es muy diferente de formar artesanos; debemos dar oportunidad a nuestros discípulos de escoger su tema de investigación. En la profesión, al escoger un tema de trabajo, es importante que el mismo nos inspire, para que trabajemos con gusto; descubriremos que esto aumenta nuestra eficiencia. Al acabar una Licenciatura hay que tomar la decisión importante de sí incorporarse a la sociedad civil o continuar estudios superiores, necesarios para una carrera académica.

### **Referencias**

1. Lightman A, (2005) A tale of two loves. *Nature* 434: 299-300.
2. Kemp M, (2005) From science in art to the art of science. *Nature* 434: 308-309
3. McMullen K, (2005) Experimental physics, experimental art. *Nature* 434: 310-311.
4. Edwards DK, Denny VE, Mills AF, (1979) *Transfer Processes* McGraw-Hill New York.
5. SAAB videotape (1992) *Popular Science* (October): 60-61.
6. Ball PL, Doolen GD, Fry ES, Wedin MD (1974) Car-crash experiment for the undergraduate laboratory. *Amer J Phys* 42: 645-648.
7. Hewitt P. (1994). *Figuring Physics*. *Phys Teacher* 32: 254.
8. Riveros HG. (1995) Electric behavior of water. *Phys Teacher* 33: 420.
9. Riveros H, Cabrera E, Gally M, Fujioka J y Ruíz Mejía C. (1993) Models for the early stages of nucleation *J.Crys. Growth* 128: 44-49.

## **EL PLACER DE INVESTIGAR**

### **Entender causa placer, un incentivo para la investigación y la didáctica**

#### **Resumen**

Investigar en ciencias es buscar la respuesta a las preguntas que nos hacemos sobre la naturaleza, lo que a su vez genera nuevas preguntas. Cuando entendemos sentimos placer, que es el incentivo que a lo largo de los siglos nos ha llevado al estado actual del conocimiento. Las artes tienen tres características: el placer que siente el artista cuando ejecuta su obra, el placer del espectador; y que requieren aptitudes o inspiración. Similarmente, cuando entendemos algo sentimos placer, que podemos transmitir, y para ello, se requiere también de aptitudes e inspiración. Entonces podemos decir que pensar es un arte.

Con demostraciones, experimentos y preguntas mostraremos que entender el por qué de las cosas es placentero. Y que este placer es el motivador del investigador, que como un

artista, obtiene placer de su arte. Cuando se investiga en los temas que nos interesan, tenemos mejores ideas simplemente porque todo el tiempo estamos pensando en el tema sin esfuerzo de nuestra parte. Si el investigar es un arte, tiene dos consecuencias profundas: en su enseñanza, porque enseñar un arte es muy diferente de formar artesanos; debemos dar oportunidad a nuestros discípulos de escoger su tema de investigación. En la profesión, al escoger un tema de trabajo, es importante que el mismo nos inspire, para que trabajemos con gusto; descubriremos que esto aumenta nuestra eficiencia.

**Palabras clave:** Vocación, investigación, arte, ciencia, razonamiento, interpretación de datos, demostración

### Semblanza del Dr. Héctor G. Riveros.



Héctor G. Riveros Rotgé nació en la ciudad de México el 16 de octubre de 1940. Realizó estudios de licenciatura, maestría y doctorado en Física en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Ha realizado estancias de investigación en Utah y Alabama, por lo que forma parte de lo que quizá, sea la primera generación de investigadores mexicanos con prestigio internacional cuya formación académica se ha consolidado en nuestra Casa de Estudios.

Ha sido jefe de los departamentos de Metalurgia, Materia Condensada y Energía del Instituto de Física, UNAM y en el Centro de Investigación Avanzada-Unidad Mérida; secretario académico del Centro de Instrumentos e Instituto de Física, y coordinador de la licenciatura en Física en la Facultad de Ciencias. Ha sido miembro de varias comisiones dictaminadoras y organizador de cinco simposios nacionales e internacionales de Estado Sólido. Colabora con los programas “Domingos en la Ciencia” y “Jóvenes Hacia la Investigación” y es miembro del Comité Internacional de Conferencias Interamericanas de la Enseñanza de la Física.

Desde 1963 que se incorporó a las tareas académicas en su facultad, ha consolidado su formación a través de la experiencia docente que ha adquirido al impartir cursos en la Universidad Autónoma Metropolitana, en las universidades de Veracruz, San Luis Potosí, Sonora y la de Guadalajara. También ha sido profesor invitado y conferencista en las universidades de Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Guatemala, El Salvador, Honduras y Venezuela. Asimismo ha dirigido 18 tesis de licenciatura, ocho de maestría y dos de doctorado en la UNAM.

El Dr. Riveros ha publicado como especialista en física 50 trabajos de investigación, 14 memorias en congresos y 93 de divulgación y enseñanza de la física, ha hecho cuatro películas, siendo una de ellas premiada; ha presentado 144 trabajos en congresos, impartido 377 conferencias, de las cuales 109 son magistrales (internacionales 55, nacionales 54). En docencia ha impartido 105 cursos cortos, incluyendo 35 internacionales. Ha escrito diez libros sobre los principales tópicos de Física a nivel bachillerato y licenciatura.

Su curso más popular es ¿Quiero mejorar mi clase de física?, sus conferencias “El arte de pensar” y “Los placeres del pensamiento” muestran los aspectos placenteros de la ciencia, y han sido presentadas desde Canadá hasta Argentina. A lo largo de su trayectoria profesional, se

ha especializado en el área del estado sólido y crecimiento de cristales, diseño del equipo utilizado, flujo radiante de calor, dinámica molecular y contaminación atmosférica. Es miembro de diversas sociedades científicas, entre las que destacan: Sociedad Mexicana de Física, Academia Mexicana de la Ciencia, American Society for Crystal Growth, Sociedad Mexicana de Instrumentación, American Association of Physics Teacher y la Sociedad Mexicana de Cristalografía.

El doctor Riveros ha recibido numerosas distinciones como: miembro honorario del Comité Organizador del Congreso Internacional de Enseñanza de la Física, 1987; investigador nacional de Sistema Nacional de Investigadores desde 1984; miembro del Consejo Técnico Consultivo de la Calidad del Aire en la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, 1992; miembro del Comité Nacional para el Cambio Global IGBP; miembro del Contributed Papers Program Comité-Applied Physics and Technology; diploma de primer lugar por la película "Tensión Superficial, 1993; y el premio Universidad Nacional 2000 en el área de Docencia en Ciencias Exactas.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## LA ESTRUCTURA Y LA VISUALIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS

Martín González-Andrade<sup>1</sup>, Daniel Adriano Silva Manzano<sup>1</sup>, Israel Hernández Ruz<sup>2</sup>, Edgar Vázquez Contreras<sup>2\*</sup> y Alejandro Sosa Peinado<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. postal, 70159 México, D.F. 04510. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM, Apdo. postal, 70423 México, D.F. 04510

[asosa@bq.unam.mx](mailto:asosa@bq.unam.mx)  
[evazquez@bq.unam.mx](mailto:evazquez@bq.unam.mx)

### THE STRUCTURE AND MOLECULAR VISUALIZATION OF PROTEINS

#### Abstract

*There has been a big challenge in the scientific knowledge of chemical-biological process at the molecular level. The techniques for structural determination and visualization of small molecules, have been produced a deep impact in the protein science field, because now days is possible to get into the details of biomolecules. The two main techniques for protein structure determination are: the X-ray diffraction of protein crystals, and the nuclear magnetic resonance, which require the incorporation of nuclear isotopes in order to obtain a good resolution structure. From these studies are obtained a density map of the protein structure, which contained the three-dimensional coordinates (in a Cartesian axis x, y, z) of all atoms of the protein. To obtain the protein structure is required the use of specific computer algorithms, some of these programs required expensive licenses; other required academic licenses for its use. In this work we describe the process from the protein structure determination to the use of structural data for molecular visualization, with particular emphasis to the powerful program for protein visualization and structural analysis known as PyMOL.*

**Keywords:** Molecular visualization; Protein structure; Structure-function relationships; PyMOL software.

## LA CORRELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que ejecutan la mayor parte de las funciones vitales de las células: el reconocimiento molecular, el transporte de moléculas, la función estructural, la catálisis de las reacciones químicas, inclusive la regulación de la expresión de los genes está determinada por proteínas que interactúan con el ADN (ácido desoxirribonucleico). Entender estos procesos a nivel molecular es importante por sus consecuencias en el funcionamiento celular, ya que mutaciones en las proteínas, es decir, modificaciones en los residuos originales de la proteína, podrían ocasionar la pérdida o el mal funcionamiento de la misma, lo que puede resultar en alteraciones de alguna vía metabólica, por ejemplo, la fenilcetonuria. En otros casos si la estructura de la proteína está modificada puede generar pérdida de funciones, tales como la distrofia muscular y diversas encefalopatías, debido a que las proteínas que participan en procesos fundamentales pierden su conformación original o estructura nativa (se sugiere revisar las referencias 1 y 2). Otro ejemplo la amiloidosis, es un padecimiento donde algunas de las proteínas nativas se convierten gradualmente en cadenas largas que forman fibrillas que precipitan en las células. Cabe mencionar que alrededor del 50% de los tipos de cáncer humano encontrados a la fecha, se deben primordialmente a mutaciones en una proteína llamada supresor de tumor p53 (3).

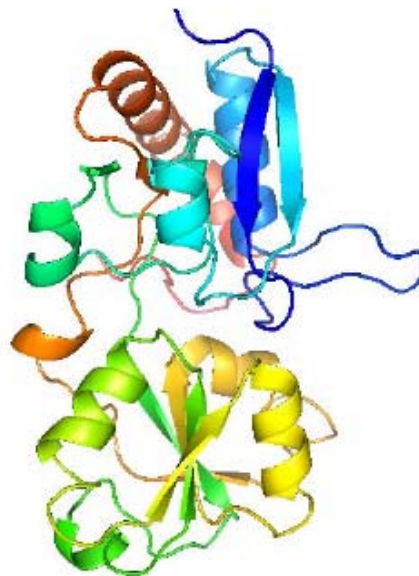
Cada proteína presenta una secuencia específica de aminoácidos, esta secuencia también llamada estructura primaria contiene la información necesaria para que estas biomoléculas se plieguen o adquieran una estructura tridimensional específica para desarrollar una función. De ahí que un objetivo fundamental de la investigación del estudio de las proteínas, es entender las relaciones entre la estructura y la función, lo que a su vez permitirá predecir estructuras y funciones a partir de la secuencia de aminoácidos. A pesar de los avances en los factores que determinan la estabilidad de la estructura nativa de las proteínas (4, 5), aun no es posible predecir la estructura tridimensional a partir de la secuencia primaria de aminoácidos de manera general y más aún su función de manera universal y sin ambigüedad. Sin embargo, a partir de: 1.- el desarrollo de las técnicas de la biología molecular que permiten obtener la secuencia de los genes; 2.- la posibilidad de obtener la secuencia primaria de proteínas de manera automatizada; y 3.- el desarrollo de los técnicas biofísicos para obtener la estructura tridimensional de proteínas. Actualmente se cuenta con un acervo de casi 31,000 coordenadas de diferentes estructuras de proteínas resueltas a nivel atómico (<http://www.rcsb.org/pdb/>), lo que ha intensificado y diversificado los estudios acerca de las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas (ver más adelante). El avance en la correlación entre la estructura y la función de las proteínas permitirá diseñar proteínas con nuevas actividades catalíticas o estructurales o diseñar nuevos fármacos más efectivos para curar o prevenir enfermedades. Por tal motivo es importante contar con métodos que nos permitan visualizar y analizar la estructura tridimensional de las proteínas. En la actualidad, gracias a: 1.- el desarrollo de los sistemas de programación, 2.- la reducción de los costos de computadoras personales de gran capacidad y 3.- las necesidades en la investigación para el estudio de las proteínas, se cuenta con una gran variedad de programas de cómputo para visualización de proteínas que son de dominio público o de fácil obtención con licencias académicas.

## LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

La estructura de las proteínas se clasifica en varios niveles; el primero, es la simple secuencia de aminoácidos, el orden en el que se encuentran, cuál va primero y cuál le sigue. Afortunadamente, contamos con una tabla de conversión denominada “código genético”, que nos permite traducir el idioma de los ácidos nucleicos -nucleótidos- al idioma de las proteínas – aminoácidos-; de lo anterior podemos deducir que si las proteínas son las principales responsables del fenotipo y este último está compuesto básicamente por la expresión del genoma y las condiciones ambientales, si conocemos todo el genoma de un organismo, eventualmente tendremos control sobre cada una de sus proteínas; así que podríamos idealmente modular el metabolismo para hacer más o menos eficiente cierta ruta metabólica o crear incluso una no existente, todo esto con fines industriales o biomédicos.

Actualmente sabemos cómo se llevan a cabo los flujos de la información genética en los seres vivos, sabemos cómo se expresa la información contenida en un gen particular para producir una proteína dada. Desafortunadamente conocer al genoma de una especie y contar con el código genético no resuelve todas las preguntas relacionadas con su fenotipo.

Los sucesivos niveles estructurales de las proteínas únicamente se obtienen si el collar de aminoácidos, se dobla sobre sí mismo para obtener una estructura tridimensional específica (Figura 1). En los sistemas biológicos la estructura y la función son propiedades inseparables, y esto ocurre desde los niveles anatómicos más grandes como las orejas de los elefantes, hasta los moleculares que aquí se discuten, de ahí que la distribución espacial correcta de la cadena de aminoácidos es un evento vital.

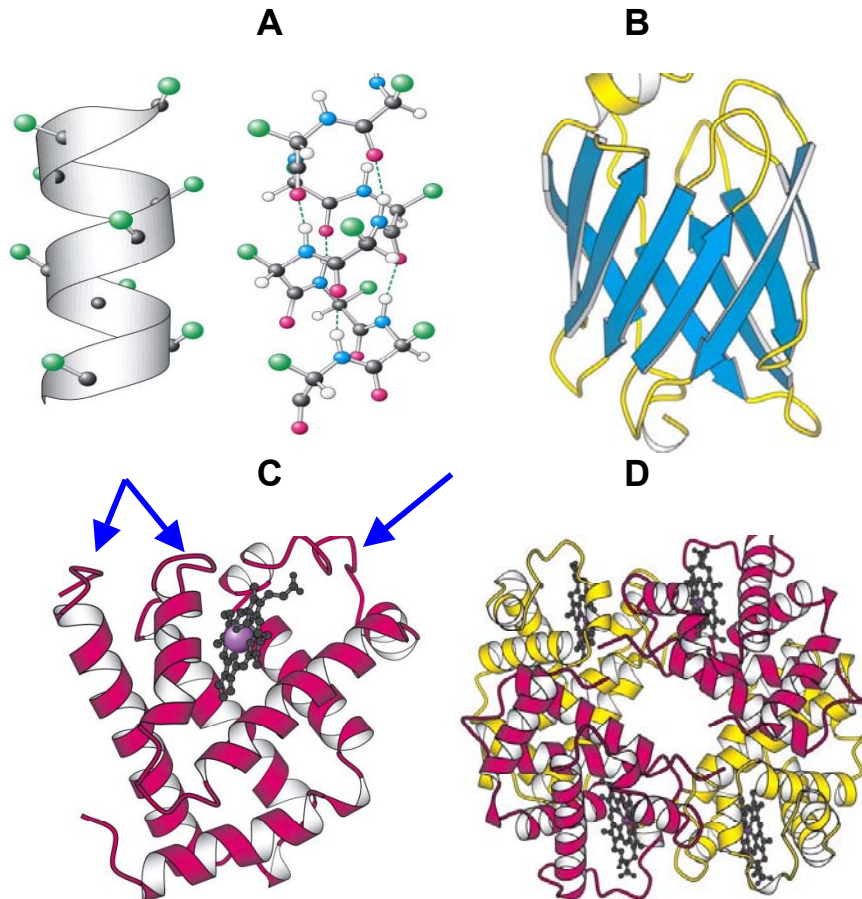


**Figura 1.** Estructura de la proteína periplásmica que une lisina, arginina, ornitina (LAO). Se muestra el arreglo tridimensional de la cadena polipeptídica.

### La estructura tridimensional

La estructura tridimensional de las proteínas está formada por un arreglo de estructuras repetitivas en formas helicoidales o planas (Figura 2A y 2B respectivamente), que forman la estructura secundaria; estos elementos están unidos por regiones no repetitivas que se

denominan asas (estructuras marcadas con flechas en Figura 2C). El empaquetamiento de la estructura secundaria se conoce como la estructura terciaria (Figura 2C). Algunas proteínas solo funcionan cuando dos o más cadenas de aminoácidos independientes se unen para formar un dímero, trímero, tetramero, etc. (Figura 2D). Estas proteínas poseen estructura cuaternaria.<sup>1</sup>



**Figura 2.** Representación de los diferentes niveles estructurales de las proteínas. A.- hélice- $\alpha$ . B.- lámina  $\beta$ . C.- estructura terciaria. D.- estructura cuaternaria.

## TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA RESOLVER LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

### La resonancia magnética nuclear<sup>2</sup>

La resonancia magnética nuclear (RMN) se lleva a cabo en soluciones acuosas de macromoléculas, de tal forma que giran y vibran con movimiento térmico. La RMN detecta cambios químicos de un núcleo atómico con espín (giro del electrón), diferente de cero. El

<sup>1</sup> Como lectura complementaria se sugiere el artículo del Dr Armando Gómez-Puyou del Volumen 27 de ésta misma colección de libros (1).

<sup>2</sup> Se sugiere como lectura complementaria revisar el artículo del Dr. Federico del Río Portilla en el volumen 27 de ésta misma colección de libros (6).



cambio depende de los ambientes electrónicos del núcleo, léase las identidades y distancias de átomos vecinos. El  $^1\text{H}$  es el único átomo que aparece naturalmente en las proteínas que puede ser observado por RMN. Las proteínas pequeñas (<15 kD) algunas veces pueden ser resueltas sin marcaje especial. Mejores datos se obtienen a partir de proteínas mayores si están uniformemente marcadas con  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ .

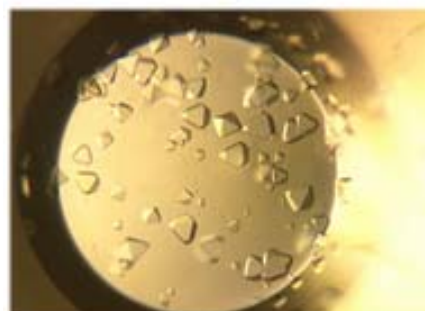
Para obtener señales de RNM con una resolución adecuada de la estructura, la molécula debe girar rápidamente. Esto típicamente limita el tamaño de la proteína a estudiar en 30 kD, aunque se supone que el aumento en la fuerza de los campos magnéticos potencialmente permitirá incrementar al doble la talla límite. La proteína a estudiar por esta técnica debe ser soluble a altas concentraciones (0.2-1.0 mM o 6-30 mg mL<sup>-1</sup>) y estable por días sin agregarse bajo las condiciones experimentales.

El resultado del análisis de RMN es un juego de estimados de distancias entre pares específicos de átomos, llamados "constreñidos". Estos constreñidos se obtienen para pares de átomos unidos o no (a través de distancias de enlaces o espacios). Con el número suficiente de constreñidos, el número de configuraciones consistentes con los datos se convierte en finito. Este resultado es una mezcla de modelos en vez de una sola estructura. A menudo las posiciones de los átomos en los diferentes modelos es un promedio que se ajusta para obtener distancias y ángulos normales ("minimización"). Muchas estructuras con entre 10 y 50 miembros cada uno de los cuales se ajusta a los datos de RMN y que posee buena estereoquímica son depositadas en la base de datos estructurales de proteínas, conocido por su nombre en inglés como Protein Data Bank (ver adelante). La comparación entre los modelos en esta mezcla provee alguna información sobre qué tan bien fue determinada la conformación por los constreñidos de la RMN.

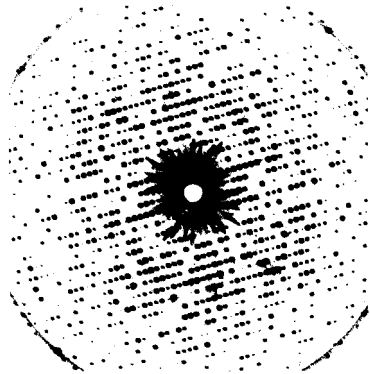
El resultado de un estudio de RMN no es tan detallado como lo es el obtenido por cristalografía, la desviación de la raíz cuadrada promedio (RMSD) entre estos modelos estructurales es utilizada para concluir que tan bien convergen los datos. Las mejores estructuras tienen valores de RMSD para el esqueleto menores a 1.0 Å, lo que significa que no hay grandes movimientos en el esqueleto o que coexisten diferentes conformaciones en solución.

Las regiones en donde existe una amplia diferencia entre los modelos de RMN (a menudo observadas en los giros o en los extremos de la proteína), puede significar carencia de información (incertidumbre), o movimiento o desorden de la molécula en solución. Un aspecto

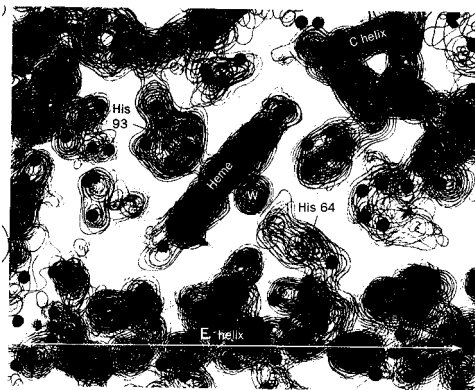
**Figura 3.** Cristales de proteína, vistos a través del microscopio óptico. Se muestra la homogeneidad de cristales de lisozima obtenidos por Edgar Vázquez-Contreras durante el curso "Cristalogénesis y cristalografía de proteínas". Instituto de Química, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México, Noviembre de 2000.



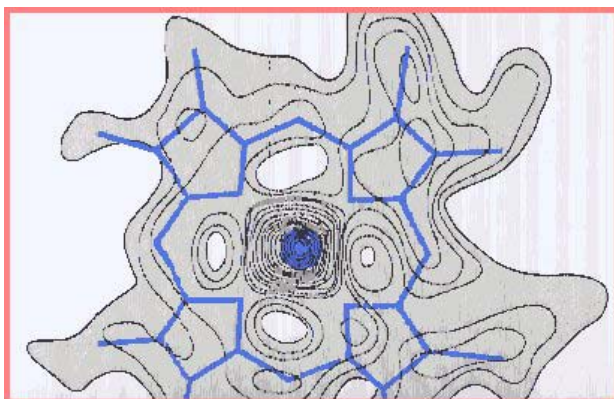
poderoso de la RMN es la habilidad para cuantificar la dinámica de cada residuo, lo que ayuda a distinguir entre estas posibilidades. Las porciones de una cadena con alta movilidad producen incertidumbre en la señal de RMN. En contraste por cristalografía estas porciones pueden producir densidades electrónicas bajas y uniformes sin proveer de información. A diferencia de la cristalografía de rayos X, los datos de RMN proveen de las posiciones relativas de muchos (pero no todos) los átomos de hidrógeno de la molécula.



**Figura 4.** Patrón de difracción de rayos X de una proteína. Resultado obtenido sobre una placa fotográfica después de bombardear a los cristales de la proteína con los rayos X.



**Figura 5.** Mapa de densidad electrónica de una proteína. Obtenido a partir del análisis del patrón de difracción de rayos X, este proceso requiere de herramientas computacionales especiales.



**Figura 6.** Posición de los átomos resueltos por cristalografía de rayos X de un grupo hemo. Ser aprecia cómo el mapa de densidad representa perfectamente la posición de los átomos de la molécula en cuestión.

## Cristalografía de rayos X

Hay que vencer muchos obstáculos experimentales antes de que la estructura tridimensional de una macromolécula sea determinada por difracción de rayos X de cristales. Primero la molécula debe ser cristalizada y el cristal debe ser singular (no más de una conformación en el mismo arreglo) y de calidad perfecta (Figura 3). Innumerables esfuerzos por determinar estructuras moleculares han fallado en esta parte. La cristalización de proteínas es más que una ciencia, un arte. Muchas moléculas importantes no aparecen en el PDB (protein data bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>) porque han fallado los intentos por obtener cristales adecuados. Las moléculas con porciones altamente hidrofóbicas no pueden ser cristalizadas, pero en algunos casos, los cristales se pueden obtener en presencia de detergentes. Esto explica la casi nula presencia de porciones transmembranales de proteínas en el PDB (a pesar de que existen algunos ejemplos de proteínas en soluciones de detergente resueltas por RMN, 6, 7). Se ha tenido mucho éxito al cristalizar dominios extracelulares clonados y expresados o porciones de receptores de membrana, porciones que carecen de las regiones hidrofóbicas unidas a la membrana. Una vez que se ha obtenido el cristal, se produce un patrón de difracción por irradiación de rayos X (Figura 4). Este patrón consiste de miles de puntos que son los datos crudos. La posición e intensidad de cada punto es determinada relativamente fácil, las fases de las ondas que formaron cada punto deben ser también determinadas para producir un mapa de densidad electrónica.

Resolver el "problema de la fase" es el segundo obstáculo. A menudo esto se acompaña al irradiar dos o más derivados del mismo cristal que difieren solamente en la presencia de iones de metales pesados. Este es el método del "reemplazo isomórfico" y requiere que los iones de metal sean incorporados en un cristal sin afectar la estructura, lo cual en ocasiones no es posible. Una solución más reciente para resolver el problema de la fase involucra utilizar la radiación de sincrotrón a varias longitudes de onda y ha acelerado la velocidad para resolver estructuras cristalinas. La descripción completa de cada reflexión - su posición, intensidad y fase - es denominada "factor de estructura". Los factores de estructura están disponibles en el PDB para aproximadamente 25 % de las entidades cristalográficas. El publicar los factores de estructura, permite a otros investigadores generar y examinar los mapas de densidad o tratar refinamientos alternativos o métodos de fase.

Los rayos X son difractados por los electrones de las moléculas en el cristal, de ahí que los resultados de una cristalización exitosa y la solución del problema de fase es una imagen tridimensional de las nubes electrónicas (un mapa de densidad electrónica) (Figura 5).

Esta imagen se interpreta al construir un modelo de la proteína que se ajuste al mapa. Un modelo molecular de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que se conozca mejor independientemente, es ajustado dentro del mapa de densidades electrónicas y se termina con una serie de refinamientos. El resultado es un juego de coordenadas Cartesianas X, Y, Z, para cada átomo que no sea un hidrógeno en la molécula (Figura 6).

Un resultado del refinamiento es la asignación de un factor de temperatura para cada átomo en el modelo final. Un factor de temperatura elevado sugiere desorden o movimiento térmico. Aquí desorden significa que el átomo ocupa diferentes posiciones en diferentes moléculas del cristal y movimiento térmico se refiere a vibraciones de un átomo sobre su

posición de reposo. Estas posibilidades no pueden ser distinguidas únicamente a partir de los datos de difracción. Si porciones de una cadena tienen alta movilidad o desorden, producen densidades electrónicas pobres o poco homogéneas, lo que hace imposible asignar posiciones a los átomos en esas regiones. Por esta razón es común encontrar que los extremos amino o carboxilo terminal y tal vez que uno o dos giros de una proteína carezcan de coordenadas cristalográficas. Los programas de cómputo para visualizar proteínas (RasMol, Chime, PyMOL, 8, 9) tienen en sus menús de color un esquema designado. "temperatura". Este proceso asigna colores cálidos a factores de temperatura elevados y colores fríos a los bajos.

### Orígenes y limitaciones de los datos tridimensionales

Muchos de los datos tridimensionales de estructuras macromoleculares depositados en el Protein Data Bank (PDB) se han obtenido por alguno de los siguientes métodos: cristalografía de rayos X (más del 80 % del total de las estructuras), resonancia magnética nuclear (RMN) en solución (alrededor del 16 % del total) o modelaje molecular (2 % del total). Unas pocas estructuras se han determinado por otros métodos: difracción de rayos X en sincrotrón, difracción de electrones, microscopía electrónica difracción de fibra, difracción de neutrones o fluorescencia de transferencia. Los resultados empíricos de estos métodos experimentales describen adecuadamente la estructura tridimensional de la molécula en el estado en el cual se realizaron las cuantificaciones. La cristalización a veces distorsiona porciones de una estructura debido a contactos entre moléculas vecinas en el cristal. Los cristales de proteína que se utilizan en los estudios de difracción están altamente hidratados, por lo que las estructuras determinadas a partir de estos cristales no son muy diferentes de las estructuras de proteínas solubles en solución acuosa. Algunas moléculas se han estudiado tanto por cristalografía como por RMN en solución, en estos casos la correlación es excelente, como en la tiorredoxina de *Escherichia coli*. La difracción de rayos X de cristal, usualmente no puede resolver las posiciones de los átomos de hidrógeno o realmente diferenciar entre un nitrógeno de un oxígeno o de un carbono. Esto significa que la identidad química de los átomos de la cadena lateral de aspártico, glutamina y treonina, es usualmente inferida a partir del medio en que se encuentra la cadena lateral, *i.e.*, el cristalógrafo selecciona la orientación de la cadena lateral que forma más puentes de hidrógeno o hace las mejores interacciones electrostáticas como la más plausible. Algunas veces, hay incertidumbre en si un átomo es o no parte de la proteína o si es un oxígeno de una molécula de agua o ión metálico unido. Algunas estructuras del PDB contienen posiciones de átomos de hidrógeno, que se agregaron modelando. Basados en esta técnica, sólo para el relativamente pequeño número de estructuras para las cuales la resolución es menor a 1.2 Å es posible localizar algunas de las posiciones de hidrógenos.

La RMN determina estructuras de proteínas en solución, pero está limitada a moléculas no mayores de 30 kD. La RMN es el método utilizado para proteínas pequeñas que no pueden ser cristalizadas y permite obtener la posición de algunos átomos de hidrógeno. Los resultados de los análisis de RMN son un conjunto de modelos alternativos, en contraste con el único modelo que se obtiene por la cristalografía.

Las estructuras obtenidas por modelaje teórico tienden a ser más exactas que las obtenidas por métodos experimentales. Un tipo de modelaje denominado modelaje por homología, involucra ajustar una secuencia conocida a la estructura tridimensional obtenida experimentalmente de una molécula de secuencia similar. Estos resultados están más cercanos de ser reales que los que derivan únicamente de la teoría (modelaje *ab initio*).

## BASE DE DATOS ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS: THE PROTEIN DATA BANK

La base de datos de la estructura de las proteínas también llamado PDB por sus siglas en inglés (protein data bank: <http://www.rcsb.org/pdb/> (10), contiene los archivos de la posición de cada átomo en un eje de coordenadas tridimensional (plano con tres ejes Cartesianos X, Y, Z) que conforman una proteína. Este archivo de coordenadas no solo considera el esqueleto de la proteína sino todas aquellas moléculas con las que se haya resuelto en conjunto la estructura de la proteína, por ejemplo los grupos prostético de hemo-proteínas, inclusive las moléculas del solvente que están unidos a las proteínas también aparecen y es con esta información con la que se alimentan los programas de cómputo para la visualización molecular (RasMol, PyMOL, Swiss-PDB, ver más adelante). La información contenida en este tipo de archivo proviene de la estructura tridimensional de proteínas obtenidas a la fecha por cristalografía de rayos X o la RMN. Esta base de datos fue originalmente desarrollada y mantenida por Walter Hamilton en Brookhaven National Laboratories, en USA en 1971 y hoy en día es almacenada y mantenida en el centro de bioinformática estructural conocido como: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (USA), desde 1998, el cual es un consorcio de diferentes universidades y centros que mantienen esta base de datos, la página de internet donde se puede acceder esta información es: <http://www.rcsb.org/pdb>. Esta base de datos contiene archivos con extensión pdb (archivos de coordenadas de las estructuras) o mmCIF (archivos de información macromolecular de cristales), pero para los fines de este capítulo, nos ocuparemos básicamente del formato pdb.

Hoy en día la base de datos "PDB" no solamente contiene la colección de la estructura tridimensional de proteínas, sino además, información estructural de ácidos nucleicos, carbohidratos y una variedad de complejos de macromoléculas o modelos estructurales creadas por otras técnicas biofísicas. Estos archivos (extensión pdb) presentan un formato determinado que no solo describe las coordenadas de cada uno de los átomos, ya que debe incluir características químicas y bioquímicas de las moléculas, tales como: los detalles experimentales de la determinación de las estructuras, la información de la estructura secundaria de la proteína, los puentes de hidrógeno, las moléculas de agua que están unidas a la molécula, la información de los posibles sitios activos o sitios de unión de ligandos a las proteínas, así como la posible estructura biológica, ya que muchas de la proteínas que forman parte del metabolismo pueden estar formadas por más de una cadena polipeptídica, para formar una proteína funcional oligomérica. Es importante conocer algunas características básicas de este tipo de archivo, porque en ocasiones es necesario editar los archivos a través de cualquier programa editor de textos o recurrir a la información contenida en el archivo, previo a realizar el análisis de la estructura. Por ejemplo, cuando se inicia el análisis de la estructura de una proteína es fundamental conocer si la estructura fue resulta en ausencia o presencia de ligandos, algún co-solvente o crioprotector ya que estas moléculas pueden interactuar con las proteínas y modificar algunos detalles de la estructura.

Las primeras líneas de este tipo de archivo contienen información básica que se denota a continuación con una palabra clave en inglés seguido de la explicación, a continuación se describen algunas de las líneas de información que debe llevar este archivo:

- Encabezado (HEADER), que se refiere al número de identificación de cada estructura, este número está compuesto de cuatro dígitos, el primero es un número y los siguientes tres

suelen ser letras por ejemplo 2LAO. También contiene la fecha de depósito de la estructura en el banco de datos.

- Título (TITLE), contiene información única de la biomolécula o condiciones de la experimentación.
- Nombre (CMPND), incluye el nombre común de la molécula.
- Fuente de obtención de la molécula (SOURCE), se refiere al origen ya sea químico o biológico de la molécula, por ejemplo si proviene de un organismo recombinante.
- Referencia de publicación (JRNL), contiene la cita original donde se describe la estructura depositada en la base de datos.
- Cometarios libres de los autores del trabajo (REMARK).
- Secuencia primaria de la proteína (SEQRES), la secuencia se indica en el código de tres letras
- Heteroátomos (HET), nombre de los residuos de átomos no comunes en las proteínas, por ejemplo los grupos prostéticos, o los ligandos que se unen a las proteínas.
- Fórmula química de los heteroátomos (FORMUL).
- Localización de los residuos con estructura secundaria tipo hélice- $\alpha$  (HELIX).
- Localización de los residuos con estructura secundaria tipo hebras beta (SHEET).
- Localización y existencia de enlaces disulfuro (SSBOND).
- Coordenadas atómicas que corresponden a la proteína (ATOM).
- Coordenadas atómicas de los residuos que no corresponden a la proteína se denominan heteroátomos (HETEROATOM).

A continuación se ejemplifica el inicio del archivo 1GBV.pdb que se utilizará más adelante como ejemplo en la visualización molecular.

```

HEADER      OXYGEN TRANSPORT                               20-DEC-95   1GBV
TITLE      (ALPHA-OXY, BETA-(C112G)DEOXY) T-STATE HUMAN HEMOGLOBIN
COMPND     MOL_ID: 1;
COMPND     2 MOLECULE: HEMOGLOBIN;
COMPND     3 CHAIN: A, B, C, D;
COMPND     4 SYNONYM: T[ALPHA-OXY,BETA-C112G];
COMPND     5 ENGINEERED: YES;
COMPND     6 MUTATION: CHAIN B, D, C112G;
COMPND     7 BIOLOGICAL_UNIT: ALPHA-BETA-ALPHA-BETA TETRAMER;
COMPND     8 OTHER_DETAILS: ALPHA-OXY, BETA-DEOXY, T STATE
SOURCE     MOL_ID: 1;
SOURCE     2 ORGANISM_SCIENTIFIC: HOMO SAPIENS;
SOURCE     3 ORGANISM_COMMON: HUMAN;
SOURCE     4 TISSUE: BLOOD;
SOURCE     5 CELL: ERYTHROCYTE;
SOURCE     6 EXPRESSION_SYSTEM: ESCHERICHIA COLI;
SOURCE     7 EXPRESSION_SYSTEM_PLASMID: PJK05;
SOURCE     8 OTHER_DETAILS: THE BETA CHAINS WERE RECOMBINANT, BUT THE
SOURCE     9 ALPHA CHAINS WERE PURIFIED FROM OUTDATED BLOOD OBTAINED
SOURCE     10 FROM THE BLOOD BANK OF THE UNIVERSITY OF MARYLAND
AUTHOR     G.B.VASQUEZ,X.JI,I.PECHKI,C.FRONTICELLI,G.L.GILLILAND
REVDAT    1   11-JAN-97 1GBV   0
JRNL       AUTH   G.B.VASQUEZ,X.JI,I.PECHKI,M.KARAVITIS,
JRNL       AUTH   2 C.FRONTICELLI,G.L.GILLILAND
REMARK     2 RESOLUTION. 2.0  ANGSTROMS.
REMARK     4 1GBV COMPLIES WITH FORMAT V. 2.2, 16-DEC-1996
REMARK     290 REMARK: NULL
DBREF     1GBV  A    1    141  SWS    P01922   HBA_HUMAN    1    141
DBREF     1GBV  B    1    146  SWS    P02023   HBB_HUMAN    1    146
    
```

```

DBREF 1GBV C 1 141 SWS P01922 HBA_HUMAN 1 141
DBREF 1GBV D 1 146 SWS P02023 HBB_HUMAN 1 146
SEQADV 1GBV GLY B 112 SWS P02023 CYS 112 ENGINEERED
SEQADV 1GBV GLY D 112 SWS P02023 CYS 112 ENGINEERED
SEQRES 1 A 141 VAL LEU SER PRO ALA ASP LYS THR ASN VAL LYS ALA ALA
SEQRES 2 A 141 TRP GLY LYS VAL GLY ALA HIS ALA GLY GLU TYR GLY ALA
SEQRES 3 A 141 GLU ALA LEU GLU ARG MET PHE LEU SER PHE PRO THR THR
SEQRES 4 A 141 LYS THR TYR PHE PRO HIS PHE ASP LEU SER HIS GLY SER
SEQRES 5 A 141 ALA GLN VAL LYS GLY HIS GLY LYS LYS VAL ALA ASP ALA
SEQRES 6 A 141 LEU THR ASN ALA VAL ALA HIS VAL ASP ASP MET PRO ASN
SEQRES 7 A 141 ALA LEU SER ALA LEU SER ASP LEU HIS ALA HIS LYS LEU
SEQRES 8 A 141 ARG VAL ASP PRO VAL ASN PHE LYS LEU LEU SER HIS CYS
SEQRES 9 A 141 LEU LEU VAL THR LEU ALA ALA HIS LEU PRO ALA GLU PHE
SEQRES 10 A 141 THR PRO ALA VAL HIS ALA SER LEU ASP LYS PHE LEU ALA
SEQRES 11 A 141 SER VAL SER THR VAL LEU THR SER LYS TYR ARG
HET HEM A 142 43 PROTOPORPHYRIN IX CONTAINS FE(II)
HET OXY A 143 2
HET HEM B 147 43 PROTOPORPHYRIN IX CONTAINS FE(II)
HET HEM C 142 43 PROTOPORPHYRIN IX CONTAINS FE(II)
HET OXY C 143 2
HET HEM D 147 43 PROTOPORPHYRIN IX CONTAINS FE(II)
HETNAM HEM PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE
HETNAM OXY OXYGEN MOLECULE
HETSYN HEM HEME
FORMUL 5 HEM 4(C34 H32 N4 O4 FE1)
FORMUL 6 OXY 2(O2)
FORMUL 7 HOH *367(H2 O1)
HELIX 1 1 SER A 3 GLY A 18 1 16
HELIX 2 2 HIS A 20 SER A 35 1 16
HELIX 3 3 PHE A 36 TYR A 42 5 7
HELIX 4 4 SER A 52 ALA A 71 1 20
HELIX 5 5 LEU A 80 ALA A 88 1 9
HELIX 6 6 ASP A 94 HIS A 112 5 19
HELIX 7 7 THR A 118 SER A 138 1 21
HELIX 30 30 THR D 123 HIS D 143 1
LINK FE HEM A 142 NE2 HIS A 87
LINK FE HEM A 142 O1 OXY A 143
LINK FE HEM B 147 NE2 HIS B 92
LINK FE HEM C 142 NE2 HIS C 87
LINK FE HEM C 142 O1 OXY C 143
LINK FE HEM D 147 NE2 HIS D 92

```

En la parte central del archivo, se encuentra la descripción de las coordenadas cartesianas que corresponden a cada átomo resuelto en la estructura. Este tipo de archivo se ejemplifica a continuación:

```

1 2 3 4 5 6 7 8
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
ATOM 145 N VAL A 25 32.433 16.336 57.540 1.00 11.92 A1 N
ATOM 146 CA VAL A 25 31.132 16.439 58.160 1.00 11.85 A1 C
ATOM 147 C VAL A 25 30.447 15.105 58.363 1.00 12.34 A1 C
ATOM 148 O VAL A 25 29.520 15.059 59.174 1.00 15.65 A1 O
ATOM 149 CB AVAL A 25 30.385 17.437 57.230 0.28 13.88 A1 C
ATOM 150 CB BVAL A 25 30.166 17.399 57.373 0.72 15.41 A1 C
ATOM 151 CG1AVAL A 25 28.870 17.401 57.336 0.28 12.64 A1 C
ATOM 152 CG1BVAL A 25 30.805 18.788 57.449 0.72 15.11 A1 C
ATOM 153 CG2AVAL A 25 30.835 18.826 57.661 0.28 13.58 A1 C
ATOM 154 CG2BVAL A 25 29.909 16.996 55.922 0.72 13.25 A1 C

```

Esta parte del archivo contiene las coordenadas de cada uno de los átomos y es muy importante la posición de cada columna, la cual no debe ser modificada por introducción o eliminación de espacios, de lo contrario el programa de visualización molecular no detecta o pierde la información de los archivos. Al inicio de cada renglón se encuentra la palabra ATOM, lo que indica una línea con coordenadas, a continuación en el siguiente orden y en los espacios indicados, se indica los componentes de esta parte del archivo: el número de identificación de cada átomo, nombre de cada átomo, residuo al que le corresponde cada átomo, si la proteína contiene subunidades se le identifica con una letra a cada subunidad, coordenadas en el eje X, coordenadas en el eje Y, coordenadas en el eje Z, factores de ocupancia (nos da una idea del nivel de resolución de cada átomo), factores de temperatura o movilidad, el símbolo de elemento que le corresponde a cada átomo y a la carga del mismo.

### **FUNCIONES BÁSICAS QUE REQUIERE UN PROGRAMA DE VISUALIZACIÓN MOLECULAR**

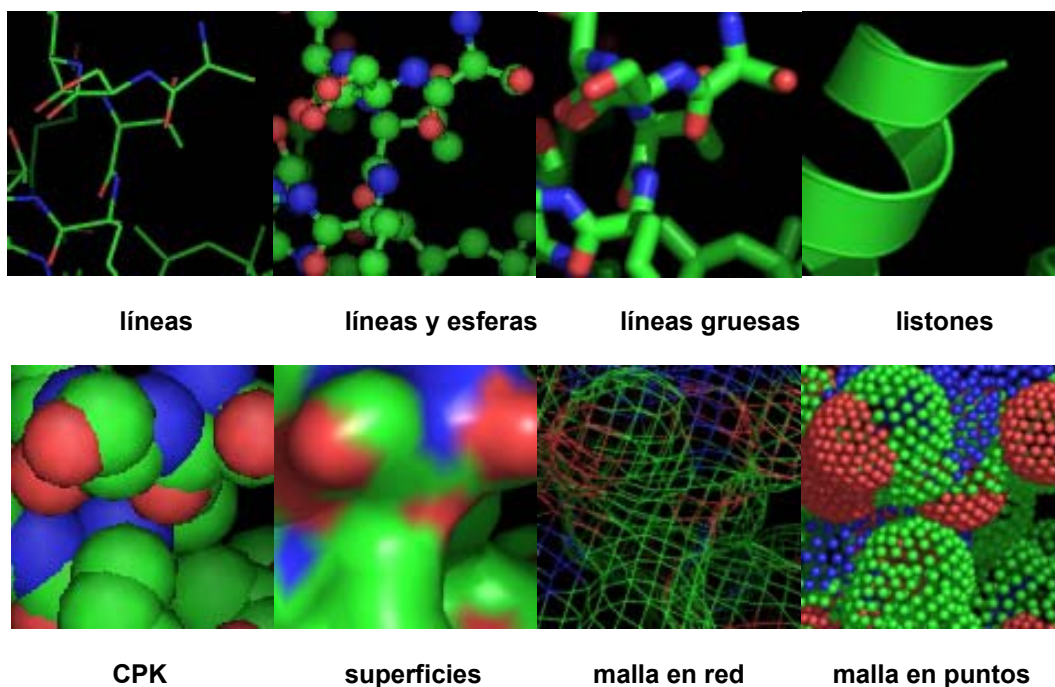
El entendimiento de los procesos bioquímicos, mencionados al inicio de este trabajo, tales como la catálisis realizada por enzimas, la expresión de los genes, las interacciones entre fármacos y sus blancos farmacológicos entre otros, se ha convertido en un intenso campo de estudio gracias al análisis de la estructura de las proteínas (11, 12). El inicio de este proceso de análisis requiere de programas de cómputo que nos permita la visualización a nivel atómico de las proteínas y por consiguiente, identificar las interacciones a nivel molecular entre dos o más proteínas o entre las proteínas con sus ligandos. En muchos casos simplificar la representación de la proteína a través de una caricatura que nos indique su forma y volumen o bien, represente la estructura secundaria de las proteínas con cilindros y flechas, ofrece gran ayuda para contar rápidamente con una idea general de la estructura tridimensional de la molécula de proteína, y de posibles regiones de interacción con otra proteína o un ligando (Figura 1). Sin embargo, la información contenida a nivel molecular contiene mucha más información que la simple caricatura y para extraer toda esta información los programas de computo requieren una serie de herramientas que nos permiten identificar y manipular las representaciones de las coordenadas de los átomos de una molécula, por ejemplo: cambiar la perspectiva de visualización a través de comandos de rotación, translación o cambio de tamaño de la molécula en la pantalla; colorear y etiquetar los residuos de interés de manera específica. Existen colores estándar para cada uno de los tipos de átomos: verde para el carbono, rojo para el oxígeno, azul para el nitrógeno, blanco para el hidrógeno, amarillo para el azufre, sin embargo el usuario puede cambiar el código de colores. Otras de las funciones que se pueden utilizar son las determinaciones geométricas entre residuos (distancias y ángulos), la representación del volumen de los átomos, así como realizar indicaciones sobre la superficie de la molécula, ya sea en forma de malla o bien sólida o transparente. Es importante recordar que dependiendo del programa de visualización y el análisis que se quiera implementar, todas estas herramientas se combinan de múltiples maneras, con la idea de resaltar ciertos sitios de interés.

Las representaciones más comunes de los átomos son:

- Líneas que unen a los átomos, las líneas representan los enlaces covalentes y los extremos representan los átomos (sticks).
- Esferas pequeñas que representan los átomos que son unidas por líneas que representan los enlaces covalentes entre los átomos (balls and sticks).



- La representación del radio de Van der Waals de los átomos (CPK o space filling) que nos da una idea del volumen de átomos.
- El esqueleto peptídico de la proteína (backbone), ya sea con la representación o no de los átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la proteína.
- Esquemática o también llamada caricatura, representa la estructura secundaria de una proteína: cilindros ó listones en forma de serpentina (estructura hélice- $\alpha$ ), Flechas (hebras- $\beta$ ), listones que comprende todas las estructuras no repetitivas, por ejemplo asas. Esta representación fue utilizada por primera vez por Jane Richardson en 1985 (8). Esta forma abstracta de representar a las proteínas, en donde se eliminan la coordenadas de los átomos y solo se representa la estructura secundaria es una de las forma más empleadas para representar en su conjunto la estructura terciaria de una proteína. Describir la topología de una proteína sigue siendo la forma más utilizada para representarla en libros de texto muy generales, hasta en publicaciones muy especializadas como artículos de investigación.



**Figura 7.** Representaciones de los átomos que presentan los diferentes programas de visualización estructural.

Existen una gran variedad de programas para la visualización de proteínas y van desde aquellos que son de dominio público (su obtención es libre de costos), hasta algunos que requieren licencias académicas, para educación o investigación. En la tabla 1 se presenta una lista de algunos de estos programas así como algunas de sus características.

Existen programas comerciales (SYBYL, Insight, Hyperchem), los cuales son muy prácticos, ya que a través de menú de ventanas se accionan todos los comandos, pero se pagan licencias costosas, por lo que no nos ocuparemos de ellos.

**Tabla 1.** Programas de visualización molecular de dominio público con licencias académicas.

Nombre	Capacidades	Comentarios	Ventajas	Desventajas	Plataforma
<b>Chime</b>	Se trabaja en línea a través del internet	Versión comercial del programa RasMol.	Mismas capacidades del RasMol. En línea se trabaja fácilmente	Comercial, no se puede modificar el programa según las necesidades, No esta disponible para ambientes tipo unix.	NT4.0 W2000 Mac
<b>Chimera</b>	Capacidades básicas para construir un modelo estructural	Paquetería modular, desde casos simples hasta modelos complejos.	Flexible y permite trabajar con una gran calidad de formatos de archivos.	No están disponibles los archivos fuente para modificar el programa, aún en fase de desarrollo.	NT4.0 W2000 Linux SGI Unix
<b>RasMol</b>	Visualización de estructuras	Muy interactivo, fácil de usar	Interactivo, con representaciones moleculares en estilos muy variados, distribución gratuita	Muestra una estructura a la vez, el ambiente gráfico es pobre	NT4.0 W2000 Mac Linux SGI Unix
<b>PyMOL</b>	Visualización molecular	Basado en una interfase grafica del programa Python, se introducen los datos desde el programa PyMOL o desde los comandos de Python	Amplia capacidad para representar a las moléculas. Comandos de lenguaje flexibles Códigos fuente del programa disponible	Si se opta por el uso de comandos es más laborioso de aprender. Requiere de computadoras con buena memoria y capacidades del CPU	NT4.0 W2000 Mac Linux SGI Unix
<b>VMD</b>	Visualización y análisis estructural, con énfasis a problemas dinámicos	Incluye un gran número de herramientas, para representar problemas dinámicos	Puede ser utilizado a través de comandos en ventanas o a través de scripts	Relativamente lento, a pesar de contar con buenos ambientes gráficos	Linux SGI Unix

## EL PROGRAMA DE VISUALIZACIÓN MOLECULAR PyMOL

El programa PyMOL es un poderoso programa para representar la estructura molecular de una proteína en las diferentes opciones ya mencionadas, además la resolución gráfica de las imágenes es excelente, por lo que pueden ser utilizadas para docencia o para publicación en revistas especializadas. Este programa es de dominio público cuando se obtiene para educación, el programa se obtiene de la página de internet: <http://pymol.sourceforge.net/>.

Hoy es posible obtener este tipo de programas de manera accesible debido a los desarrollos tecnológicos en los procesos de programación actuales y la reducción de costos tanto en las computadoras personales, así como en la capacidad del internet actual. PyMOL permite trabajar con las capacidades de los paquetes de visualización molecular escritos en lenguaje de cómputo complicados como C o Fortran y fue desarrollado por Warren DeLano (13,14). La gran capacidad del programa se debe a que utiliza el poderoso lenguaje de programación de cuarta generación llamado Python. La ventana gráfica del programa de PyMOL funciona como una interfase gráfica GUI (del inglés, Graphic User Interface) tanto externa que está

basada en el sistema Tcl/Tk y una interna que proviene del sistema OpenGL. Dado que el código fuente del programa está abierto a los usuarios (open source) ya sean académicos o bien programadores, el programa se encuentra en constante actualización, por lo que es fundamental instalar la versión del programa Python que le corresponde a la versión del programa PyMOL, de lo contrario no se tendrán las capacidades óptimas de las versiones indicadas. En la página de internet del programa indica las capacidades de cada una de las versiones, inclusive los futuros desarrollos.

El programa PyMOL tiene varias ventajas además de las ya mencionadas, tales como: leer coordenadas de diversos tipos de archivos estructurales (extensiones .pdb, .xyz, .mol2, etc); manipular diversas estructuras de manera independiente; generar la superficie de la estructura de manera opaca o transparente, almacenar las imágenes de trabajo en archivos con extensión png, la posibilidad de modificar el ángulo de incidencia de la luz para contar con una excelente resolución de la imagen, además permite leer mapas de densidad electrónica para los especializados en la cristalografía de macromoléculas (15).

### Como adquirir PyMOL

Nos avocaremos básicamente a la plataforma para computadoras portátiles con sistema Windows, sin embargo existen versiones para todas las plataformas.

A través del uso de cualquier navegador de internet ir a la página: <http://www.pymol.org/>

1-Buscar en la página la opción de bajar (download), buscar en la opción para plataforma Windows el archivo compactado (zip) `pymol-0_97-bin-win32.zip`, cargarlo en su computadora y descompactarlo.

2-Instalar el programa PyMOL ejecutando el archivo *Setup.exe*

3-Iniciar el programa desde el icono de inicio o en el menú de inicio (start menú), recuerde que requiere el programa Python.

Cargando el programa Python

1-Buscar en la página de Python: <http://www.python.org>, la versión del programa Python\_2.4.1, cargarla en la computadora

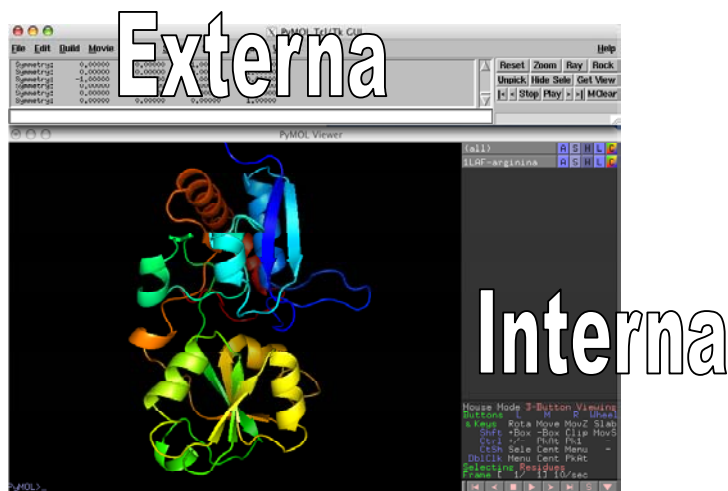
2-Ejecutar la instalación del programa Python siguiendo todas las indicaciones

3-Ejecutar el programa Python\_2.4.1.exe

### Aspectos básicos: Interfases graficas del PyMOL

La Figura 8 muestra los componentes básicos de la ventana del programa PyMOL. En la parte superior en fondo gris aparecen los comandos básicos que se encuentran en la ventana de la interfase gráfica (GUI) externa Tcl/Tk, en donde se accede a los comandos a través de ventanas para editar o construir una molécula. En la parte derecha de la pantalla se encuentra la ventana de la interfase gráfica (GUI) interna.

Cuando el programa se alimenta con una estructura, aparece el nombre de este archivo en el menú representaciones moleculares (GUI interna), este menú contiene cinco letras que solamente tiene efecto sobre el objeto que es el archivo o subarchivo seleccionado por el usuario de las coordenadas, los comandos de representación son cinco A, S, H, L, y C. La utilidad de estos comandos se explica a continuación (Figura 9): A (Action) tiene que ver con el tamaño y orientaciones y presentaciones diversas de la estructura, dependiendo de la información



**Figura 8.** Interfase gráfica (GUI), externa e interna que presenta el programa PyMOL.

contenida en el archivo pdb permite hacer representaciones con ligandos; S (Shows) tiene que ver con las representaciones de la estructura atómica, por ejemplo permite presenta la estructura en líneas delgadas o gruesas, como caricatura, en listones, en superficie, en malla, en continuo, etc; H (Hide) tiene que ver con eliminar o esconder las representaciones anteriores; L (Label) se refiere a un gran número de etiquetas y anotaciones que se pueden realizar sobre la estructura y C (Color) permite colorear de muchas maneras los residuos o los objetos seleccionados. Estos comandos únicamente actúan sobre el nombre del objeto (archivo de estructura) que se encuentra a la izquierda en la ventana de cinco letras, y esta ventana aparecerá tantas veces como objetos se seleccionen a partir del archivo original. Esta es una opción muy útil para profundizar el análisis molecular a detalle, en vez de trabajar con toda la molécula.



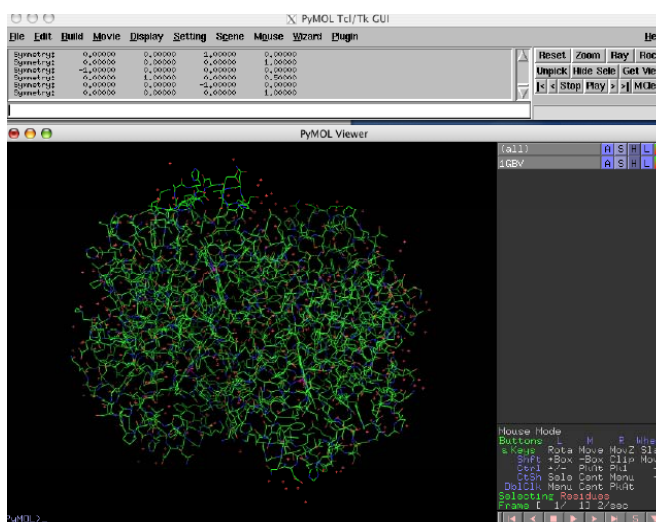
**Figura 9.** Posición en la pantalla del programa PyMOL, de los diferentes tipos de comandos.

## Manipulación de la orientación

En la parte inferior aparecen los comandos de la interfase gráfica interna, que tienen que ver con la orientación de la molécula o selección de funciones que actúan con el ratón de la computadora, se recomienda contar con un ratón de tres botones, ya que aumenta las capacidades de manipulación de la molécula: botón izquierdo (L) permite rotar la molécula libremente a partir del centro de la molécula, botón central (M) permite mover la molécula en los planos X, Y, mientras que el botón de la derecha permite cambiar el tamaño (o mover en el plano Z), si se tiene un ratón con rueda en el botón central, además permitirá hacer cortes en rebanadas a varios niveles de la molécula.

## Cargar un archivo de estructura al programa

Abrir el archivo 1gbv.pdb que se encuentra en el escritorio, y que se puede cargar en el programa desde los menús de ventana superior (interfase gráfica externa, GUI), a través del menú de la ventana *File* y luego *Open*, o bien puede obtenerla del banco de datos estructurales de proteínas (PDB) a través del internet. En las últimas versiones del programa, la selección de la ventana *plugin* de los comandos externos, seguido de la ventana *pdb loader server*, permite introducir el número de identificación de una proteína (1gbv.pdb), esta opción conecta automáticamente al programa con la base de datos del PDB por internet y aparece la estructura en la pantalla del programa. Este archivo (1gbv.pdb) corresponde a una molécula de hemoglobina humana, la cual contiene un grupo hemo en cada una de sus cuatro subunidades (ver las líneas de información del archivo tipo pdb). La representación estándar de las coordenadas en este programa es en el formato de líneas (sticks), en el código de colores estandarizado para cada tipo de átomos: verde para carbono, azul para nitrógeno, rojo para oxígeno y blanco para hidrógeno (Figura 10), note que los hidrógenos no aparecen normalmente en un archivo obtenido a partir de estudios cristalográficos, ya que esta técnica no resuelve la posición de los hidrógenos. En el comando "A" a la derecha del nombre del archivo existe una opción para introducir los hidrógenos a una molécula. A partir de esta estructura se puede utilizar las líneas de comandos internos para representar la molécula completa en los diferentes formatos mencionados, pero antes de adentrarnos en estos formatos vamos a combinar su uso con la sintaxis del uso de comandos del programa PyMOL.



**Figura 10.** Pantalla del programa PyMOL después de cargar el archivo de datos estructurales 1gbv.pdb, que corresponde al un tetrámero de hemoglobina.

### Líneas de comando para realizar manipulaciones más finas

En la parte inferior de la izquierda de la pantalla gráfica, aparece la línea de comandos a continuación del cursor PyMOL>. Las líneas de comandos es la parte poderosa del programa para manipular la representación de las moléculas e iniciar el análisis estructural, sin embargo es la parte más difícil por su sintaxis característica. A continuación mencionaremos algunos de los comandos más útiles, que serán utilizados en combinación de menús de ventana para indicar diferentes análisis de las representaciones moleculares. Los comandos a utilizar se encuentran en inglés y están indicados en *itálicas*.

<b>Comando</b>	<b>Explicación</b>
<i>Cargar-load</i>	Permite leer los archivos de coordenadas para su representación.
<i>Salvar-save</i>	Salva las coordenadas en un archivo del programa
<i>Seleccionar-select</i>	Selecciona átomos o residuos a partir de un objeto ya existente.
<i>Borrar-delete</i>	Borra objetos
<i>Color-color</i>	Permite colorear de múltiples maneras un objeto.
<i>Mostrar-show</i>	Permite mostrar una representación molecular en particular.
<i>Ocultar-hide</i>	Elimina de la pantalla alguna de las representaciones seleccionadas
<i>Modificación de la selección-set</i>	Modifica alguno de los parámetros seleccionados, por ejemplo el ancho de las líneas, tamaño de las esferas etc.
<i>Centrar-orient</i>	Centra la orientación del objeto en la pantalla.
<i>Distancia-distance</i>	Permite medir distancias entre residuos.

Estos comandos son combinados con sub-comandos para formar una sintaxis particular que nos permita realizar manipulaciones más finas sobre la estructura de la proteína, a continuación se explican algunos de los sub-comandos más útiles y su sintaxis. La palabra "nombre" en la sintaxis indica como aparecerá en el menú de ventanas interno que corresponde a las cinco letras ya mencionadas (A,S,H,L,C, Figura 9).

<b>Sub-comando</b>	<b>Explicación y sintaxis</b>
<i>all</i>	Todos los átomos.
<i>none</i>	Ningún átomo
<i>hydro</i>	Actúa sobre los átomos de hidrógeno PyMOL> select nombre, hydro
<i>hetam</i>	Actúa sobre los heteroátomos PyMOL> select nombre, hetam
<i>symbol</i>	Símbolo atómico PyMOL> select nombre, symbol o+n
<i>name</i>	Actúa sobre los diferentes tipos de átomos en el archivo. PyMOL> select nombre, name ca+cb+cg+cd
<i>chain</i>	Actúa sobre el nombre de la cadena del archivo de estructura PyMOL> select nombre, chain A
<i>resn</i>	Actúa sobre el código de tres letras de los aminoácidos de una letra de las bases de los ácidos nucleicos PYMOL>select nombre, resi glu+asp
<i>resi</i>	Actúa sobre el número de residuo en la secuencia primaria, por separado o una fracción de la secuencia PyMOL> select nombre, resi, 1+10+100 PyMOL> select nombre, resi 30-40
<i>ss</i>	Indica la estructura secundaria: h=helice; s=beta; l= al azar; y ""=asas. PyMOL> select nombre, ss, h+s+l+""

La sintaxis es:

PYMOL> Comando nombre\_del\_objeto, subcomando

La palabra “comando” se refiere a la primera sección de comandos (*select*, *show*, *hide*), que corresponde a la acción importante que deseamos. A continuación, la palabra “nombre del objeto”, es la anotación que crea el usuario, la cual aparecerá en la ventana interna. La parte importante es que el usuario a través del menú de cinco letras podrá hacer manipulaciones con ventanas, por ejemplo:

PYMOL>select fragmento, *resi* 1+12+24, que significa seleccionar los residuos de la molécula 1,12 y 24 de la secuencia primaria, o bien:

PYMOL>select subunidadA, *chain* A, en donde se selecciona toda las coordenadas de la subunidad A.

El nombre “*subunidadA*” aparece en la ventana interna para posteriores manipulaciones. El ejemplo de la molécula de hemoglobina (1GBV.pdb) cargada en el programa será utilizado para seleccionar cada una de las cuatro subunidades de la hemoglobina y manipularlas independientemente. La sintaxis es la siguiente:

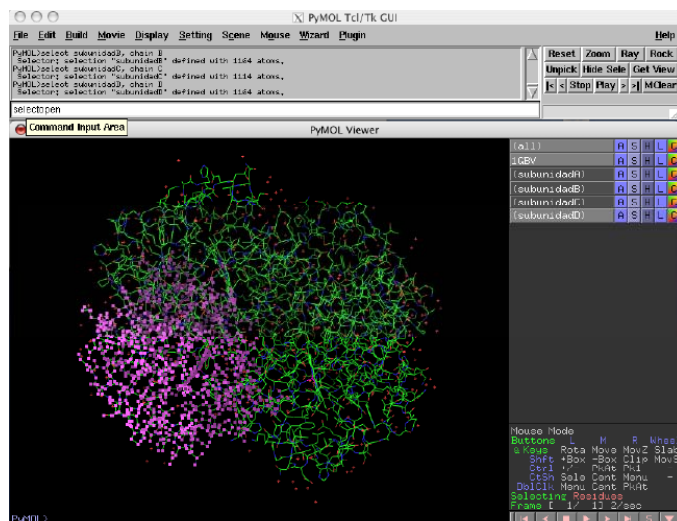
PYMOL>select subunidadA, *chain* A

PYMOL>select subunidadB, *chain* B

PYMOL>select subunidadC, *chain* C

PYMOL>select subunidadD, *chain* D

Al final de este procedimiento veremos la siguiente pantalla (Figura 11), donde aparece en los comandos internos de ventana cinco líneas: 1GBV, que corresponde a la molécula completa, y los fragmentos u objetos que corresponde a las cuatro subunidades diferentes A, B, C y D (Figura 11).



**Figura 11.** Pantalla del programa PyMOL después de seleccionar cuatro objetos que corresponden a cada subunidad del tetrámero de hemoglobina.



Ahora procederemos a modificar la representación molecular de cada una de las subunidades por separado, por ejemplo, si vamos a la línea de *subunidadA*, seleccionamos S, seleccionamos del menú de ventanas *ribbon* (listones) y seleccionamos en C (color) en color *blue* (azul), este procedimiento nos representará solamente la subunidad A en listones azules. Sucesivamente podemos seleccionar, la subunidad B con *sticks* (líneas gruesas) en color estándar, posteriormente la subunidad C se selecciona la caricatura (*cartoon*) en color rojo y la subunidad D en superficie (*surface*) en color magenta, con este procedimiento obtendremos la figura 13.

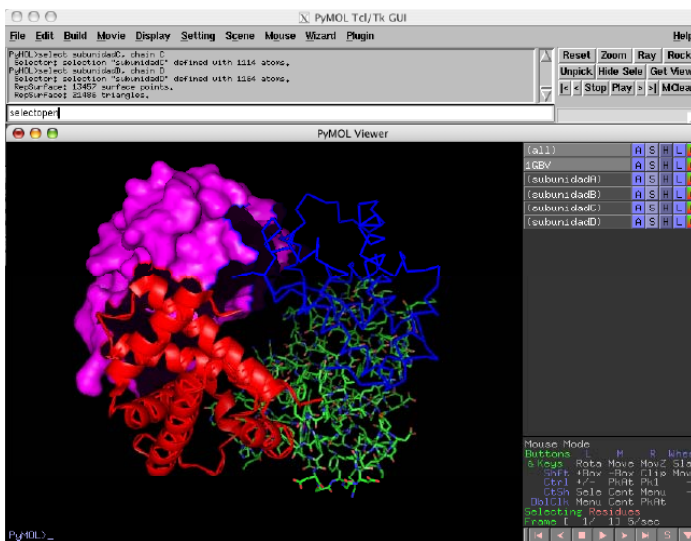


Figura 12. Representación molecular en diferente formato para de cada subunidad del tetramero de hemoglobina.

Si bien el programa, tiene una gran capacidad para generar diversas representaciones moleculares, por ejemplo, indicar los hidrógenos, o bien las interacciones polares, representar solamente los átomos alrededor de la selección de otro átomo, requiere conocimiento mayor en la construcción de la sintaxis de las líneas de comandos del programa PyMOL. Pero a un primer nivel la combinación de ambos tipos de comandos, no da mucha más versatilidad con el programa para representar de manera diferente cada subunidad.

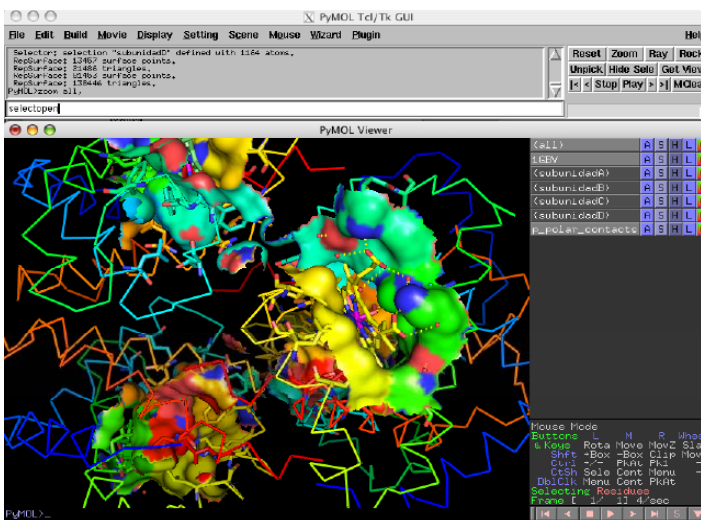


Figura 13. Representación molecular del tetramero de hemoglobina, donde se resalta la estructura y las interacciones del grupo hemo con la proteína.



Finalmente en la opción A del tetrámero de hemoglobina representaremos los sitios de interacción con el grupo hemo, también se podría realizar únicamente sobre alguna de las subunidades seleccionadas. De tal suerte que cuando seleccionamos en 1GBV la opción A, vamos a través del menú de ventanas a las opciones: *present*, *ligand site*, *solid (better)*, nos permitirá obtener la figura 13, solamente nos resta buscar una orientación de interés a través del ratón de la computadora para analizar la interacción del grupo hemo con la proteína.

En esta imagen se observa la representación de la estructura de la proteína en listones y solamente las regiones donde se encuentran los grupos prostéticos (se indican en líneas gruesas) se indica la superficie de contacto con los aminoácidos que interactúan con el grupo hemo. Inclusive si se desea información sobre algún átomo haga un doble presión con el botón izquierdo del ratón y manténgalo oprimido, lo que producirá otra ventana con la información del residuo, y además le da la libertad de manipular independiente el átomo seleccionado.

Para crear imágenes de alta resolución para seminarios o publicaciones en revistas especializadas es mejor trabajar a través del uso de la línea de comandos. Además, esto tiene la ventaja de crear en un archivo de texto una serie de rutinas llamadas scripts, en donde se llama a un pequeño programa que ejecuta automáticamente todas las herramientas que utilizaron al crear una imagen, en el orden que le interese al usuario y de manera automática. Lo que ahorra tiempo o se puede utilizar de manera general para diversas estructuras. Si desea obtener más información sobre los scripts consulte la página de internet del programa y podrá consultar en la opción de conexión (links) diversos tutoriales sobre este tópico.

## Bibliografía

1. Gómez Puyou A, (2003). La complejidad de las proteínas: relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. En: Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, XXVII: 85-95.
2. Cháñez-Cárdenas ME, Cisneros Armas DA, del Pozo Yauner L, Becerril B y Fernández-Velasco DA. (2002). Enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, XXVI: 73-97
3. Meisenberg G y Simmons HW. (1998) *Principles of Medical Biochemistry*. C.V. Mosby. New York, 742 pp.
4. Fersht A. (1999). *Structure and mechanisms in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. WH Freeman. New York, 312 pp.
5. Petsko GA y Ringe D. (2003) *Protein Structure and Function*. New Science Press/Blackwell Publishing, New York, 180 pp.
6. del Río Portilla JF. (2003). Determinación de la estructura de proteínas por resonancia magnética nuclear. En: Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, XXVII: 65-83.
7. Wutrich K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, 250 pp.
8. Lesk MA. (2001) *Introduction to Protein Architecture: The Structural Biology of Proteins*. Oxford University Press. Oxford, 347 pp.
9. Westbrook J y Fitzgerald PM. (2003): The PDB format, mmmCIF format, and other data formats. En: Bourne PE y Weissig H. Eds. *Structural Bioinformatics*. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 161-179.
10. Bourne PE y Weissig H. (2003) The PDB Team: En: Bourne PE y Weissig H. (eds). *Structural Bioinformatics*. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 181-198
11. Padilla Zúñiga J y Rojo Domínguez A. (2002) Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking: aplicación al diseño de fármacos. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, XXVI: 129-145
12. Berg J, Tymoczko M y Stryer L. (2002). *Biochemistry*. WH Freeman, New York, 974 pp.
13. DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>.

14. Sansom CE y Smith CA. (1998) Computer applications in the biomolecular sciences. Part 1: molecular modelling. *Biochemical Education* 26: 103-110.
15. Xu D, Xu Y y Uberbacher EC. (2000) Computational Tools For Protein Modeling. *Curr Prot Peptide Sci* 1: 1-21.

#### **Paginas de Internet con programas de visualización molecular**

RasMol: <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/>  
Chime: <http://www.mdli.com/>  
Chimera: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>  
VMD: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>  
PyMOL: <http://pymol.sourceforge.net/>

Se recomienda también visitar la siguiente página: <http://garlic.mefos.hr/garlic/competition/>

#### **Paginas de Internet especializadas sobre el programa PyMOL**

- ➔ Kristian Rother's PyMOL pages:  
<http://www.rubor.de/bioinf>
- ➔ Carly Huitema's tutorial:  
[http://www.rubor.de/bioinf/pymol\\_tutorial.html](http://www.rubor.de/bioinf/pymol_tutorial.html). (Muy bueno para principiantes)
- ➔ Robert L Campbell's page:  
<http://adelie.biochem.queensu.ca/rlc/work/pymol/>

## **LA ESTRUCTURA Y LA VISUALIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS**

### **Resumen**

En la actualidad el conocimiento científico de los procesos químico biológicos presenta un gran avance desde el punto de vista molecular. Las técnicas de determinación de la estructura y la visualización de objetos de talla pequeña han revolucionado el conocimiento de forma sorprendente, de tal suerte, para beneficio específico de la ciencia de proteínas, que es posible bajo circunstancias particulares observar el diverso y maravilloso mundo de estas biomoléculas. Las dos principales técnicas para resolver las estructuras de las proteínas son la difracción de rayos X de cristales de proteínas y la resonancia magnética nuclear la cual requiere de incorporación de isótopos nucleares para obtener una buena resolución de la estructura proteína. A partir de estos estudios, lo que se obtiene es un mapa que contiene las coordenadas tridimensionales (es decir en cada uno de los ejes x, y, z), de cada uno de los átomos de la proteína que fueron posibles de obtener. Una vez que se cuenta con estas coordenadas, es posible visualizarlas. Este proceso se puede hacer a través de múltiples algoritmos diseñados para tal fin, muchos de ellos requieren de una licencia costosa para ser utilizados, o bien pueden ser obtenidos gratuitamente con fines académicos. En este trabajo describimos desde la obtención de la estructura tridimensional, hasta la correlación entre la estructura y la función de las proteínas, pasando por una revisión de los programas computacionales que pueden utilizarse para la visualización de estas moléculas. Finalmente hacemos énfasis en el uso de una de estas herramientas, el programa de visualización de proteínas PyMOL.

**Palabras clave:** Visualización molecular; Estructura de proteínas; Relación estructura-función; programa PyMOL.

## Semblanza del Dr. Alejandro Sosa

Nació el 26 de Septiembre del 1964 en la ciudad de México. Es Biólogo de la Facultad de Ciencias de la UNAM (1988): Realizó la maestría en Investigación Biomédica Básica (1991) y el doctorado en el mismo programa (1994). Realizó estancias posdoctorales en el departamento de *Biological Chemistry*, en *The Chicago Medical School*, de 1995 a 1996, y en el departamento de *Biochemistry and Molecular Biology*, en *The University of Chicago*, de 1996 al 2000. Actualmente labora en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina. Es miembro del sistema nacional de investigadores y su área de investigación esta orientada al análisis de los cambios conformacionales de proteínas a través del marcaje sitio específico de proteínas y diversos aspectos de la correlación entre la estructura y la función de las proteínas.

## Semblanza del Dr. Edgar Vázquez-Contreras.



El Dr. **Vázquez-Contreras** es mexicano, nacido en el D.F. Su desarrollo académico y científico se ha efectuado en su totalidad en la Universidad Nacional Autónoma de México. La preparatoria la cursó en la E.N.P. José Vasconcelos. Es Biólogo egresado de la Facultad de Ciencias; Maestro en Investigación Biomédica Básica y Doctor en Ciencias Biomédicas. Realizó una estancia posdoctoral en la Facultad de Química en el Departamento de Física y Química Teórica. Desde enero de 2001 se desarrolla como Investigador en el Instituto de Química en el Departamento de Bioquímica. Dentro de las distinciones con que ha sido premiado, se encuentran becas de la UNAM y del CONACYT; apoyo a proyectos de Investigación y apoyo a proyectos de Desarrollo Tecnológico. Durante el Doctorado, en el cual obtuvo mención honorífica, fue candidato a Investigador Nacional y actualmente es Nivel 1 del Sistema Nacional de Investigadores. Realizó una estancia de Investigación en la Universidad de Pádova en Italia. Es miembro de la cartera árbitros de varias instancias, entre las cuales se encuentra el CONACYT y diversas revistas e instituciones. El campo de investigación en el que se desenvuelve es el plegamiento, un enigmático código que lleva a las cadenas de aminoácidos sin estructura y por tanto función, a la entidad proteica tridimensional con actividad biológica. En particular la línea de investigación que cultiva está dirigida a conocer la relación de algunas de las anomalías, que pueden presentarse en la también denominada “segunda parte del código genético” y las enfermedades anómalas del plegamiento, como la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de “las vacas locas”, o en tres palabras: la agregación proteica. Los 8 artículos más recientes en que ha participado se han publicado en los últimos cuatro años. Dentro de sus publicaciones se encuentran también un capítulo en un libro especializado y la edición del libro: “El mensaje Bioquímico correspondiente a los años 2002, 2003 2004 y 2005, de hecho es el editor de la publicación electrónica de este texto (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>). Edgar ha sido miembro del comité organizador del

“Primer encuentro de jóvenes y el medio ambiente”, del “Taller de Actualización Bioquímica 2002, 2003, 2004 y 2005” y del Primer y Segundo Simposio Sobre Proteínas en México. Fue revisor de los trabajos participantes en el “primer concurso nacional para leer la ciencia desde México”. En cuanto su labor docente, imparte múltiples cursos: preuniversitarios, de licenciatura, posgrado y especialidad. Es profesor de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina desde 1996 y a partir del 2003, de un nuevo curso taller en la Facultad de Ciencias. Ha impartido múltiples seminarios y asistido a un buen número de cursos curriculares. Por ahora dirige siete tesis. En el año 2003 se realizó la publicación oficial de ***Bioquímica y Biología Molecular en Línea***, un libro electrónico gratuito que Edgar escribió sobre estas disciplinas científicas, su dirección electrónica es: <http://bq.unam.mx>. A la fecha a recibido cerca de 22,000 visitas desde el 4de septiembre del 2003.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## EL ANÁLISIS DE CONTROL DE FLUJO COMO HERRAMIENTA EN LA MANIPULACIÓN DE VÍAS METABÓLICAS

Rafael Moreno Sánchez, Emma Saavedra, David Mendoza Cózatl y Sara Rodríguez Enríquez

Instituto Nacional de Cardiología  
Departamento de Bioquímica

Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, México, D.F. 14080.  
[rafael.moreno@cardiologia.org.mx](mailto:rafael.moreno@cardiologia.org.mx); [emma\\_saavedra2002@yahoo.com](mailto:emma_saavedra2002@yahoo.com);  
[dgmcozatl@yahoo.com.mx](mailto:dgmcozatl@yahoo.com.mx); [rodsar@mail.cardiologia.org.mx](mailto:rodsar@mail.cardiologia.org.mx)

### FLUX CONTROL ANALYSIS AS A TOOL FOR METABOLIC PATHWAY MANIPULATION

#### Abstract

*Flux control analysis of a metabolic pathway allows the quantitative determination of the degree of control that a given enzyme ( $E_i$ ) exerts on flux  $J$  (i.e., flux control coefficient  $C_{E_i}^J$ ) and on the concentration of metabolites  $M$  (i.e., concentration control coefficient  $C_{E_i}^M$ ), thus substituting the misleading, qualitative concept of rate limiting steps in metabolic pathways. In addition, it helps to understand (i) the underlying reasons by which a given enzyme exerts high or low control and (ii) why the pathway control does not reside in only one enzyme ("the rate limiting step"); instead, the control is shared by several enzymes and transporters.*

*Several different experimental approaches have been developed for the determination of  $C_{E_i}^J$ . For instance, titration of flux with specific inhibitors has been used in the control analysis of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria and intact cells. Elasticity analysis is perhaps the most profusely approach used in many metabolic pathways, mainly glycolysis. This consists in the determination of the sensitivity of a given enzyme (or block of enzymes) towards the variation in the concentration of its substrates and products, under steady-state conditions of the pathway. If the enzyme activity does not significantly change with the variation in one of its ligands (low elasticity,  $\varepsilon_{E_i}^J$ ), then the enzyme, transporter or block of enzymes is close to*

saturation and, therefore, this step limits the flux (high  $C_{E_i}^J$ ). Thus, there is an inverse relationship between elasticity coefficients and flux control coefficients.

A third approach based on classical genetics, has been much less used due to its methodological complexity. This consists in the selective variation of the *in vivo* expression of a given enzyme and measuring its effect on flux, without altering the expression of the other pathway enzyme activities. Still, another approach of recent development is the mathematical modeling of metabolic pathways ("in silico Biology"), which is based on the analysis of the kinetic properties of the enzymes and transporters experimentally obtained from both purified proteins and from those contained in cellular extracts, in addition to the use of an appropriate software for data integration. One last approach consists in the in vitro reconstitution of metabolic pathways by using commercially available or recombinant enzymes, in near-physiological conditions.

Notwithstanding the experimental approach available, the main goal of the flux control analysis is to establish which enzymes and transporters exert significant flux and concentration control, and which steps do not, when the pathway is working under a variety of relevant conditions such as exposure to different temperatures, variations in the pH values or the effect of poisons conditions of oxidative stress, hormonal status or pathological states and diseases. It should be noted that once the control distribution is established, it is possible to identify the enzymes and transporters that should be modified to achieve a successful alteration of flux or concentration of a biotechnological or clinical relevant metabolite (essential amino acids and lipids, vitamins, antibiotics, glutathione).

As soon as the controlling steps are identified, it is feasible, and convenient, to determine the biochemical, cellular and genetic mechanisms involved in the high and low control exerted by respective steps. To this end, it is required the determination of the elasticity coefficients of the steps towards not only substrates and products, but also towards other possible ligands such as physiological activators and inhibitors. Moreover, it is also required to determine the kinetic properties of these steps, their sub-cellular location and intracellular concentration.

When all this information has been generated, it is highly probable that a successful manipulation of flux or metabolite concentration may be attained. Perhaps, the lack of this type of information, or reluctance to have it considered or simple ignorance, has led to the multitude of unsuccessful attempts to manipulate a metabolic pathway by following the ill-conceptualized "rate-limiting step" and the typical "trial-and error" approach of over-expressing enzymes through the Molecular Biology tools or drug-design studies in Pharmacology. One exception might be the successful over-production of several amino acids in *Corynebacterium glutamicum*.

On the other hand, there are up to date only a few examples of manipulation of flux or metabolite concentration by chemical or genetic means that is supported by the flux control analysis: the modulation of the energy metabolism in tumor cells and yeast in order to diminish the elevated cell proliferation or for enhancing the ethanol production, respectively. Strikingly, there are also some studies in which the flux control analysis has allowed the identification of the enzymes that are altered under some pathological states, and the underlying reasons why this is so.

**Keywords:** Control analysis, control structure, control coefficient, enzyme over-expression, modeling, pathway reconstitution.

---

## I. Introducción

¿Cuál podría ser la razón para desear manipular el metabolismo de un organismo, considerando que después de millones de años de evolución y selección natural este proceso celular ya se ha modificado hasta alcanzar la mejor solución posible? La respuesta a esta pregunta es obvia cuando se identifican tres grandes áreas de aplicación donde la manipulación del metabolismo sería deseable: (a) el diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades,

(b) la ingeniería genética de organismos de interés comercial y (c) la terapia de síndromes genéticos.

El diseño de fármacos fue históricamente el área donde primero se intentó modificar el metabolismo de los organismos. Cabe recordar que la administración de un fármaco tiene como objetivo primario el inhibir una vía metabólica que sea esencial, por ejemplo, en un parásito o célula cancerosa. Entonces, cualquier enzima de la vía metabólica es potencialmente un sitio de acción terapéutica. Ante la carencia de un marco teórico sólido que permitiera establecer una estrategia para el diseño racional de este tipo de compuestos, la industria farmacéutica eligió el camino de la Química Orgánica e Inorgánica mediante la modificación arbitraria y aleatoria de los intermediarios metabólicos, sustituyendo los hidrógenos por cualquier otro elemento o compuesto. Sin duda, este enfoque ha conseguido algunos éxitos en el combate de algunas enfermedades; sin embargo, los fracasos son abundantes.

Al parecer, el diseño racional de fármacos inició en la década de los 50's, cuando Hans Krebs propuso que, después de tener la descripción exacta de una vía metabólica, habría que identificar a la enzima "marcapaso" (pacemaker); es decir, la etapa que limita el flujo de la vía metabólica. Este enfoque permitía reducir considerablemente la cantidad de intermediarios que deberían ser químicamente modificados para inhibir a la enzima marcapaso, es decir solo habría que concentrarse en los sustratos, productos y efectores alostéricos de dicha enzima y no en los intermediarios de toda la vía metabólica. Los enfoques experimentales utilizados en la identificación de las enzimas marcapaso, enzimas clave, etapas limitantes o enzimas regulatorias fueron [1, 2]:

1. Inspección de la arquitectura de la vía metabólica: Por economía de la célula y para alcanzar la mayor eficiencia, el control del flujo debe residir en las enzimas ubicadas al inicio de la vía o después de una ramificación (*Enfoque teleológico*).
2. Reacciones termodinámicamente alejadas del equilibrio: Aquellas reacciones donde el cociente de la relación de acción de masas ( $K_{AM}$ ) y la constante de equilibrio de una reacción ( $K_{eq}$ ) sea mucho menor a la unidad,  $K_{AM} / K_{eq} \ll 1$  (*Enfoque termodinámico*).
3. Enzimas con las  $V_{max}$  menores en extractos celulares: La enzima clave de la vía será la que tenga la menor velocidad (*Enfoque cinético*).
4. Enzimas con cinética sigmoideal: Enzimas alostéricas o cooperativas, pues estas enzimas son susceptibles de alteración en sus propiedades cinéticas por compuestos que coordinan todo el metabolismo (NADH/NAD<sup>+</sup>; NADPH/NADP<sup>+</sup> ATP/ADP; Acetil-CoA/CoA; Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>; pH alto/pH bajo) o, al menos a dos vías metabólicas (citrato, Pi, AMP, malonil-CoA).
5. Teorema del entrecruzamiento. Comparando la concentración de intermediarios de una vía en un estado estacionario basal y otro en estado estacionario activo, la enzima que controla el flujo en el estado basal será aquella cuyo sustrato disminuya y producto aumente en concentración (sitio de entrecruzamiento en un histograma de variación en la concentración de cada intermediario) cuando el sistema cambie al estado activo.
6. Forma de la curva de inhibición del flujo metabólico: Una curva sigmoideal en la gráfica de [I] vs flujo indica que la enzima sensible al inhibidor I no controla, mientras que una curva hiperbólica indica control del flujo por la enzima susceptible al inhibidor.

## II. Sitios de control de una vía metabólica

Al identificar los sitios de una vía metabólica con al menos uno de los criterios experimentales enumerados anteriormente, los investigadores han concluido que esas enzimas y/o transportadores son las etapas limitantes del flujo metabólico.

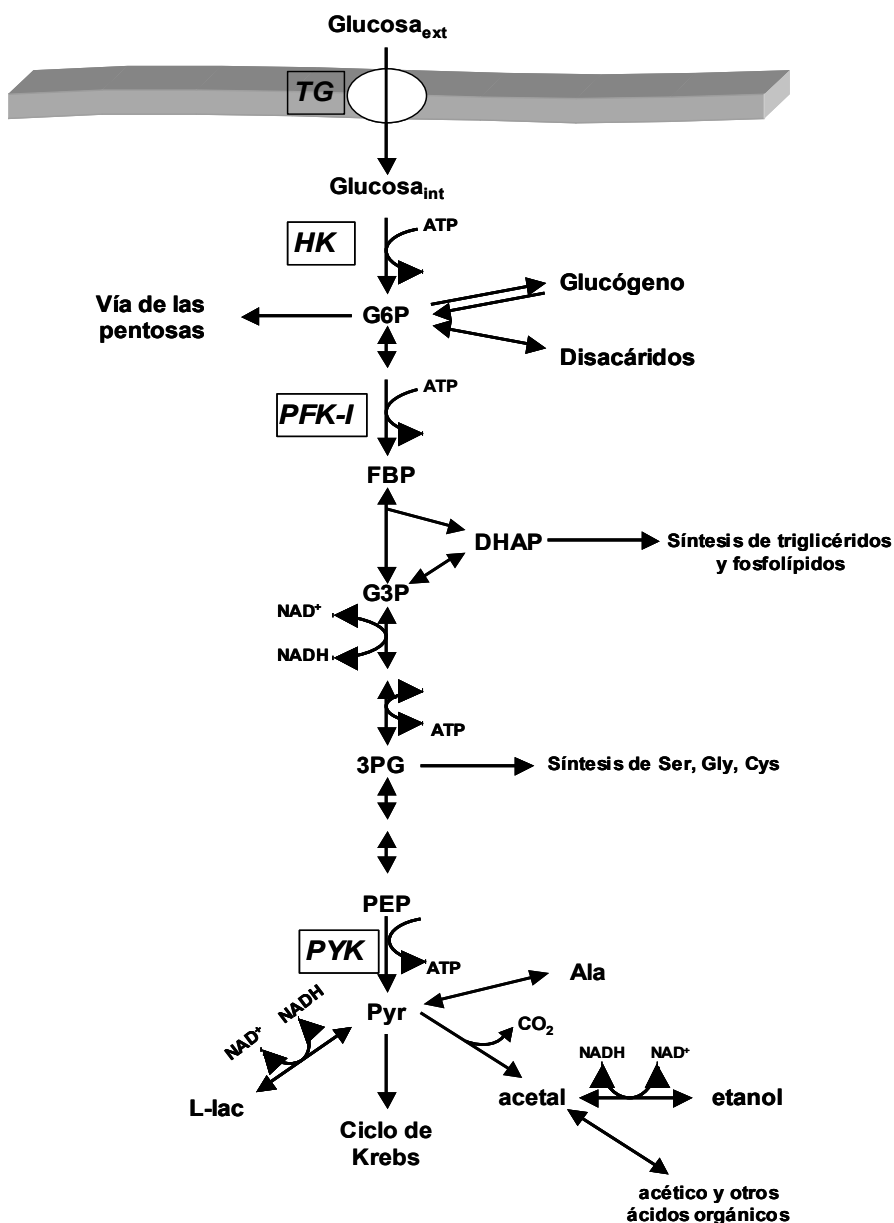
Por ejemplo, la inspección de la vía glicolítica (*enfoque teleológico*) indica que la hexocinasa (HK) y la fosfofructocinasa-I (PFK-I) (enzimas al inicio de la vía y después de una ramificación) son los sitios potenciales de control de flujo. Sin embargo, en la casi totalidad de los estudios realizados sobre el control de la glicólisis durante las décadas de los 60's, 70's y 80's, la vía se analizaba desde la HK hasta la lactato deshidrogenasa (LDH) como una vía lineal sin ramificaciones y olvidando incluir la reacción del transporte de glucosa a través de la membrana plasmática, que también involucra a una proteína o familia de proteínas las cuales junto con sus genes son susceptibles de regulación. Entonces, si la vía se considera que inicia con la glucosa extracelular, el transportador de glucosa (TG) sería otro sitio potencial de control de flujo. Si además se contemplan todas las posibles ramificaciones (Figura 1), entonces existen más sitios potenciales de control.

Aplicando a continuación los enfoques experimentales 2 y 3 (*enfoques termodinámico y cinético*), resulta que la HK y la PFK-I catalizan reacciones que en la célula viva están muy alejadas del equilibrio ( $K_{AM} / K_{eq} = 10^{-3}-10^{-4}$ ) y son, además, las enzimas más lentas de la vía. Como la piruvato cinasa (PYK) también muestra estas mismas características, diversos investigadores del área del metabolismo intermediario, incluyendo a los autores que escriben libros de texto de Bioquímica, han señalado que el control de la glicólisis radica en la HK, la PFK-1 y la PYK.

La utilización del enfoque experimental basado en la cooperatividad enzimática ha establecido que la PFK-I y la PYK son ciertamente enzimas alostéricas, mientras que la HK presenta una fuerte inhibición por producto (G6P o AMP, como análogo del ADP). A la fecha no existen inhibidores específicos de cualquiera de los 3 sitios potenciales de control, por lo cual el enfoque de titulación con inhibidores (Enfoque No. 6) no se ha podido aplicar al análisis del control de la glicólisis. Por otro lado, la aplicación del teorema del entrecruzamiento (enfoque No. 5) a la glicólisis ha permitido observar una variación muy consistente en el sustrato (F6P) y el producto (FBP) de la PFK-1. Todos estos resultados condujeron a los investigadores a proponer que para modificar el flujo glicolítico había que alterar la actividad de las etapas limitantes, es decir la HK, la PFK-1 o de la PYK.

Debido a que los enfoques experimentales utilizados son cualitativos, es difícil asignar un valor numérico al control que ejerce la etapa limitante. Por lo tanto, el concepto de etapa limitante supone que una enzima, y sólo una, controla totalmente el flujo de la vía metabólica y la concentración del producto final de la vía, asignando un valor de cero al control que ejercen el resto de las enzimas y transportadores. Sin embargo, como se analizó para la glicólisis, los investigadores comúnmente "identifican" más de una etapa limitante. En el caso de la fosforilación oxidativa (ver Figura 4), en la década de los 70's y todavía en los 80's los investigadores se dividían en aquellos que apoyaban que la citocromo c oxidasa era la etapa limitante, mientras que otros preferían al translocador de ATP/ADP o a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs sensibles a  $Ca^{2+}$  (para una revisión consultar a [3]).





**Figura 1.** La Vía Glicolítica y sus Principales Ramificaciones. TG, transportador de glucosa; HK, hexocinasa; PFK-1, fosfofructocinasa-1; G6P, glucosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1, 6-bifosfato; DHAP, dihidroxiacetonafofosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; 3PG, 3-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pyr, piruvato; PYK, piruvato cinasa; L-lac, L-lactato; acetal, acetaldehído. *S. cerevisiae* carece del gene para la LDH (lactato deshidrogenasa). Las lactobacterias poseen los genes de la PDC (piruvato descarboxilasa), la ADH (alcohol deshidrogenasa) y la LDH.

Volviendo a la pregunta inicial ¿Cuál sería el objetivo de manipular una vía metabólica como la glicólisis, sabiendo que su distribución entre los seres vivos es universal? Las reacciones de la glicólisis son casi idénticas en todos los organismos, y las enzimas que catalizan estas reacciones están altamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva (su secuencia de aminoácidos es similar). Los genes de las 12 enzimas glicolíticas en mamíferos no están adyacentes y se encuentran dispersos en el genoma, generalmente en diferentes cromosomas, mientras que en bacterias, varios genes de las enzimas glicolíticas se encuentran agrupados en operones [4]. Sin embargo, también existen organismos (como algunos parásitos de humanos) que contienen enzimas con diferencias notables en la selectividad por los sustratos, en su capacidad catalítica, en su estabilidad y en su estructura oligomérica, en el control genético de su expresión o aún más, que catalizan reacciones similares a las enzimas glicolíticas típicas pero no están relacionadas cinética o estructuralmente.

En el otro extremo de este análisis, considérese que algunos productos de la glicólisis son de gran interés comercial tales como el etanol para la fabricación de vinos, cerveza y otras bebidas alcohólicas, el CO<sub>2</sub> para la fabricación de pan, y el ácido láctico y otros ácidos orgánicos para la fabricación de quesos. Entonces, en este caso, convendría acelerar el flujo de la vía para acortar el tiempo de procesamiento y también sería deseable incrementar la concentración final del metabolito para obtener productos comerciales más robustos. En este sentido cabe notar que el análisis del metabolismo intermediario ha demostrado que las vías metabólicas naturalmente están diseñadas para alterar flujos con un mínimo impacto en la concentración de intermediarios. Por ejemplo, el flujo de la glicólisis en músculo esquelético puede aumentar más de 100 veces de un estado de reposo a uno activo, sin mostrar grandes cambios en los intermediarios. Resulta entonces, en apariencia, menos complejo alterar un flujo metabólico y la producción del metabolito final de la vía, que lograr variar las concentraciones de los intermediarios [2]. Sin embargo, más adelante veremos que con un adecuado análisis de control del metabolismo, podemos diseñar estrategias para alterar tanto flujos como concentraciones de intermediarios.

### **III. Experimentos de sobre-expresión de enzimas *in vivo***

#### **IIIa. Glicólisis en levaduras**

Cuando el desarrollo metodológico de la ingeniería genética permitió aumentar la expresión de una enzima en la célula, los investigadores recurrieron al concepto de la etapa limitante para manipular una vía metabólica con el propósito de incrementar el flujo de la vía y/o sus intermediarios. Históricamente, Heinisch [5] en Alemania fue quien inicialmente consiguió sobre-expresar 3.5 veces a la PFK-1 en *S. cerevisiae*, pero observó de manera sorpresiva que el flujo en dirección a la producción de etanol no se modificaba.

Otros intentos posteriores para aumentar la velocidad de producción de etanol tampoco han sido exitosos. No solo se ha sobre-expresado a cada una de las enzimas supuestamente limitantes de la glicólisis (HK, PFK-I, PYK), sino también a combinaciones de éstas y del resto de la vía (Tabla 1). En ninguno de estos estudios se ha logrado incrementar de manera notable la producción de etanol y, en algunos casos, se ha observado más bien una ligera disminución. Por ejemplo, la sobre-expresión simultánea de 7 enzimas de la parte final de la vía solo estimuló en 21% la producción de etanol después de 2 h de cultivo (Tabla 1). Cabe señalar que la sobre-expresión de todas estas enzimas ocasionó una ligera disminución (10-20%) en la expresión de PFK-1, lo cual podría haber atenuado el aumento en el flujo.

**Tabla 1.** Sobre-expresión de enzimas glicolíticas en la levadura *S. cerevisiae*

Enzima	Actividad (Veces de sobre-expresión)	Flujo a etanol (%Control)	Referencia
HK	13.9	107	[9]
PFK-I	3.7	102	[9]
PYK	8.6	107	[9]
PDC	3.7	85	[9]
ADH	4.8	89	[9]
PFK-I + PYK	5.6 + 1.3	107	[9]
GAPDH + PGK + PGAM + ENO + PYK + PDC + ADH	1.4 + 1.7 + 16 + 4 + 10.4 + 1.08 + 1.4	121	[7]
GAPDH + PGK + PGAM + ENO + PYK + PDC + ADH	1.5 + 1.4 + 3.4 + 1.5 + 2.5 + 1.1 + 1.2	94	[10]

Davies y Brindle [6] sobre-expresaron 5 veces a la PFK-1 en la levadura, pero tampoco lograron aumentar la producción de etanol en condiciones anaeróbicas, aunque sí se observó un ligero aumento del flujo a etanol en células en reposo en condiciones aeróbicas, durante la cual, la contribución del metabolismo mitocondrial al suministro de ATP es mayor que en células en crecimiento activo, en las cuales la glicólisis es suficiente para cubrir la demanda de ATP. En todos estos trabajos se puede detectar que la sobre-expresión de las enzimas *in vivo* afecta la concentración de los intermediarios de la vía, pero este efecto no se ha explorado.

Debido a que los genes que codifican para las enzimas de la glicólisis se inducen cuando la levadura se expone a glucosa (los genes de la PDC y ENO aumentan su expresión 20 veces; los de la PGK, la PYK y la ADH entre 3 a 10 veces, y el resto alrededor de 2 veces) [4, 7], cabe suponer que la sobre-expresión simultánea de varios genes de las enzimas de la vía habría tenido éxito para incrementar el flujo. Los genes de las enzimas glicolíticas en animales se regulan coordinada e individualmente por factores de transcripción de respuesta a hipoxia tales como el HIF-1 $\alpha$  (del Inglés hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) y los MREs (del Inglés metal response elements). El HIF-1 $\alpha$  es probablemente el coordinador principal de la inducción de genes. Los genes de enzimas glicolíticas con sitios de unión para HIF-1 $\alpha$  incluyen a la HK, PFK-1, ALDO, GAPDH, PGK, ENO, PYK y LDH; la TPI, y tal vez la HPI y la PGAM, también se inducen por hipoxia, aunque no es claro si esto es mediado por HIF-1 $\alpha$  [4]. Si resulta metodológicamente difícil manipular los genes de una o varias enzimas glicolíticas, entonces el conocer cómo funcionan los factores de transcripción puede abrir otra manera de manipular globalmente a una vía metabólica, pues la sobre-expresión o represión con alguna de las estrategias del RNA antisentido, por ejemplo el HIF-1 $\alpha$ , provocaría aumento o disminución del flujo, respectivamente.

La glicólisis es una de las vías metabólicas que se exacerban en células cancerosas humanas y de animales. De particular interés es la observación de que al menos en el 70% de los cánceres humanos, los genes de varias enzimas glicolíticas se sobre-expresan [8]. Todos los cánceres de cerebro y sistema nervioso sobre-expresan los 11 genes de las enzimas glicolíticas (de HK a LDH), pero aparentemente no se sobre-expresa el gene del transportador de glucosa 1 (GLUT-1). Los cánceres de próstata y de nódulos linfáticos (linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin,

mielomas) sobre-expresan 10 de los genes, excepto el de la HK; GLUT-1 también se sobre-expresa en cáncer de próstata. Un segundo grupo de cánceres sobre-expresa 6-8 genes de la glicólisis (piel, riñón, estómago, testículos, pulmón, hígado, placenta, páncreas, útero, ovario, ojo, cabeza, cuello y glándula mamaria). En un tercer grupo estarían los cánceres que sobre-expresan solo 1 ó 2 genes de la glicólisis (hueso, médula osea, cervix y cartílago) [8]. Tal vez en un futuro inmediato, los investigadores de esta área también exploren en los bancos de genes la posible sobre-expresión en células cancerosas de los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$  y MREs.

Sin embargo, es conveniente recordar que el aumento en la expresión génica, es decir en el nivel de RNA mensajero, en la mayoría de los casos puede no ser directamente proporcional a la cantidad de proteína ni mucho menos a la actividad de la enzima. En cambio, al menos para *S. cerevisiae* y músculo esquelético cuando se exponen a anaerobiosis, la cantidad de las enzimas glicolíticas sí guarda relación con el nivel de expresión génica, pues en la levadura éstas pueden aumentar hasta alcanzar más del 50 % del total de proteínas, mientras que en el músculo hay un aumento generalizado de 3 a 5 veces en la cantidad de las enzimas glicolíticas y el transportador de glucosa GLUT-1, y la cantidad de enzimas glicolíticas puede llegar a un 20 % del total de proteína soluble [4].

Conviene enfatizar que los experimentos de la Tabla 1 todavía no reproducen fielmente la situación fisiológica, en la cual habría que ensayar la sobre-expresión de todas las enzimas de la vía en las proporciones observadas (o al menos de aquellas que ejercen el mayor control de flujo; ver más adelante) y que están ubicadas tanto al principio como en medio y al final de la vía. El razonamiento detrás de esta propuesta es que cuando se sobre-expresa solamente a una de las enzimas "limitantes", el control se redistribuye entre las demás enzimas de la vía, y en esta nueva condición, el control de flujo recaerá en otra u otras enzimas que ahora se han convertido en "limitantes".

Además de *S. cerevisiae*, también se han sobre-expresado algunas enzimas glicolíticas en *E. coli* [11, 12], lactobacterias [13], jitomate [14], papa [15], y en ovario de hamster [16], pero tampoco se ha logrado aumentar el flujo. Es preocupante que los investigadores que han sobre-expresado enzimas glicolíticas no hayan considerado que la inhibición por glucosa-6P (o por trehalosa-6P en *S. cerevisiae*) de la HK o por citrato de la PFK-I no va a desaparecer, sino más bien estos mecanismos de regulación se van a exacerbar con la sobre-expresión de estas enzimas. Entonces, ¿para qué generar células transformadas que sobre-expresan HK, PFK-I o alguna otra enzima con fuerte inhibición por producto o alostérica, si estas enzimas van a estar más inhibidas que en las células no-transformadas?

Una interesante excepción a esta multitud de experimentos fallidos de sobre-expresión de enzimas glicolíticas se presentó en cultivos primarios de hepatocitos de rata [17]. La HK tipo I y la glucocinasa (GK) se sobre-expresaron usando adenovirus como acarreadores y los hepatocitos transformados exhibieron mayores niveles de actividad de 18.7 (HK) y 7.1 (GK) veces a 3 mM glucosa y de 6.3 (HK) y 7.1 (GK) veces a 20 mM glucosa. Sin embargo, el flujo hacia lactato con 20 mM glucosa no se modificó en las células transformadas con HK, al igual que en los experimentos descritos en los párrafos anteriores. En cambio, con la sobre-expresión de GK se observó un aumento de 3 veces en el flujo a lactato. La diferencia mecánica es la fuerte inhibición por producto (glucosa-6P) sobre la HK (con 10 mM glucosa-6P, la HK se inhibe alrededor del 90%), mientras que la GK no presenta este tipo de inhibición.

### **IIIb. Glicólisis en lactobacterias**

*Lactococcus lactis* es la bacteria utilizada en la fabricación de quesos. Para este propósito la bacteria fermenta a la lactosa a través de la glicólisis hasta ácido láctico. La acidificación del medio externo por la expulsión de lactato y  $H^+$  contribuye a la textura y sabor de los quesos e inhibe el crecimiento de otras especies bacterianas. Al igual que en la levadura, en lactobacterias la escasez de la fuente de carbono ocasiona un cambio en el metabolismo que conduce a la formación de ácido fórmico, acético, etanol y en menor proporción L-láctico, un evento que puede alterar la calidad del producto comestible. Desde la perspectiva comercial, no parece ser tan importante conocer quienes controlan el flujo a lactato (ya que su velocidad de producción es adecuada para la industria) sino la velocidad de las ramificaciones o fugas.

Para comprender este proceso y eventualmente poder manipular la producción de los ácidos secundarios, Andersen y cols. [18] fabricaron mutantes de la LDH. En células carentes de esta enzima, la mayoría del piruvato se convertía en fórmico y acético (ver Figura 1). El flujo a L-láctico solo se afectó al generar una mutante con 10% de LDH, por lo cual los autores concluyeron que la LDH no controlaba el flujo glicolítico, pero que un contenido normal de la enzima (100% de LDH) evitaba que el flujo de la vía se desviara hacia los ácidos secundarios. Al igual que en levadura, la sobre-expresión de la PFK-1, la PYK o la GAPDH tampoco aumentó el flujo a L-láctico [13].

Un resultado interesante de los estudios de optimización metabólica propuesta por Jensen y su grupo en Dinamarca [19] es que cuando el flujo glicolítico está por debajo de su capacidad máxima, el control de flujo parece recaer en los procesos que consumen ATP (demanda de ATP), mientras que en condiciones en que la velocidad de glicólisis es alta, el transporte de glucosa o la salida del producto (lactato y/o  $H^+$ ) son los que probablemente tienen el mayor control. Esto implica que el control puede recaer fuera de las enzimas propias de la vía [19, 20], lo cual apoya experimentalmente la idea propuesta años antes por Hofmeyr y Cornish-Bowden [21] de que la demanda del metabolito final de una vía, generalmente no considerada durante el estudio del metabolismo por estar estrictamente fuera de ella, puede ser esencial en el control de esa vía metabólica.

### **IIIc. Síntesis de glutatión y fitoquelatinas en plantas**

En la mayoría de los organismos el glutatión ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly; GSH) es el tiol no proteico mas abundante dentro de las células (1-10 mM). El GSH cumple con varias funciones en la célula viva, por ejemplo, está involucrado en el manejo del estrés oxidativo, en la destoxicación de xenobióticos y, en el caso de plantas y algunas levaduras, participa en la inactivación de metales pesados tóxicos (para una revisión reciente ver [22]). La descripción de la biosíntesis del GSH, como una primera etapa esencial que conduzca eventualmente a la manipulación de su metabolismo, solo ha considerado a la fecha las reacciones propiamente de su síntesis, sin contemplar a las reacciones posteriores que consumen al GSH (ver Figura 2) [22]. Además de ser un análisis incompleto de la vía, que conduce a conclusiones erróneas sobre el control de flujo, el no considerar las reacciones consumidoras de los productos finales de una vía metabólica impide establecer un verdadero estado estacionario con un flujo constante y estable [21].

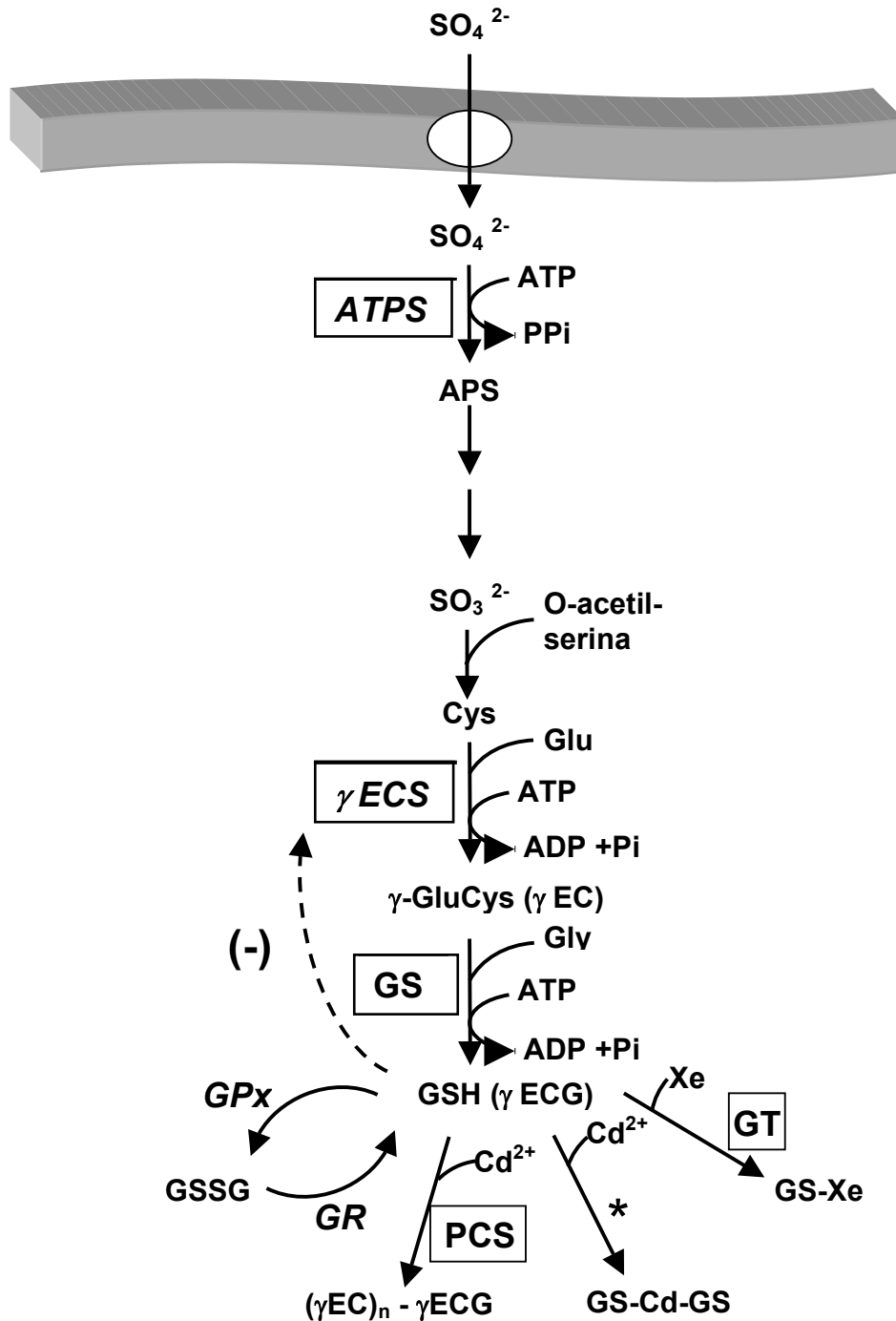
Las enzimas responsables de la síntesis de GSH son la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) y la glutatión sintetasa (GS) (Figura 2), las cuales catalizan reacciones con constantes de equilibrio muy grandes ( $K_{eq} > 1000$ ). Entonces, cuando la demanda de GSH es baja (en

condiciones no estresantes), el bloque de enzimas que produce GSH tiene que recibir información del final de la vía para (i) evitar la acumulación excesiva y tóxica del intermediario ( $\gamma$ -EC) y para (ii) alcanzar un estado estacionario estable [23]. El requerimiento de transferencia de información lo provee la fuerte inhibición de la  $\gamma$ -ECS por GSH, inhibición de tipo competitiva respecto al glutámico [24]. El GSH y la Cys también ejercen modulación de la ATP sulfurilasa (ATPS) y de algunos de los transportadores de sulfato en la vía de síntesis de Cys, previa a la síntesis de GSH (para una revisión ver 22). La existencia del mecanismo de retro-inhibición de la  $\gamma$ -ECS ha conducido a varios investigadores a proponer que esta enzima es la etapa limitante de la síntesis de GSH [24- 26]. Aunque se carece de información sobre el comportamiento de la vía en condiciones de estrés, es decir de alta demanda de GSH, la propuesta de que la enzima clave es la  $\gamma$ -ECS se ha extrapolado acriticamente a cualquier condición ambiental tal como la exposición a metales pesados.

Con estos antecedentes, varios grupos de investigadores han buscado aumentar la velocidad de síntesis y la concentración de GSH y fitoquelatinas (FQs), con la finalidad de fortificar la capacidad de resistencia y almacenamiento de metales pesados, principalmente  $\text{Cd}^{2+}$ . El desarrollo de organismos capaces de crecer en suelos y cuerpos de agua contaminados con metales pesados y que tengan además la habilidad de acumular iones metálicos tóxicos, tiene aplicación biotecnológica en el diseño de estrategias de biorremediación. En este sentido, es deseable que los organismos que sean candidatos potenciales en la biorremediación de sistemas contaminados con metales pesados tengan:

- (a) una alta velocidad de captación del metal;
- (b) un mecanismo intracelular eficiente de inactivación y compartimentalización del metal;
- (c) un apropiado mecanismo de almacenamiento intracelular del metal;
- (d) una producción elevada de biomasa en la presencia del metal; y
- (e) adecuados sistemas de transporte entre órganos (en plantas, de la raíz al tallo y hojas, pero tal vez no hacia flor y fruto).

Para esto, los investigadores han sobre-expresado a la  $\gamma$ -ECS y otras enzimas de la vía, incluyendo la PCS (Tabla 2). Algunos de estos intentos han tenido un éxito parcial al lograr aumentar el nivel final de GSH, aunque este incremento ha sido marginal y no ha habido correspondencia entre el nivel de enzima y la concentración de GSH. Además, durante la sobre expresión de las enzimas no se han medido flujos ni los niveles de otros intermediarios importantes como las FQs o la Cys. Por otro lado, y de manera sorpresiva, la sobre- expresión de la PCS, lejos de inducir un incremento en la capacidad de resistencia y acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$ , indujo estrés oxidativo y necrosis [27]. La conclusión de este experimento fue que, ante una excesiva demanda de GSH, la concentración de GSH no era suficiente para mantener otras funciones indispensables para la célula como el manejo del estrés oxidativo y la destoxicación de xenobióticos. Por lo tanto, sin un marco teórico sólido que proporcione orientación, la sobre-expresión de una sola enzima, la supuesta etapa limitante, o de varias enzimas seleccionadas arbitrariamente (Tablas 1 y 2) no resuelve el problema de incrementar el flujo de una vía ni la concentración de intermediarios metabólicos relevantes.



**Figura 2.** Asimilación de Azufre y Síntesis de Glutatión y Fitoquelatinas en Plantas. ATPS, ATP sulfurilasa; APS, Adenosina 5'fosfosulfato,  $\gamma$ -ECS,  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa; GS, glutatión sintetasa; GPx, GSH peroxidasa; GR, GSH reductasa; PCS, fitoquelatina sintetasa; GT, GSH-S-transferasas; Xe, Xenobiótico. Las reacciones no se muestran de manera estequiométrica. La GR utiliza además como cofactor NADPH.\* La formación del complejo de GSH con  $\text{Cd}^{2+}$  (bis-glutationato de Cd) es espontánea y rápida, y no requiere catálisis enzimática. Modificado de [22].

### III d. Sobre-expresión de proteínas de otras vías metabólicas

La síntesis de triptofano en levadura es uno de los pocos ejemplos exitosos donde la sobre-expresión (alrededor de 23 veces) de 5 de los genes de la vía consiguió aumentar el flujo 9 veces [28]. La ingeniería genética también ha sido exitosa en lograr aumentar la producción de aminoácidos (Trp, Ile, Lys, Val, Thr) y de trehalosa en *Corynebacterium*, donde varias proteínas de cada una de la vías se sobre-expresan simultáneamente, pero acompañadas de mutaciones que confieren a las enzimas resistencia a la retro-inhibición [39- 44]. En estas mutantes se observa que los intermediarios se acumulan y su excreción se acelera.

**Tabla 2.** Sobre-expresión de enzimas de la síntesis de GSH y fitoquelatinas en plantas y levaduras.

Enzima sobre-expresada (Veces de actividad)	Organismo (condición experimental)	Veces de incremento en el metabolito	Referencia
ATP sulfurilasa (2.1)	Tabaco (no estrés)	2.1 [GSH]	[29]
ATP sulfurilasa (4.8)	Tabaco (no estrés)	1.3 [SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	[30]
O-acetil serina tiol liasa (2.5)	Tabaco (no estrés)	2 [Cys] 0 [GSH]	[31]
Serina acetil transferasa (> 10)	Cloroplastos de papa (no estrés)	2 [Cys] 0 [GSH]	[32]
<i>E. coli</i> GS (90)	<i>Populus tremula</i> (no estrés)	0 [GSH]	[25]
GS (3)	<i>S. cerevisiae</i> (no estrés)	0 [GSH]	[33]
<i>E. coli</i> GS (>2)	<i>Brassica juncea</i> (no estrés) <i>B. juncea</i> (+ Cd <sup>2+</sup> 100µM)	0 [GSH] 4 [GSH] <sup>a</sup>	[26]
γ-ECS ( 2.1 )	<i>S. cerevisiae</i> (no estrés)	1.3 [GSH]	[34]
<i>E. coli</i> γ-ECS (50)	<i>Populus tremula</i> (no estrés)	4.6 [GSH]	[25]
<i>E. coli</i> γ-ECS (4.9)	<i>B. juncea</i> (no estrés) <i>B. juncea</i> (+ Cd <sup>2+</sup> 200µM)	3.5 [GSH] <sup>b</sup> 1.5 [GSH] <sup>b</sup>	[35]
<i>E. coli</i> γECS (40)	Tabaco ( no estrés)	> 4 [GSH]	[36]
γ-ECS (9.1) + GS (18)	<i>S. cerevisiae</i> (no estrés)	1.8 [GSH]	[37]
PCS ( > 2 )	<i>Arabidopsis thaliana</i> (+ 85 µM Cd <sup>2+</sup> )	0 [GSH]	[27]
Transportador vacuolar de complejos FQ-Cd (> 2)	<i>S. pombe</i>	Mayor tolerancia a Cd <sup>2+</sup>	[38]

<sup>a</sup> El incremento solo fue en raíces, mientras que en el tallo no hubo efecto.

<sup>b</sup> El incremento solo fue en el tallo, mientras que en raíces no hubo efecto.



#### **IV. Teoría de control del metabolismo**

El análisis del control metabólico (MCA, por las siglas en inglés de Metabolic Control Analysis), desarrollado inicialmente por Kacser y Burns en Escocia [45, 46], y por Heinrich y Rapoport en la antigua Alemania Oriental [47, 48], establece una estructura teórica que permite explicar los resultados obtenidos a la fecha con la sobre-expresión de enzimas. Además, este análisis identifica y ayuda a diseñar estrategias experimentales que pueden conducir al mejoramiento de la característica deseada en un organismo (la hiper-acumulación de metales pesados, la producción acelerada de etanol, de CO<sub>2</sub>, de lactato o de acetato o la inhibición del flujo de una vía metabólica esencial con fines terapéuticos). A través del análisis del control metabólico es factible determinar cuantitativamente el grado de control que ejerce cada una de las enzimas de una vía sobre el flujo y sobre la concentración de cada intermediario. Para esto, este análisis provee diferentes enfoques experimentales para dirigir y orientar hacia qué es lo que tiene que medirse para establecer el porqué una enzima ejerce control significativo o nulo en una vía metabólica. La adecuada aplicación de este análisis evita embarcarse en una serie de experimentos de “ensayo y error” para tratar de identificar o manipular una conceptualmente errónea “etapa limitante”.

El análisis de control metabólico establece que para entender cómo se controla una vía, y eventualmente estar en posibilidad de manipularla, primero tiene que evaluarse la estructura de control. La estructura de control consiste del coeficiente de control de flujo ( $C_{E_i}^J$ ), que es el grado de control que ejerce una enzima  $E_i$  sobre el flujo  $J$ , el coeficiente de control de concentración ( $C_{E_i}^M$ ), que es el grado de control que ejerce una enzima  $E_i$  sobre la concentración de un intermediario metabólico  $M$ , y los coeficientes de elasticidad. Los coeficientes de control son propiedades sistémicas de la vía, que están a su vez determinados mecánicamente por los coeficientes de elasticidad ( $\varepsilon_M^{E_i}$ ), los cuales se definen como el grado de sensibilidad (cambio en velocidad) de una enzima  $E_i$  a la variación en algunos de sus ligandos: sustratos, productos o moduladores alostéricos.

El coeficiente de control de flujo se define formalmente por la siguiente ecuación

$$C_{E_i}^J = \frac{\delta J}{\delta E_i} \cdot \frac{E_o}{J_o}$$

en la cual la expresión  $\delta J / \delta E_i$  describe la variación en el flujo  $J$  cuando se realiza un cambio infinitamente pequeño en la concentración o actividad de la enzima  $E_i$ . En la práctica, se procura que los cambios en  $E_i$  sean ciertamente pequeños, pero que produzcan cambios en  $J$  que sean detectables. Una variación significativa en  $J$  promovida por un cambio relativamente bajo de  $E_i$  indica que esta enzima ejerce control elevado del flujo (Figura 3, posición 1). Una variación baja en  $J$  a pesar de un cambio grande en  $E_i$ , indica que la enzima no ejerce control de flujo (Figura 3, posición 2). Para generar valores de  $C_{E_i}^J$  adimensionales y normalizados se aplica la expresión escalar  $E_o/J_o$ , que es la relación de valores iniciales a partir de los cuales se calcula la pendiente  $\delta J/\delta E_i$ .

La suma de los  $C_{E_i}^J$  de una vía metabólica es igual a la unidad (*teorema de la sumatoria*). El MCA establece una clara distinción entre el control que ejerce una enzima sobre el flujo (coef. de control de flujo) y el control que ejerce la misma enzima sobre la concentración de un metabolito (coef. de control de concentración,  $C_{E_i}^M$ ). Una enzima entonces puede estar directamente

relacionada con el control del flujo sin tener nada que ver con la concentración de un metabolito. Esta distinción es de suma importancia para la biotecnología, pues hasta ahora, el concepto de etapa limitante no distingue entre ambas propiedades y antes de iniciar un diseño experimental se debe tener claro cual es el objetivo, incrementar el flujo y la concentración del metabolito final de la vía o incrementar un intermediario de la vía. Como puede suponerse, cada enfoque requiere de un diseño experimental distinto.

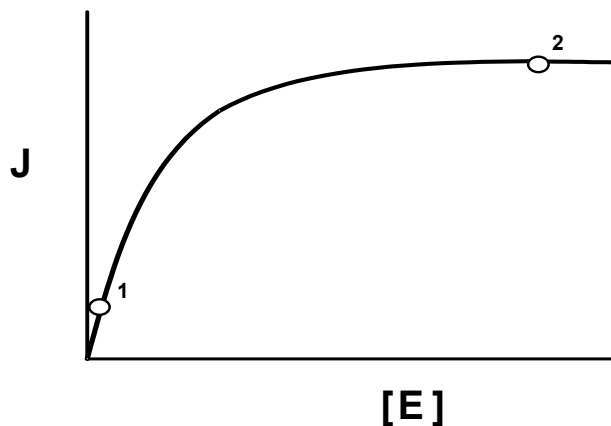


Figura 3. Determinación Experimental del Coeficiente de Control de Flujo.

Para determinar el grado de control que una enzima ejerce sobre el flujo de una vía metabólica se requiere realizar variaciones pequeñas en la cantidad, o de preferencia, en la actividad de la enzima y medir cuánto cambia el flujo. Los datos obtenidos se grafican como se indica en la figura 3 y se calcula la pendiente a partir de las coordenadas ( $E_o/J_o$ ), que es el estado de referencia. Este experimento, aparentemente sencillo, ha exigido de los investigadores un gran esfuerzo intelectual y experimental, pues nótese que sólo debe variarse a  $E_i$ , pero no alterar al resto del sistema. De esta manera, para evaluar la distribución de control de flujo a la fecha se han diseñado las siguientes estrategias experimentales para determinar  $C_{E_i}^J$ :

1. Formación de heterocariontes y heterocigotos
2. Titulación (bloqueo gradual) con inhibidores específicos
3. Análisis de elasticidades
4. Modelaje matemático
5. Reconstrucción *in vitro* de la vía
6. Supresión de la expresión génica con RNA antisentido.

#### IV.1. Genética Mendeliana Clásica

El primer estudio experimental para determinar los coeficientes de control de flujo de una vía metabólica se realizó con la biosíntesis de arginina en *Neurospora crassa* por el grupo de Kacser [49]. Este hongo forma micelios que carecen de pared celular entre las células facilitando que se generen células poliploides. Al cruzar diferentes proporciones de esporas de cepas silvestres y cepas mutantes en varias de las enzimas de la vía, se forman micelios con diferentes contenidos de enzimas normales y enzimas mutantes, es decir células heterocariontes. Estos autores generaron gráficas como aquella de la figura 3 para cuatro de las enzimas de la vía: la acetil-ornitina aminotransferasa, la ornitina transcarbamilasa, la arginino-succinato sintetasa y la

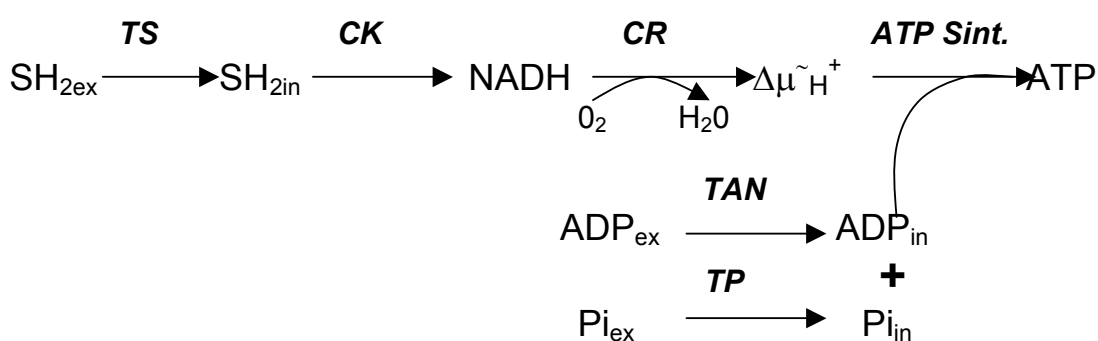
arginino-succinato liasa. Los puntos experimentales de los heterocariontes se agruparon alrededor de la posición 2 de la figura 3, por lo cual los autores concluyeron que ninguna de estas enzimas ejercía control significativo sobre la velocidad de síntesis de arginina, con valores de  $C_{Ei}^{JArg}$  de 0.02 a 0.2, es decir con grados de control solamente de 2 a un 20%. Estos autores no determinaron la localización del control de flujo restante (~75%), pero este podría residir en la carbamil-fosfato sintetasa I (isoenzima mitocondrial dependiente de amonio que se puede asociar a la membrana o formar complejos con la ornitina transcarbamilasa [50, 51]) y en el transportador mitocondrial de citrulina/ornitina, sitios que se han señalado también como etapas limitantes [52, 53] o en la demanda de arginina para la síntesis de proteínas.

En organismos que contengan varios alelos de una enzima, se pueden formar diferentes homo- y heterocigotos que expresan diferentes niveles de actividad. En *Drosophila melanogaster* existen 3 alelos de la ADH que codifican para isoenzimas con diferentes  $V_{max}$ . Al generar a los 3 homocigotos naturales y una mutante nula junto con algunos heterocigotos, se obtuvieron diferentes actividades de la ADH, pero la velocidad de consumo de etanol no se alteró (Figura 3, posición 2), por lo cual se concluyó que el control de flujo de la ADH era cercano a cero [54].

#### IV.2. Titulación con Inhibidores. Control de la Fosforilación Oxidativa

La fosforilación oxidativa (FO) es la única vía metabólica en donde se dispone de inhibidores específicos para la mayoría de las enzimas y transportadores (Figura 4). Aplicando concentraciones crecientes de cada inhibidor, es decir titulando el flujo (síntesis de ATP) se pueden generar gráficas similares a la de la figura 3, en las cuales, a mayor inhibidor hay menos enzima activa (ver Figura 5). Por lo tanto, solo en la FO se ha logrado determinar el coeficiente de control de flujo de varias de las enzimas y transportadores mediante el uso de inhibidores (Tabla 3).

La FO se divide en 2 bloques (Figura 4): el sistema oxidativo (**SO**) constituido por los transportadores de sustratos (piruvato, 2-oxoglutarato, glutamato, glutamato/aspartato, dicarboxilatos), las enzimas del ciclo de Krebs y los complejos óxido-reductores de la cadena respiratoria. El sistema fosforilante (**SF**) está compuesto por los transportadores de ATP/ADP y de Pi y por la ATP sintetasa. El gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) interconecta ambos bloques de enzimas.



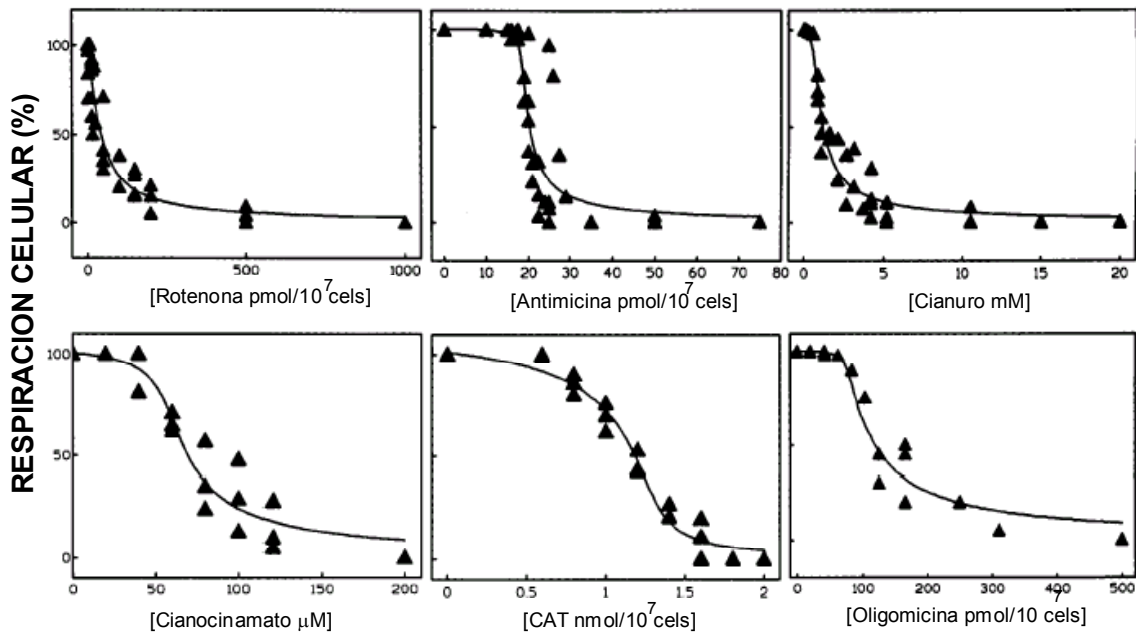
**Figura 4.** La Fosforilación Oxidativa Mitocondrial. **TS**, transportador de sustrato oxidable; **CK**, ciclo de Krebs; **CR**, cadena respiratoria;  $\Delta\mu_{H^+}$ , gradiente electroquímico de  $H^+$  o fuerza protomotriz; **TAN**, transportador de adenín-nucleótidos; **TP**, transportador de fosfato (Pi); **ATP Sint.**, ATP sintetasa.

**Tabla 3.** Distribución de Control de la Fosforilación Oxidativa.

ENZIMA	$C_{Ej}^{JATP}$	Órgano de Origen de las Mitochondrias de Rata	Inhibidor específico	Mecanismo de Inhibición	Referencia
NADH-CoQ Oxido-Reductasa (Sitio 1 de conservación de energía o Complejo 1 de la Cadena Respiratoria)	0.15	Corazón (0.5 mM Pyr + 0.2 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )			[55]
	0.26	Corazón (10 mM Pyr + 10 mM Mal)			[57]
	0.31	Riñón (0.5 mM Pyr + 0.2 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )			[55]
	0.06	Riñón (10 mM Pyr + 10 mM Mal)			[57]
	0.06-0.10	Cerebro (0.5mM Pyr + 0.4 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )	Rotenona	No-competitivo fuertemente unido	[58]
	0.25	Cerebro (10 mM Pyr + 10 mM Mal)			[57]
	0	Tumor (10 mM Glut + 3 mM Mal)			[59]
	0.27	Hígado (10 mM Pyr + 10 mM Mal)			[57]
CoQ-citocromo c Oxido-Reductasa (Sitio 2 de conservación de energía o Complejo 3 de la Cadena Respiratoria)	0.13	Músculo Esquelético (10 mM Pyr + 10 mM Mal)			[57]
	0.01	Corazón			[55]
	0.19	Corazón			[57]
	0.02	Riñón			[57]
	0.05-0.11	Cerebro			[58]
	0.02	Cerebro			[57]
	0	Tumor	Antimicina	No-competitivo fuertemente unido	[59]
	0.43	Hígado (5 mM Succ + 1 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )			[56]
Citocromo c oxidasa (Sitio 3 de conservación de energía o Complejo IV de la Cadena Respiratoria.)	0.07	Hígado			[57]
	0.22	Músculo Esquelético			[57]
	0.11	Corazón			[55]
	0.13	Corazón			[57]
	0.04	Riñón			[57]
	0.02-0.07	Cerebro			[58]
	0.02	Cerebro			[57]
	0.04	Tumor	Cianuro o Azida	No-competitivo simple	[59]
0.23	Hígado			[56]	
0.03	Hígado			[57]	
0.20	Músculo Esquelético			[57]	

**Tabla 3.** Distribución de Control de la Fosforilación Oxidativa (continuación).

ENZIMA	$C_{Ej}^{JATP}$	Órgano de Origen de las Mitocondrias de Rata	Inhibidor específico	Mecanismo de Inhibición	Referencia
Transportador de ATP / ADP (Transportador o Acarreador o Intercambiador de Adenín-Nucleótidos o de ATP/ADP)	0.24	Corazón			[55]
	0.04	Corazón			[57]
	0	Riñón			[55]
	0.07	Riñón			[57]
	0.08	Cerebro	Carboxi-atractilósido (CAT)	No-competitivo fuertemente unido	[58]
	0.08	Cerebro			[57]
	0.60-0.70	Tumor			[59]
	0.48	Hígado			[55]
	0.01	Hígado			[56]
	0.37	Músculo Esquelético (10 mM Glut + 3 mM Mal)			[60]
	0.08	Músculo Esquelético			[57]
ATP sintasa	0.34	Corazón			[55]
	0.12	Corazón			[57]
	0.32	Riñón			[55]
	0.27	Riñón			[57]
	0.09-0.20	Cerebro	Oligomicina	No-competitivo fuertemente unido	[58]
	0.26	Cerebro			[57]
	0.28	Tumor			[59]
	0.05	Hígado			[56]
	0.20	Hígado			[57]
	0.10	Músculo Esquelético			[60]
	0.10	Músculo Esquelético			[57]
Transportador de Pi	0.15	Corazón			[55]
	0.14	Corazón			[57]
	0.43	Riñón			[55]
	0.28	Riñón			[57]
	0.13	Cerebro	Mersalil	No-competitivo simple	[58]
	0.26	Cerebro			[57]
	0	Tumor			[59]
	0.05-0.12	Hígado			[56]
	0.26	Hígado			[57]
	0.15	Musculo Esquelético			[60]
	0.08	Musculo Esquelético			[57]
Transportador de Piruvato	0.15	Corazón			[57]
	0.03	Riñón			[57]
	0.08	Cerebro	$\alpha$ - ciano-4-hidroxi-cinnamato	No-competitivo simple	[58]
	0.26	Cerebro			[57]
	0.21	Hígado			[57]
	0.20	Musculo Esquelético			[57]
Transportador de dicarboxilatos	0.05-0.14	Hígado	Malato o butil-malonato	Competitivo simple	[56]
ATPasa externa	0.40	Músculo esquelético	Adición de ATPasa purificada		[60]



**Figura 5.** Control de la Fosforilación Oxidativa en Células Tumorales. Los  $C^J$  se calcularon por análisis de regresión no-lineal utilizando la ecuación para inhibidores del tipo fuertemente pegado [64]:

$$J = \left[ \frac{n(J_0 - J_i)^2 x E^n}{C_0 x J_0 x E_0^n + [(n - C_0) x J_0 - n x J_i] x E^n} \right] + J_i$$

$$E^2 + (Kd + I - E_0) x E - Kd_x x E_0 = 0$$

donde  $J_0$  y  $J_i$  son los flujos de respiración en el sistema no inhibido ( $E=E_0$ ) y completamente inhibido ( $E=0$ ), respectivamente;  $Kd$  es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor, y  $n$  es un componente empírico que establece la relación entre la concentración de sustrato y la reacción catalizada por la enzima  $E$ . La línea sólida representa el mejor ajuste obtenido de la regresión no-lineal. Modificado de [63].

El análisis de los datos de la Tabla 3 establece claramente que la FO no se controla por una etapa limitante, sino que el control de flujo se distribuye entre varias de las enzimas y transportadores. El coeficiente de control está relacionado con la cantidad de una enzima o transportador, la cual puede variar de tejido a tejido. Tal vez podrían clasificarse como la etapa limitante de la vía a la ATP sintasa en mitocondrias del hepatoma AS-30D con un  $C_{ATP\ Sint}^{J_{ATP}}$  de 0.70 y, en menor grado, al transportador de Pi en mitocondrias de riñón [55], y al transportador de ATP/ADP junto con el complejo 3 de la cadena respiratoria en mitocondrias de hígado [56], aunque otros sitios también ejercen control significativo (Tabla 3). La distribución del control varía de tejido a tejido, pero el control principal se ubica en el sistema fosforilante (**SF**) para aquellos órganos con la más alta demanda de ATP, el corazón ( $C_{TP+TAN+ATP\ Sint.}^{J_{ATP}} = C_{SF}^{J_{ATP}} = 0.73$ ), el riñón ( $C_{SO}^{J_{ATP}} = 0.31$ ;  $C_{SF}^{J_{ATP}} = 0.75$ ) y un tumor de rápido crecimiento ( $C_{SF}^{J_{ATP}} = 0.98$ ). En cambio, el hígado ( $C_{SO}^{J_{ATP}} = 0.80$ ;  $C_{SF}^{J_{ATP}} = 0.65$ ) y el cerebro ( $C_{SO}^{J_{ATP}} = 0.35$ ;  $C_{SF}^{J_{ATP}} = 0.41$ ) son órganos que distribuyen el control de la síntesis mitocondrial de ATP entre los dos sistemas.

El músculo esquelético es un caso especial, pues por un lado Wisniewski y cols. [60] determinaron que el control de la FO se repartía entre el sistema fosforilante ( $C_{SF}^{J_{ATP}} = 0.62$ ) y el consumo externo de ATP, representado en sus experimentos por ATPasa purificada. Para Rossignol y cols. [57] el sistema oxidativo era quien ejercía el control principal en músculo esquelético ( $C_{SO}^{J_{ATP}} = 0.68$ ). Sin embargo, en los experimentos de Rossignol y cols. [57] la calidad de sus mitocondrias no fue muy alta (controles respiratorios bajos y aparentemente mal calculados, además de no indicar los valores de la relación ADP/O), su condición experimental para incubar a las mitocondrias no fue cercana a la fisiológica (10 mM piruvato, 10 mM malato, 10 mM Pi, pH 7.4 con Tris), y su análisis de las curvas de inhibición careció de rigor pues supusieron que la rotenona y la antimicina eran inhibidores irreversibles. Cabe señalar que todos los otros trabajos sobre el uso de inhibidores (Tabla 3) también adolecen de alguno de los errores mencionados, pero no todos ellos juntos.

Existen algunos inhibidores más o menos específicos para enzimas y transportadores de otras vías metabólicas, pero además de no ser totalmente específicos y afectar a otros sitios, no hay inhibidores para todos los componentes de la vía, por lo cual sólo se han empleado para determinar un solo coeficiente de control. Ejemplos de estos inhibidores son: 6-cloro-6-desoxiglucosa para el transportador de glucosa en bacterias; iodoacetato para la GAPDH; amino-oxiacetato para las aminotransferasas y la kirureninasa (síntesis de triptófano); norvalina para la ornitina transcarbamilasa; mercaptopicolinato para la PEP carboxicinasas; acetazolamida para la anhidrasa carbónica; e isobutiramida para la ADH (compilado por Fell [2]).

### Utilidad Potencial del Enfoque Experimental

Las patologías mitocondriales son un grupo heterogéneo de perturbaciones metabólicas caracterizadas por anomalías en la morfología de la mitocondria así como en el funcionamiento de la FO [61]. En los últimos 10 años, el análisis del DNA mitocondrial ha revelado que en algunas mitocondriopatías existen mutaciones bien definidas. Aunque los defectos en la FO pueden manifestarse en todos los tejidos, solo algunos de ellos se afectan; por lo tanto, la sensibilidad diferencial de los tejidos a las mutaciones mitocondriales podría relacionarse a la variación de tejido a tejido en el coeficiente de control de flujo de una enzima (Tabla 3) y también a la dependencia del tejido para el suministro de ATP entre la FO *versus* glicólisis.

Una importante característica del Análisis del Control Metabólico (MCA) es que no se restringe únicamente a enzimas; la agrupación de enzimas en bloques e inclusive de vías metabólicas nos permite determinar el grado de control que varias vías metabólicas ejercen sobre la concentración de un intermediario común como el ATP. En un análisis integral tendríamos que el corazón y el riñón, los tumores de rápido crecimiento y quizá músculo esquelético serían más susceptibles a mutaciones mitocondriales en la ATP sintetasa, que es el único sitio del sistema fosforilante con subunidades codificadas en el genoma mitocondrial. En el otro extremo, tendríamos al hígado y al cerebro, los cuales podrían ser más susceptibles a mutaciones mitocondriales en las enzimas de la cadena respiratoria. Como el cerebro es un órgano totalmente aeróbico [62] mientras que el hígado depende en un 70-80% de la fosforilación oxidativa (y un 20-30% de la glicólisis) [63], cabe suponer que el cerebro es mucho más sensible a alteraciones en el genoma mitocondrial.

La determinación de los coeficientes de control mediante la titulación con inhibidores específicos también se puede aplicar a células intactas para evaluar la distribución de control de la FO. Aquí surgen dos problemas: la presencia de la membrana plasmática restringe el acceso de inhibidores hidrofílicos a las mitocondrias tales como el carboxiatractilósido y el  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato, y algunos inhibidores lentos como la oligomicina, los cuales a pesar de ser hidrofóbicos, requieren de tiempos de incubación relativamente largos para asegurar la interacción con los sitios específicos. Estos problemas se pueden resolver incubando a las células con los inhibidores por tiempos prolongados, cuidando que la viabilidad celular no se deteriore; en este sentido, las células del hepatoma AS-30D son bastante resistentes a la manipulación mecánica [63]. Los resultados mostraron que la FO en células tumorales era controlada principalmente por el sitio 1 de la cadena respiratoria ( $C_{Sitio\ 1}^{FO} = 0.30$ ) como lo muestra la acentuada inhibición con rotenona (Figura 5), mientras que el resto de los sitios evaluados ejercía un control marginal de la vía. Para que este hallazgo tenga alguna utilidad terapéutica, habrá que determinar que el sitio 1 de la cadena respiratoria no ejerce control de la vía en las células sanas del hospedero, para que al administrar inhibidores similares a la rotenona que sean poco tóxicos, como fármacos anti-neoplásicos, no tengan efectos secundarios severos. Desafortunadamente, este tipo de experimentos con células normales tales como hepatocitos no se han realizado a la fecha.

### IV.3. Análisis de Elasticidades

La teoría de control metabólico define al coeficiente de elasticidad como

$$\varepsilon_s^{vi} = \frac{\delta v_i}{\delta S} \bullet \frac{S_0}{v_0}$$

el cual es un valor numérico adimensional que reporta la variación en la velocidad  $v$  de una enzima o transportador  $i$  en función de una variación infinitesimal en la concentración de un ligando, sea sustrato  $S$ , producto o modulador alostérico. Las elasticidades pueden tener valores positivos para metabolitos que aumentan la velocidad de la enzima o transportador (sustrato o activador) o valores negativos para los metabolitos que disminuyen la velocidad (producto o inhibidor). Una enzima que se encuentre trabajando, durante un flujo metabólico, cerca de su saturación por sustrato o producto (Figura 6,  $\varepsilon = 0$ ), no mostrará mucha sensibilidad hacia variaciones grandes en la concentración de  $S$  y por lo tanto su elasticidad será cercana a cero. En cambio, una enzima que se encuentre trabajando a una concentración de  $S$  o  $P$  por debajo del valor de la constante de Michaelis para el sustrato (la  $Km_s$ ) o para el producto (la  $Km_p$ ) (Figura 6,  $\varepsilon = 1$ ), una pequeña variación en  $S$  (o en  $P$ ) modificará substancialmente la velocidad de la enzima y por lo tanto su elasticidad será cercana a 1.

Como también lo muestra la figura 6, las elasticidades están intrínsecamente ligadas con la cinética enzimática que se maneja actualmente. De hecho, si conocemos los parámetros cinéticos de una enzima ( $Vm_f$ ,  $Vm_r$ ,  $Km_s$  y  $Km_p$ ), nosotros podemos calcular la elasticidad de una enzima a una determinada concentración de sustrato y/o producto, tal y como lo muestran las siguientes ecuaciones:



$$\varepsilon_s^v = \frac{-S/K_s}{1 + S/K_s + P/K_p} + \frac{1}{1 - \Gamma/K_{eq}}$$

para el sustrato S y

$$\varepsilon_p^v = \frac{-P/K_s}{1 + S/K_s + P/K_p} - \frac{\Gamma/K_{eq}}{1 - \Gamma/K_{eq}}$$

para el producto P, donde  $\Gamma$  es la  $K_{AM}$ , mientras que  $K_{eq}$  es la constante de equilibrio, de preferencia determinada en condiciones fisiológicas. Si conocemos la concentración intracelular de estos metabolitos, nosotros seremos capaces de determinar la elasticidad de una enzima en condiciones fisiológicas.

Debido a que una enzima con muy baja elasticidad ya no puede aumentar su velocidad, aún con variaciones grandes en la concentración de sustrato, producto o modulador alostérico (como sería el caso de la elasticidad de la HK hacia glucosa-6P o de la PFK-I hacia citrato), entonces cabe esperar que dicha enzima presente un control de flujo alto. Por otro lado, la enzima con alta elasticidad puede ajustar su velocidad a cambios en la concentración de S o P, por lo cual no frenará el flujo metabólico y entonces ejercerá un control bajo.

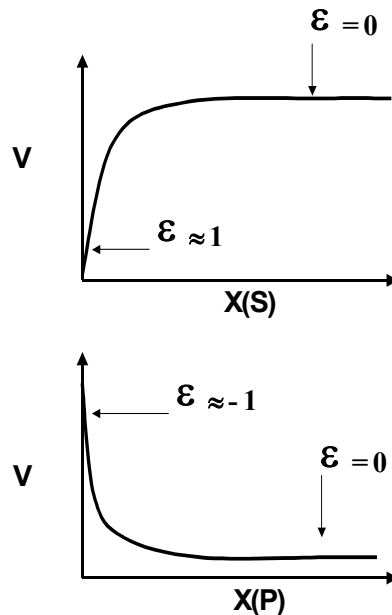
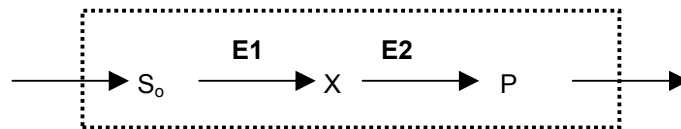


Figura 6. Definición del Coeficiente de Elasticidad

Esta relación inversa entre los coeficientes de elasticidad y los coeficientes de control de flujo tiene su expresión formal en una ecuación denominada **teorema de la conectividad**. Una vía metabólica puede dividirse en dos bloques alrededor de algún intermediario X: el bloque productor de X y el bloque consumidor, en el cual E<sub>1</sub> representa al conjunto de enzimas y transportadores que conducen a la formación de X y E<sub>2</sub> es el bloque de enzimas y transportadores que lo utilizan. Así, en este sistema de 2 bloques el teorema de la conectividad es:



$$\frac{C_{E_1}^J}{C_{E_2}^J} = - \frac{\varepsilon_X^{E_2}}{\varepsilon_X^{E_1}}$$

Observese que el signo negativo del lado derecho de la ecuación se cancela con el valor negativo de  $\varepsilon_X^{E_1}$  puesto que X es producto de E<sub>1</sub> (ver Figura 6).

Para obtener los coeficientes de control de flujo, este enfoque requiere la determinación experimental de los coeficientes de elasticidad. ¿Cómo se puede hacer esto? Los investigadores han diseñado varias estrategias, pero la más utilizada y tal vez la más confiable, consiste en variar la concentración del metabolito inicial S<sub>0</sub> para así incrementar la concentración de X (o sea, cualquier intermediario de la vía) y medir el efecto sobre el flujo final, el cual es igual a la velocidad de formación de P fuera del sistema (e. g., lactato o alcohol fuera de la célula). De esta manera se generaran gráficas del tipo mostrado en la figura 7. La pendiente en la coordenada de interés (X<sub>0</sub>, J<sub>0</sub>) equivalente a (S<sub>0</sub>, v<sub>0</sub>) proporcionará el coeficiente de elasticidad del *bloque consumidor* de X. En otro conjunto de experimentos, se puede añadir un inhibidor que bloquee a alguna o algunas enzimas ubicadas después de X. Nuevamente se determina la variación en X y en el flujo, se grafica como se indica en la figura 7 y se calcula la elasticidad del *bloque productor* de X.

A partir de la ecuación del teorema de la conectividad se pueden determinar los coeficientes de control de flujo, considerando que la suma de todos los coeficientes de control es 100% o 1 (en cantidad fraccionaria), C<sub>1</sub> + C<sub>2</sub> = 1 (por el **teorema de la sumatoria**). Así, se obtienen las siguientes ecuaciones para calcular los coeficientes de control de flujo de ambos bloques de enzimas, a partir de las elasticidades de ambos bloques:

$$C_{E_1}^J = \frac{\varepsilon_X^{E_2}}{\varepsilon_X^{E_2} - \varepsilon_X^{E_1}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$C_{E_2}^J = - \frac{\varepsilon_X^{E_1}}{\varepsilon_X^{E_2} - \varepsilon_X^{E_1}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Este método para medir los  $C_{E_i}^J$  a partir de las elasticidades de dos bloques se denominó de **dobles modulación** por Kacser y Burns [46]. Años más tarde, Brand y su grupo [65, 66] renombraron este método como “top-down approach”. Repitiendo el procedimiento mostrado en la figura 7, y usando las ecuaciones 1 y 2, para diferentes metabolitos a lo largo de la vía metabólica, se consigue identificar para una determinada situación fisiológica, cuales son los sitios que ejercen un mayor control de la vía (y que serían los sitios potenciales de utilidad terapéutica o manipulación biotecnológica) y cuáles sitios ejercen un control nulo o reducido.

Nosotros utilizamos el análisis de elasticidades para evaluar la distribución de control de la FO en células tumorales intactas [63]. Hasta ese momento, la gran mayoría de los estudios sobre este problema se habían realizado usando mitocondrias aisladas, las cuales eran incubadas en condiciones “cercanas a las fisiológicas”; sin embargo, no se consideró que el ATP, producto de la vía no se acumula en las células vivas, como ocurre en los experimentos con mitocondrias aisladas. En esta condición experimental, no se puede alcanzar un estado estacionario respecto a la concentración de ATP, como normalmente ocurre en la célula viva; por lo tanto, la distribución de control determinada en mitocondrias (ver Tabla 3) adolecía de la ausencia de un sistema consumidor de ATP. Una excepción notable a este diseño experimental incompleto fue el trabajo desarrollado por Wanders y cols. [67] con mitocondrias aisladas de hígado, pero incubadas con 2 diferentes sistemas consumidores de ATP (o sistemas regenerantes de ADP): hexocinasa + glucosa y creatina cinasa (CK) + creatina. Wanders y cols. [67] determinaron que el control de la FO se repartía entre el transportador de adenínucleótidos (TAN) y el sistema consumidor de ATP, aunque no evaluaron si efectivamente el resto de la vía no ejercía control. En consecuencia, para evaluar apropiadamente la distribución de control de esta fundamental vía metabólica, había que utilizar mitocondrias “incubadas” en su medio ambiente natural, es decir en el interior de las células.

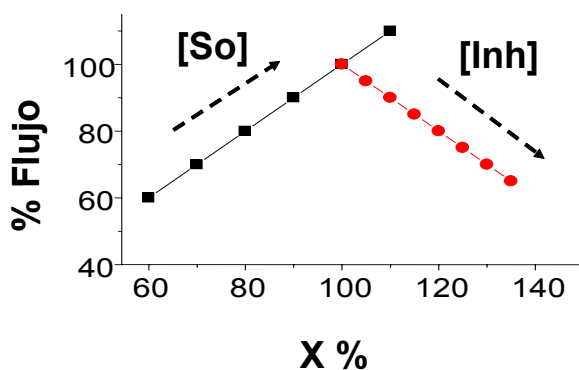


Figura 7. Determinación Experimental de los Coeficientes de Elasticidad

La FO de una célula intacta se mide como la velocidad de respiración sensible a oligomicina: en el estado estacionario, las velocidades de todas las enzimas son constantes e iguales (si no hay ramificaciones) mientras que, en vías ramificadas, la suma de los flujos ramificados es igual al flujo que alimenta a las ramificaciones. Para estimar la elasticidad de los sistemas consumidores de ATP (e. g., la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos y de otras

biomoléculas; las ATPasas de iones para mantener los gradientes iónicos; la actividad mecánica como es la contracción muscular o el movimiento de los cilios y los flagelos; la secreción de los neurotransmisores, las hormonas y las enzimas digestivas), se inhibió gradualmente a la FO con concentraciones bajas de oligomicina. Para determinar la elasticidad del bloque productor de ATP, la FO de las células tumorales se inhibió ahora con estreptomycin, un inhibidor de la síntesis de proteínas (Figura 7). Los coeficientes de elasticidad respectivos se calculan de las pendientes de cada titulación en la coordenada inicial (sin inhibidores), que es el estado fisiológico. De esta manera, se pudo determinar que el bloque consumidor de ATP ejercía un control del 34% sobre la FO, un valor que generalmente se soslayaba en experimentos con mitocondrias aisladas y remarcablemente similar a los valores de control de la HK o la CK documentados por Wanders y cols. [67] en experimentos con mitocondrias aisladas y con un sistema consumidor de ATP.

Es ahora conveniente considerar que no todos los mecanismos de control están relacionados con la cantidad de enzima activa, la cual puede ser modulada mediante síntesis o degradación de la proteína, modificación covalente o variación en la concentración de sus sustratos y productos que son componentes de la vía, sino a través de moléculas *externas* al sistema, mediante regulación alostérica o inhibición de alguna enzima (e. g., el  $\text{Ca}^{2+}$  para el caso de algunas deshidrogenasas del ciclo de Krebs; el citrato para la PFK-I; el malonil-CoA para el transportador mitocondrial de acil-carnitina/carnitina; o el sustrato inicial de la vía pero que no ha ingresado al sistema, tal como es el caso de la glucosa externa para la glicólisis). Kacser y Burns [46] propusieron que para estos casos se podría definir un coeficiente de respuesta R de la siguiente manera:

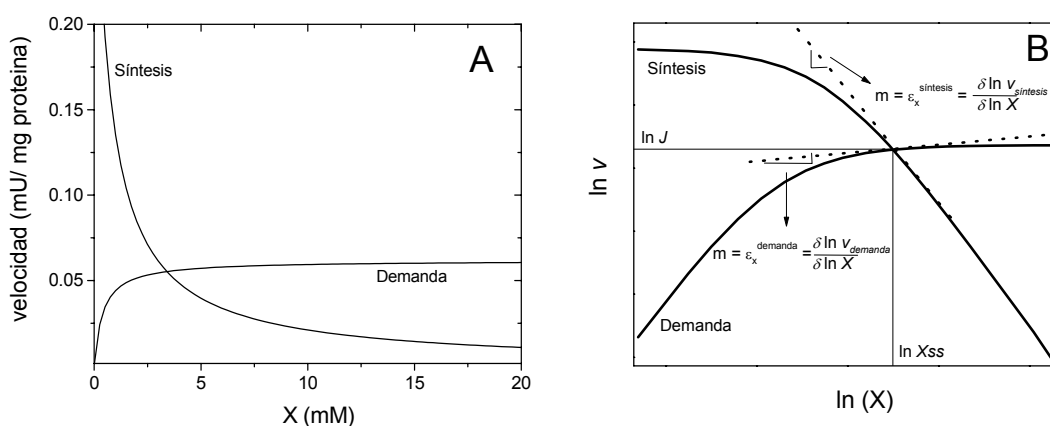
$$R_M^J = C_{E_i}^J \cdot \varepsilon_M^{E_i}$$

Entonces, otra forma de estimar el coeficiente de control de flujo es midiendo el coeficiente de respuesta  $[(\delta J/\delta M) (M_o/J_o)]$  del flujo metabólico a diferentes concentraciones de un efector externo M. Si se determina además la elasticidad de la enzima sensible al efector externo, es factible calcular el  $C_{E_i}^J$ . Desafortunadamente, debido a la complejidad experimental asociada en la determinación de los coeficientes de elasticidad, los investigadores han elegido calcular la elasticidad de manera teórica utilizando la ecuación de velocidad respectiva (e.g., la ecuación de Michaelis-Menten) y recurriendo a los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  determinados por otros investigadores en condiciones óptimas de ensayo, que en general son condiciones muy alejadas de las fisiológicas. Es conveniente enfatizar que la determinación de los coeficientes de control será más confiable si estos se calculan a partir de varios puntos experimentales (ver Figura 7) y no de uno solo, como ocurre cuando se utiliza el análisis teórico de elasticidades.

Groen y cols. [68] determinaron la distribución de control de la gluconeogénesis a partir de lactato en hepatocitos utilizando una combinación del análisis de elasticidades tanto teórico como experimental, los cuales fueron descritos en el texto y en las figuras 6 y 7, además del coeficiente de respuesta. Estos autores concluyeron que la gluconeogénesis en hepatocitos estimulados con glucágon era controlada por la piruvato carboxilasa ( $C_{PC}^{J_{glu\cos a}} = 0.83$ ); en la ausencia de la hormona, el control se distribuía entre la PC, la PYK, el segmento enolasa-PGK y el segmento TPI-fructosa-1,6-bifosfatasa.

La agrupación por bloques y el análisis de las elasticidades permite incluir a la demanda de un metabolito como un bloque más de una vía en el análisis de control. Las conclusiones de este tipo de análisis han llevado a formular una teoría que se conoce como de *suministro y demanda* (o *supply-demand* en el nombre original), la cual propone que una vía metabólica eficiente esta mayormente controlada por la demanda del metabolito [21]. Como se ha mencionado antes, la demanda generalmente no se incluye en el análisis de una vía por estar estrictamente fuera de la vía. Pero ¿Cómo estudiar el control de la síntesis de un compuesto si no consideramos su demanda fisiológica? El no incluir este bloque en el análisis supone que una vía metabólica va a producir un compuesto a la misma velocidad, no importando que la demanda del metabolito sea alta o baja; este razonamiento es obviamente erróneo, pues una vía metabólica responde a un incremento en la demanda de un compuesto, pero también a una baja demanda, sin que se acumulen grandes cantidades de intermediarios.

El análisis de bloques permite entonces dividir una vía metabólica en un bloque de síntesis y otro de demanda. El intermediario X que une a estos bloques será uno de los productos del bloque productor (e. g., piruvato, ATP o NADH para glicólisis). La variación en la velocidad de ambos bloques en respuesta a un cambio en el intermediario X se determina teórica o experimentalmente (Figura 8A). Nótese que en este enfoque no es necesario conocer la cinética de las enzimas de la vía, pues la respuesta en velocidad de cada bloque será la cinética global de todas las enzimas respecto al intermediario X. En el caso del bloque productor (*supply*), al aumentar la concentración del intermediario X, su velocidad disminuye, pues es su producto y además puede ser que una enzima dentro del bloque productor reciba información del final de la vía disminuyendo su velocidad (*feed-back inhibition*). Por otro lado, la velocidad del bloque consumidor (demand) se incrementará al aumentar X, pues este es su sustrato.



**Figura 8. (A)** Cinética del bloque productor o de síntesis (*supply*) y consumidor o de demanda (*demand*) del intermediario X. Los parámetros cinéticos corresponden a la síntesis de glutatión (GSH) en tabaco y a la cinética de la GS-transferasa de tabaco. X representa la concentración del intermediario, en este caso GSH. **(B)** Gráficas de velocidad de los bloques productor y consumidor en escala logarítmica natural.

Para apreciar el efecto de grandes cambios en la velocidad, ambas cinéticas pueden graficarse en escala logarítmica (base 10 o natural). En la figura 8B, se muestra las cinéticas de la figura 8A convertidas a logaritmo natural. El punto de intersección de ambas cinéticas representa el estado estacionario de la vía, es decir el punto donde la velocidad de producción es igual a la de consumo, por lo que el valor de la intersección representa el flujo de la vía (en el eje Y) y la concentración del intermediario (en el eje X) en el estado estacionario. Debido a que la elasticidad también se define como  $\varepsilon_X^V = [\delta \ln v] / \delta \ln X$ , la pendiente en el punto de intersección representa la elasticidad de cada bloque respecto al intermediario X. En este caso no es necesario usar el factor escalar debido a que la ecuación logarítmica ya lo ha incluido. Con las elasticidades y el teorema de la conectividad es posible calcular el coeficiente de control de flujo que cada bloque ejerce sobre la síntesis del intermediario. La figura 8B representa un ejemplo real de este análisis [69] y como se muestra, la demanda ejerce un control alto (su elasticidad es baja), mientras que el bloque de síntesis tiene un control bajo (elasticidad alta).

El hecho de que la demanda ejerza un alto control en la síntesis de un metabolito tiene al menos tres implicaciones importantes: (a) el bloque productor puede responder ante un incremento en la demanda; (b) El bloque consumidor debe tener mecanismos de transferencia de información para evitar que, ante una baja demanda, los intermediarios de la vía se acumulen sin restricción alguna, sobretudo si el bloque productor contiene enzimas con  $K_{eq}$  grandes (> 1000); (c) Si el control reside en la demanda, el bloque productor solo puede ejercer control sobre la concentración del intermediario, pero NO sobre el flujo [21, 23]. Esta última conclusión aclara el por qué es erróneo considerar que una enzima que controla el flujo, necesariamente controla la concentración de intermediarios.

En conclusión, el análisis de elasticidades por bloques en sus diferentes modalidades es el método más frecuentemente utilizado para determinar los coeficientes de control, pues no requiere del conjunto total de inhibidores específicos para todas las enzimas y transportadores de la vía, y no requiere conocer el mecanismo de inhibición o la constante de inhibición de los compuestos empleados en la doble modulación; únicamente se necesita que al afectar a una o varias enzimas de un bloque, el compuesto inhibidor ocasione una variación en la concentración del intermediario X, o variar directamente a X. Algunas otras vías cuyo control se ha evaluado por medio del análisis de elasticidades son la fotosíntesis [70], la cetogénesis [71], la síntesis de serina [72] y la glicólisis [73].

#### **IV.4. Modelaje de Vías Metabólicas**

De acuerdo a Fell [2], resulta imposible analizar las ecuaciones de velocidad de cada una de las enzimas y transportadores de una vía metabólica para establecer predicciones de cómo se va a comportar el sistema en conjunto y poder explicar el porqué de ese comportamiento. Sin embargo, en las últimas 2-3 décadas, algunos investigadores han construido modelos matemáticos de algunas vías metabólicas con la ayuda de programas de computación. De esta manera, el experimento que ha resultado tan difícil de realizar durante el desarrollo de la teoría de control metabólico, esto es, el de alterar específicamente la actividad de una sola enzima sin modificar al resto del sistema (ver Figura 3), es mucho más simple de realizarse en un modelo computacional. Los programas de computación más utilizados para el modelaje de vías metabólicas son el Gepasi (<http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/softw/gepasi.html>; [74]), MetaModel [75], el WinScamp (<http://www.cds.caltech.edu/~hsauro/Scamp/scamp.htm>;

[76]), el Jarnac (<http://www.cds.caltech.edu/~hsauro/Jarnac.htm>; [77]) y, recientemente, se diseñó el programa PySCeS (<http://pysces.sourceforge.net/>; [78]).

El modelaje de vías metabólicas es una herramienta poderosa que permite: (i) detectar características de una vía que no son obvias al examinar las propiedades cinéticas individuales de cada enzima componente y (ii) entender los mecanismos bioquímicos involucrados en el control del flujo. El modelaje requiere de la consideración cuantitativa de la multitud de datos reportados e interacciones descritas que son típicas de un sistema biológico, permitiendo así construir una visión integral de datos dispersos, descartando los hechos irrelevantes y superfluos [47]. Aunque todos los modelos son simplificaciones de la compleja realidad, son útiles para la deducción de relaciones esenciales. Además, el modelaje puede ayudar en el diseño de estrategias experimentales para la evaluación de hipótesis sobre el control de la vía metabólica y también puede ayudar en la detección de incompatibilidades en los parámetros cinéticos de las enzimas y transportadores participantes, con lo cual promueve la revisión experimental de las incertidumbres más críticas.

Existen dos tipos principales de modelaje: (1) el modelaje estructural y (2) el modelaje cinético. El primero de ellos está relacionado, como su nombre lo indica, con la estructura de la vía y no involucra información cinética. Las reacciones son manejadas en términos de su estequiometría. La información que se obtiene del modelaje estructural es: (a) la determinación estricta de qué reacciones y metabolitos están relacionados entre sí; (b) La conservación de la materia; existen metabolitos cuya suma siempre es constante o "conservada" (e. g., hexosas fosfato en la glicólisis, NADH/ NAD<sup>+</sup>, NADPH/ NADP<sup>+</sup>, ubiquinol/ubiquinona; la identificación de este tipo de intermediarios puede no ser obvia); (c) Grupos de enzimas que catalizan reacciones en una relación determinada respecto a otro grupo de enzimas; (d) Módulos elementales, los cuales se definen como el número mínimo de enzimas necesarias para alcanzar un estado estacionario y que pueden aislarse de un sistema (para una revisión sobre modelaje estructural ver [79]).

El segundo tipo de modelaje (cinético) es el más frecuentemente utilizado, para el cual se requiere, además de un programa de computadora adecuado, de conocer las estequiometrías de cada una de las reacciones en una vía, las ecuaciones cinéticas y las  $K_{eq}$  de cada reacción. Para poder alcanzar un estado estacionario, con un flujo unidireccional, necesitamos fijar la concentración del metabolito inicial de la vía, el cual va a permanecer constante durante toda la simulación y, además, necesitamos remover el producto final de la vía (ver Figura 4). Las concentraciones de los intermediarios serán calculadas a partir de la integración simultánea de cada una de las ecuaciones de la vía metabólica. A excepción de la enzima final de la vía, cuyo producto debe ser removido del sistema, todas las reacciones deben ser incluidas como reversibles, aún cuando estas posean  $K_{eq}$  muy grandes (sí fisiológicamente son irreversibles, la ecuación cinética dentro del modelo incluyendo la  $K_{eq}$  mantendrá esa reacción como irreversible). Un cuidado especial debe tenerse en incluir la sensibilidad de cada enzima hacia su producto; esta sensibilidad estará relacionada con la elasticidad de una enzima y, por lo tanto, con el grado de control que ésta ejerza sobre el flujo, por lo que la omisión de este parámetro puede conducir a conclusiones erróneas.

Una vez que se ha construido un modelo y se obtienen los resultados de la simulación, éstos rara vez coinciden con los resultados obtenidos experimentalmente, y es en este punto cuando comienza el refinamiento de un modelo. La discrepancia entre el modelo y la realidad es

lo que nos va a decir qué elementos nos faltan considerar para tener una adecuada representación de la realidad. La concentración de intermediarios obtenida experimentalmente, cotejada con los obtenidos por simulación, es una referencia adecuada para saber si, en principio, estamos simulando aceptablemente la realidad o bien, si son necesarias otras reacciones para tener un comportamiento similar a lo fisiológico.

Otras razones por las cuales los resultados de un modelo difieren de los determinados experimentalmente es que los parámetros cinéticos de todas las enzimas y los transportadores de una vía metabólica, y las  $K_{eq}$ , en la mayoría de los casos, fueron determinados por diferentes laboratorios en el mundo, en condiciones experimentales diferentes en cada uno de ellos o aún más, pueden haberse obtenido de una célula diferente a la que se desea estudiar. Además, los ensayos de cinética enzimática se realizan a concentraciones de enzima muy diluidas, las cuales son por lo general alejadas de sus valores fisiológicos y se realizan normalmente al pH óptimo de cada enzima, el cual también puede estar muy alejado del valor del pH del compartimiento de la célula cuya vía se está analizando. Así mismo, se carece de información experimental sobre la reversibilidad de la gran mayoría de las reacciones y de la inhibición de las enzimas y los transportadores por sus productos (en particular en aquellas reacciones que fisiológicamente son irreversibles o que tienen  $K_{eq}$  muy grandes). Con alarmante frecuencia, los modelos cinéticos reportados han requerido la modificación de los valores de  $V_m$  o  $K_m$  de varias enzimas y transportadores, para que el comportamiento del modelo se ajuste al comportamiento fisiológico observado. Estas limitaciones en el cuerpo de información que se requiere para construir modelos que describan lo más cercano posible el comportamiento de una vía metabólica han conducido a que hasta el momento existan pocos modelos teóricos confiables del control de vías metabólicas.

Una vez que se ha evaluado la estabilidad del modelo cinético, su robustez y sus propiedades dinámicas y estructurales, tenemos un modelo con el cual podemos estudiar las propiedades de una vía metabólica, su estructura de control, así como los efectos que tendrá el alterar cada uno de sus componentes.

La vía metabólica que se ha modelado con mayor profundidad es la glicólisis de la levadura *S. cerevisiae* [80, 81] y del parásito *Trypanosoma brucei*, causante en Africa de la enfermedad del sueño en humanos [82]. Ambos tipos celulares tienen una glicólisis muy activa, en condiciones anaeróbicas en el caso de la levadura, y en el estadio de tripomastigote para *T. brucei*, el cual depende totalmente de esta vía metabólica para generar el ATP para el trabajo celular. La ventaja de ambos modelos es que la mayoría de los parámetros cinéticos de las enzimas que se utilizaron para construir cada modelo fueron determinados experimentalmente por los mismos grupos de trabajo en las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, ambos modelos adolecen principalmente en que los autores solamente midieron las velocidades de las enzimas en uno de los sentidos y por lo tanto tuvieron que recurrir a los valores de  $K_{mP}$  reportados para las enzimas de otros tipos celulares y determinados en condiciones experimentales diferentes a las que ellos utilizaron para medir sus parámetros cinéticos; esto último también es aplicable a los valores de  $K_{eq}$  utilizados en esos modelos.

A pesar de estas consideraciones, los resultados de las simulaciones en ambos modelos arrojaron datos interesantes y relevantes con respecto a quién(es) controlan el flujo glicolítico: en ambos casos, las enzimas que tradicionalmente se considera que controlan la vía, es decir la HK, la ATP-PFK-1 y la PYK, no contribuyeron al control del flujo, mientras que el control de flujo



prácticamente se concentró en el transportador de glucosa (54% para el parásito y entre 85-100% para levadura). En *S. cerevisiae*, en ciertas condiciones la HK puede ejercer algo de control (15%) mientras que para *T. brucei*, otras enzimas glicolíticas no alostéricas como la ALDO, la GAPDH, y la PGK pueden ejercer cierto grado de control.

El análisis del control metabólico a través de la construcción de modelos matemáticos se ha aplicado a vías metabólicas como la glicólisis en eritrocitos [47], en donde el control se localizó en la HK (71%) y la PFK-1 (29%); el metabolismo de los carbohidratos durante la diferenciación en *Dictyostelium discoideum* [83], la síntesis de penicilina [84], el ciclo de Calvin [85] y la síntesis de treonina en *E. coli* [86], por citar algunos ejemplos.

Nosotros hemos recientemente modelado la biosíntesis de glutatión y FQs (ver Figura 2) para determinar y entender la estructura de control con la finalidad de identificar sitios potenciales para su manipulación genética que conduzcan a la generación de especies mejoradas en la resistencia y acumulación de metales pesados. Se construyeron modelos para plantas y para levaduras cuando están expuestos estos organismos a una concentración alta de  $Cd^{2+}$  [69]. Debido a que los resultados fueron muy similares en ambos tipos celulares, solo se muestran los resultados referentes a plantas, las cuales tendrían una aplicación biotecnológica más inmediata.

#### Utilidad Potencial del Enfoque Experimental

Una conclusión interesante del modelaje fue que se pudo identificar que la demanda es quien controla la síntesis de GSH en condiciones no estresantes y que existe además una redistribución en el control de la vía durante un incremento en la demanda de GSH (e. g., exposición a  $Cd^{2+}$ ). Estos resultados contrastan fuertemente con la idea actual de que la  $\gamma$ -ECS es la etapa limitante de la vía [24- 26]. Esta suposición ha parecido ser acertada ya que: (a) la  $\gamma$ -ECS es la que recibe la transferencia de información del final de la vía al inhibirse fuertemente por GSH y (b) la  $\gamma$ -ECS esta ubicada al inicio de la vía (ver Figura 3). Además, la GS es más abundante y eficiente que la  $\gamma$ -ECS.

Sin embargo, en el estudio del metabolismo del GSH no se había considerado a la demanda. El modelaje de la síntesis de GSH mostró que cuando la retroinhibición de la  $\gamma$ -ECS es fisiológica, es decir cuando la  $\gamma$ -ECS se encuentra parcialmente inhibida por GSH, un incremento pequeño en la demanda, incrementa el flujo hacia la síntesis de GSH. Esto se debe a que al disminuir la concentración de GSH, se atenúa la inhibición de la  $\gamma$ -ECS. Por otro lado, si la demanda es constante, un incremento en la cantidad de  $\gamma$ -ECS no tendrá efecto en el flujo debido a que ésta va a estar igualmente inhibida por GSH (como también ocurre con la sobre-expresión de la HK, que continua siendo inhibida por glucosa-6P). Sin embargo, la  $\gamma$ -ECS sí ejerce un control significativo en la concentración de GSH, por lo que a más actividad de  $\gamma$ -ECS, la concentración de GSH se incrementa. Estos resultados demuestran que la enzima que controla la concentración de un metabolito, no necesariamente controla también el flujo.

La exposición a  $Cd^{2+}$  generó una demanda excesiva de GSH y, por lo tanto, la velocidad de consumo de GSH fue más alta que en condiciones no estresantes, por lo que el control se redistribuyó casi equitativamente entre los dos bloques, específicamente en la  $\gamma$ -ECS (productor) y la PCS (consumidor). El modelaje también explicó porqué el sobre-expresar la PCS resulta tóxico para la célula. Un incremento en la demanda de GSH, durante una condición *per se* de

alta demanda, conduce a la depleción del GSH, el cual se requiere para otros procesos como control de estrés oxidativo y detoxificación de xenobióticos.

Las conclusiones obtenidas con el modelaje nos han conducido a proponer que para incrementar la resistencia y la acumulación de  $Cd^{2+}$  se deberían sobre-exresar simultáneamente la  $\gamma$ -ECS y la PCS, quienes fueron las enzimas que controlaron el flujo (Tabla 4). Este incremento en la actividad de dichas enzimas debería ocasionar una elevación significativa de la velocidad de síntesis de GSH y FQs (determinado por el coeficiente de control de flujo), así como de sus concentraciones finales (determinado por el coeficiente de control de concentración). El modelo predijo que una sobre-expresión simultánea de la  $\gamma$ -ECS y la PCS de 2.5 veces incrementaría el flujo a GSH de 0.67 a 1.61 mU/mg proteína y el flujo a FQs de 0.21 a 0.52 mU/mg proteína. Sin embargo, la sobre-expresión de los genes de estas dos enzimas no debe rebasar la actividad máxima de la GS y del transportador vacuolar del complejo FQ-Cd (o GS-Cd-GS), para no inducir un severo estrés oxidativo por depleción del GSH o aumento del  $\gamma$ -EC, así como también para evitar que aumenten a niveles tóxicos la cantidad de los complejos FQ-Cd y GS-Cd-GS en el citosol, para que estos puedan ser almacenados eficientemente en la vacuola. En plantas y levaduras, es en la vacuola donde el  $Cd^{2+}$  finalmente es inactivado por la

**Tabla 4.** Control de la síntesis de GSH y fitoquelatinas en plantas expuestas a  $Cd^{2+}$

Enzima	1x $\gamma$ -ECS + PCS				2.5x $\gamma$ -ECS + PCS			
	$C_{Ei}^{J_{GSH}}$	$C_{Ei}^{J_{FQ}}$	$C_{Ei}^{GSH}$	$C_{Ei}^{FQs}$	$C_{Ei}^{J_{GSH}}$	$C_{Ei}^{J_{FQ}}$	$C_{Ei}^{GSH}$	$C_{Ei}^{FQs}$
$\gamma$ -ECS	0.58	0.60	0.68	0.76	0.45	0.61	0.7	0.6
GS	<0.01	<0.01	0.01	0.01	0.19	<0.01	<0.01	0.97
GS-transferasa	0.01	-0.06	-0.07	-0.07	<0.01	<0.01	<-0.01	-0.05
PCS	0.4	0.44	-0.63	0.56	0.33	0.44	-0.62	0.57
Transportador de FQ-Cd en vacuolas	<0.01	<0.01	<0.01	-1.2	<0.01	<0.01	<0.01	-2.1
	Flujo (mU/mg prot)		Concentración (mM)		Flujo (mU/mg prot)		Concentración (mM)	
	<b>GS</b>	<b>PCS</b>	<b>GSH</b>	<b>FQs</b>	<b>GS</b>	<b>PCS</b>	<b>GSH</b>	<b>FQs</b>
	0.67	0.21	1	0.008	1.61	0.52	1	0.036

$C_{Ei}^{J_{GSH}}$ , coeficiente de control de la enzima  $Ei$  sobre la síntesis de GSH;  $C_{Ei}^{J_{FQ}}$ , coeficiente de control de la enzima  $Ei$  sobre la síntesis de FQs;  $C_{Ei}^{GSH}$ , coeficiente de control de la enzima  $Ei$  sobre la concentración de GSH;  $C_{Ei}^{FQs}$ , coeficiente de control de la enzima  $Ei$  sobre la concentración de FQs. Una enzima con control de flujo negativo indica que esta ubicada en una ramificación, desviando el flujo principal; una enzima con control de concentración negativo indica que el aumento en su actividad disminuye la concentración del metabolito.

adición de  $S^{2-}$  y por la subsecuente formación de complejos de alto peso molecular de fitoquelatinas con  $Cd^{2+}$ ,  $S^{2-}$  y GSH [87, 88]. En conjunto con la sobre-expresión de la  $\gamma$ -ECS y la PCS, se podría también reprimir moderadamente la expresión de la GSH-S-transferasa, la cual compite por el GSH disponible (ver Figura 3). Al disminuir la actividad de esta enzima se consigue un aumento en la concentración de GSH y en el flujo hacia la formación de FQs [69].

El análisis de control metabólico se fundamenta en cambios *infinitesimales* de la enzima o de un metabolito. En cambio, la sobre-expresión de enzimas induce grandes cambios en la actividad, de modo que se necesita desarrollar otro marco teórico para predecir el efecto de grandes cambios metabólicos, a partir de una teoría desarrollada para pequeños cambios metabólicos. Este marco teórico lo realizó inicialmente Small y Kacser [89], quienes desarrollaron una fórmula para predecir el efecto de grandes cambios en la actividad enzimática a partir de los coeficientes de control de las enzimas. La representación matemática es:

$$f_{E_{j-m}^r}^J = \frac{1}{1 - \sum_{i=j}^m (C_{E_i}^{J^o} \cdot \frac{r_i - 1}{r_i})}$$

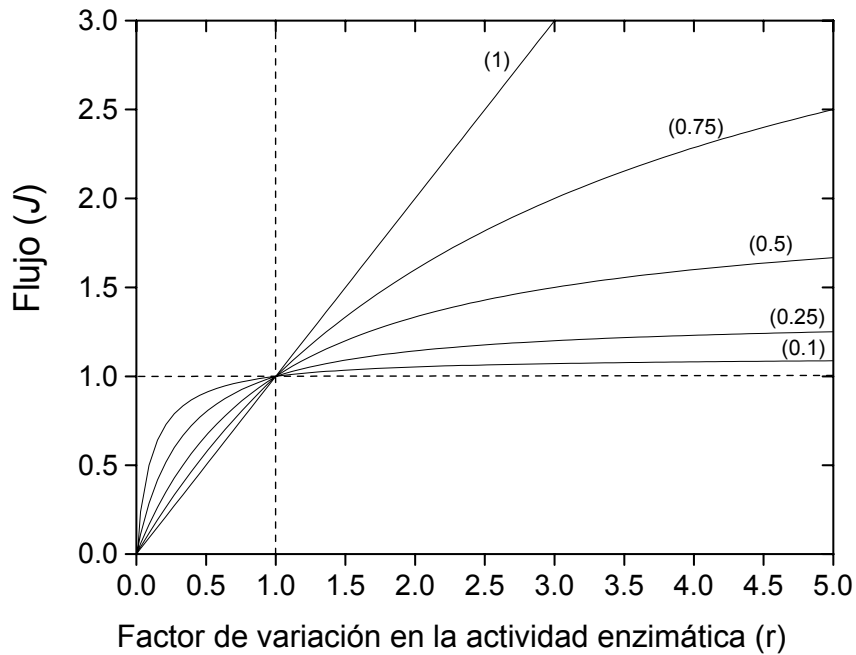
donde  $f$  es el factor de amplificación (el incremento en el flujo), y  $r$  es el número de veces por el cual se sobre-expresa cada enzima. El factor  $r$  puede no ser igual si se desea explorar el efecto en el flujo al incrementar diferencialmente dos o más enzimas con diferente coeficiente de control de flujo. Por ejemplo, supóngase que se desea sobre-expresar a dos enzimas con diferente  $C_E^J$  por el mismo factor  $r$ . En este caso, la ecuación a utilizar para predecir el cambio en el flujo sería:

$$f_{E_{j-m}^r}^J = \frac{1}{1 - (C_i^J + C_j^J) \cdot \left(\frac{r-1}{r}\right)}$$

La figura 9 muestra el efecto sobre el flujo al cambiar una (o más) enzimas con diferente  $C_E^J$  por el mismo factor. Para una o varias enzimas, cuya suma de  $C_E^J$  es menor a 0.25, el impacto en el flujo es muy discreto al incrementar su expresión 5 veces (lo cual es lo observado para la gran mayoría de los experimentos de sobre-expresión analizados en la sección II). Pero al aumentar por un factor mayor a 3 a una enzima o conjunto de enzimas cuya suma de  $C_E^J$  sea mayor de 0.5 se observará un cambio significativo en el flujo. Por último, para la enzima, o conjunto de enzimas cuyo  $C_E^J$  sea igual a 1 entonces resultará en un cambio proporcional en el flujo, respecto a la actividad enzimática.

La misma gráfica muestra el efecto sobre el flujo al disminuir la actividad de una enzima por el mismo factor  $r$  (en el tercer cuadrante). Esta gráfica es de suma utilidad si se desea inhibir el flujo de una vía metabólica con fines terapéuticos o entender las bases moleculares de la dominancia y recesividad genética. Al igual que la sobre-expresión de enzimas, solamente para aquellas enzimas cuyo  $C_E^J$  sea elevado, habrá un efecto significativo sobre el flujo cuando son

inhibidas. Una enzima o grupo de enzimas cuyo  $C_E^J$  sea igual a 0.25, requerirá ser inhibida un 80% para obtener una disminución del 50 % en el flujo de la vía metabólica.



**Figura 9.** Efecto en el flujo al variar una o varias actividades enzimáticas con diferentes coeficientes de control de flujo. La figura puede interpretarse como una enzima con un  $C_E^J$  cuyo valor está indicado entre paréntesis, modificada por un factor  $r$ , o un grupo de enzimas cuya suma de sus  $C_E^J$  es igual al valor indicado entre paréntesis, modificadas por el mismo factor  $r$ . El valor de 1 representa el valor control de referencia. Así, valores de  $r$  menores a 1 indican supresión y valores por arriba de 1 indican sobre-expresión.

El modelaje permitiría de esta manera diseñar las estrategias experimentales y de ingeniería genética adecuadas para incrementar el flujo hacia la producción del metabolito de interés, al contrario de como se ha hecho hasta el momento con resultados algo desalentadores al tratar de sobre-expresar una o dos de las enzimas de una vía y obtener pequeños incrementos en los flujos o concentraciones de metabolitos de interés. Como es razonable suponer, al sobre-expresar en la célula a la enzima "limitante", el control del flujo de la vía se redistribuye y por lo tanto, una enzima que anteriormente controlaba el flujo en menor grado, en esta nueva condición debería de incrementar su coeficiente de control.

#### **IV.5. Reconstrucción *in vitro* de las vías metabólicas**

Otro de los enfoques experimentales que se han utilizado para determinar los coeficientes de control de las enzimas ha sido a través de la reconstrucción *in vitro* de secciones de vías metabólicas. Recordemos que para determinar el coeficiente de control de una enzima funcionando en una vía específica simplemente se debe de variar la concentración de enzima sin alterar los demás componentes del sistema y medir las variaciones en el flujo correspondiente (ver Figura 3). Esto es factible de realizarse si se tiene acceso a las enzimas purificadas de las cuales se desea determinar el coeficiente de control. Además, una de las grandes ventajas de esta aproximación es que la estructura de la vía se conoce y el sistema está abierto a manipular la concentración de sus constituyentes, ensayar efectores de alguna de las enzimas, la composición del sistema es reproducible y sus componentes pueden ser analizados por separado. Por otro lado, la principal desventaja es que los ensayos se realizan a concentraciones de enzima muy diluídas por lo que la interacción entre enzimas no está favorecida. Si este es un factor determinante en el comportamiento de la vía, la reconstrucción *in vitro* puede limitar la extrapolación de resultados a la vía metabólica en el interior de la célula.

Existen relativamente pocos reportes describiendo este tipo de experimentos debido a que un requisito para la aplicación del análisis del control metabólico es que la vía analizada esté funcionando en estado estacionario. En un sistema reconstituido se pueden obtener en realidad *quasi*-estados estacionarios debido a que hay consumo neto de sustratos y cofactores y acumulación de productos en la mezcla de reacción, sin posibilidad de que halla un suministro constante de los sustratos y una salida constante de los productos.

Uno de los primeros reportes experimentales para determinar los coeficientes de control de las enzimas de la primera sección de la glicólisis en un sistema reconstituido tomó ventaja de la disponibilidad comercial de las enzimas de músculo de conejo: la HK, la HPI, la PFK-1, la ALDO, la TPI y la G3PDH [90]. Cada una de las enzimas se titularon por separado y se midió las variaciones en el flujo hacia glicerol-3-fosfato como consumo de NADH en presencia de creatina cinasa para mantener la concentración de ATP constante. Los coeficientes de control de flujo se determinaron como se muestra en la figura 3. Los resultados indicaron que en este sistema reconstituido, las enzimas que mayor controlan son la PFK-1 (65%) y la HK (20%) y que el 15% del control restante se distribuía entre las demás enzimas del sistema. Además, observaron que la presencia de un activador de la PFK-1 como la fructosa-2,6-bifosfato tiene grandes repercusiones en la redistribución del control de flujo de estas dos enzimas. Con este enfoque experimental también se demostró la validez de la teoría de la sumatoria, esto es, que la suma de los coeficientes de control de los diferentes componentes del sistema debe de ser igual a 1 [90].

Otra aproximación similar ha sido utilizado para determinar los coeficientes de control de flujo de las tres reacciones de la parte final de la glicólisis catalizadas por la PGAM, la ENO y la PYK, utilizando de nueva cuenta enzimas comerciales [91]. Los resultados de este estudio indicaron que en esta sección de la vía, la PYK es la enzima que ejerce el mayor control (60-100%), el cual, en algunas circunstancias puede compartirse con la PGAM, y que definitivamente la ENO contribuye muy poco al control.

Una de las limitaciones que tiene este tipo de estudios es que la disponibilidad comercial de enzimas purificadas de un mismo organismo es limitada a solo una o a unas pocas de ellas.

Sin embargo, con los proyectos de secuenciación de genomas, junto con la tecnología del DNA recombinante, actualmente se puede tener acceso a los genes de todas las enzimas de una vía metabólica para su posterior clonación, sobre-expresión y purificación de las enzimas. Con esta estrategia, recientemente en nuestros laboratorios hemos sobre-expresado y purificado las diez enzimas de la glicólisis del parásito *Entamoeba histolytica* con el fin de estudiar la distribución del control del flujo de la vía en este organismo desde diversos enfoques teóricos y experimentales, los cuales incluyen la reconstrucción de segmentos de la vía [92].

Los experimentos de reconstrucción en condiciones de pH, temperatura y actividad enzimática cercanas a las fisiológicas del segmento PGAM, ENO y piruvato fosfato dicinasa (PPDK, enzima que cataliza una reacción equivalente a aquella de la PYK y que no se encuentra presente en el humano) (Figura 10) indican que la PGAM es el sitio en donde principalmente recae el control de flujo (esta enzima no es homóloga a la enzima presente en mamíferos y por lo tanto tiene propiedades cinéticas diferentes), seguida por la PPDK [92]. Con esta misma estrategia hemos podido reconstruir la parte alta de la vía de HK hasta TPI y por otro lado la parte media de la vía, de ALDO a PGK. Los resultados obtenidos indican que en estas secciones de la vía, la HK y la ALDO son las enzimas que poseen el mayor porcentaje del control (Moreno-Sánchez R, Encalada R, Saavedra E, manuscrito en preparación). Estos resultados concuerdan con la comparación de las eficiencias catalíticas de las enzimas de la vía de este parásito [92] en la que la HK tiene como reguladores al AMP y al ADP, mientras que la ALDO y la PGAM son las que tienen la menor eficiencia catalítica por lo cual tienen un coeficiente de control alto y son candidatos de intervención terapéutica.

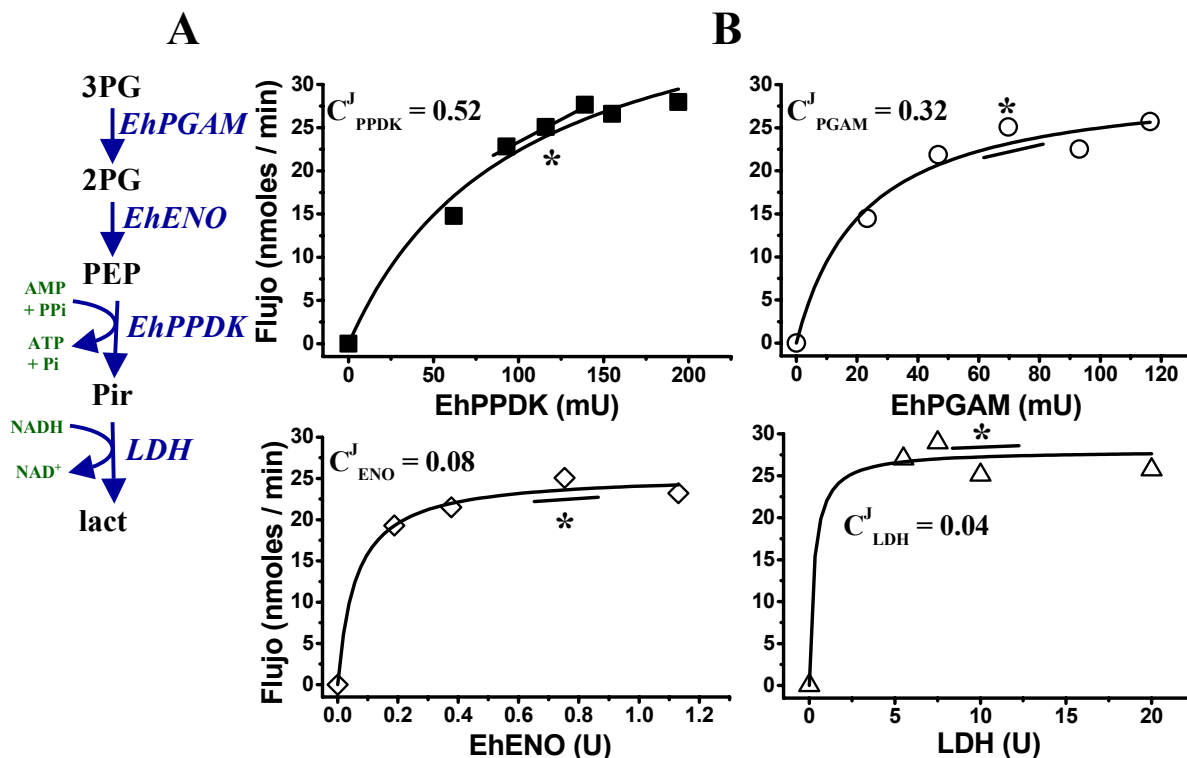
Los experimentos de reconstrucción *in vitro* de segmentos de una vía pueden ser de gran utilidad si se quieren estudiar el efecto de la modulación de una enzima y sus repercusiones en la redistribución del control y muy importante, permite identificar a aquellas enzimas que tienen mayor control para posteriormente analizarlas en detalle mediante otras estrategias experimentales tales como el análisis de elasticidades en el sistema *in vivo*.

#### **IV.6. Represión de la Expresión Genética con RNA antisentido**

Este último enfoque experimental para la determinación de los coeficientes de control podría pertenecer al enfoque Genético número 1, pero lo hemos ubicado aparte debido a que su desarrollo metodológico es reciente y a que en realidad es un enfoque que utiliza la Genética Molecular más que la Genética Mendeliana. Este enfoque se basa en la modulación *in vivo* de los niveles de una enzima a través de la tecnología del RNA antisentido. Existen por lo menos tres estrategias para inhibir específicamente la expresión de un gene: (a) el uso de oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla, los cuales se unen por complementareidad a las regiones esenciales 5' del gene para su transcripción o que forman un RNA de doble cadena susceptible de ser degradado por una RNAsa de tipo H; (b) la degradación del RNA blanco a través de oligonucleótidos catalíticamente activos, más conocidos como ribozimas, que además de unirse a su RNA específico lo cortan; y (c) la degradación del RNA a través del uso de moléculas pequeñas de RNA de 21-23 nucleótidos (siRNAs) conocido como RNA de interferencia [93].

Se aplicó la tecnología del RNA antisentido para determinar los coeficientes de control de la enzima responsable de la fijación de CO<sub>2</sub> en el ciclo de Calvin en plantas, la ribulosa bifosfato carboxilasa o Rubisco. Los resultados obtenidos por los bioquímicos de plantas hacían

suponer que la rubisco era la etapa limitante del ciclo de Calvin y de todo el proceso fotosintético, ya que ésta se encuentra en muy grandes cantidades (aproximadamente 4 mM) en el estroma de cloroplastos para compensar su relativamente baja capacidad catalítica y, además, es la enzima que en presencia de O<sub>2</sub> inicia la fotorrespiración en lugar de la fotosíntesis.



**Figura 10. Determinación de los Coeficientes de Control de las Enzimas de la Sección Final de la Glicólisis de *Entamoeba histolytica*.** A) Ensayo enzimático con las tres enzimas recombinantes de ameba: fosfoglicerato mutasa independiente del 2,3 bifosfoglicerato (PGAM); enolasa (ENO) y piruvato fosfato dicinasa (PPDK). B) El coeficiente de control se determinó en la posición marcada con el asterisco. 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; lact, lactato; LDH, lactato deshidrogenasa comercial. Modificado de [92].

Varios investigadores se enfocaron a tratar de modificar a la rubisco para mejorar su eficiencia catalítica o sobre-expresarla en plantas para hacerla no limitante con resultados poco alentadores. Sin embargo, el grupo de Stitt [94] se abocó en 1991 a determinar el  $C_{rubisco}^{J_{fotosint.}}$ . La actividad de la rubisco se redujo por debajo de los niveles normales en plantas de tabaco transformadas con DNA antisentido que al ser transcrito en las células forma un híbrido con el RNA mensajero de la subunidad pequeña de la enzima, el cual es degradado. Al menos para las enzimas del ciclo de Calvin, los efectos pleiotrópicos de la transformación fueron mínimos. Los resultados indicaron que efectivamente, la rubisco podría ser la etapa limitante de la fotosíntesis con un  $C_{rubisco}^{J_{fotosint.}}$  de 0.69-0.83 cuando las plantas se sometían a una iluminación intensa (1050  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), con alta humedad (85%) y con baja concentración de CO<sub>2</sub> (25 Pa). Sin

embargo, el valor de  $C_{\text{rubisco}}^{\text{fotosint.}}$  disminuía a 0.05-0.12 con iluminación moderada o altos niveles de  $\text{CO}_2$  [94]. Desafortunadamente, estos autores no determinaron los coeficientes de control de las otras enzimas de la vía ni tampoco indagaron si los flujos de las ramificaciones podrían ser significativos, con lo cual se podría generar un control con signo negativo que atenuaría la limitación en el flujo a través de la rubisco, aún en condiciones extremas de iluminación, humedad relativa y  $\text{CO}_2$ .

La combinación de estas dos estrategias, es decir la modulación (a través de la tecnología del RNA antisentido) de la cantidad o actividad de una enzima o transportador que tiene un coeficiente de control de flujo alto (determinado a través del análisis del control metabólico) puede tener aplicación útil en la clínica, ya sea para el tratamiento de enfermedades en las cuales alguna enzima o transportador tenga actividad excesiva y cause efectos indeseados o bien, en infecciones parasitarias de difícil tratamiento, a través de la identificación de enzimas que tengan control de flujo alto en vías metabólicas esenciales del parásito.

### Conclusiones

1. El concepto todavía frecuentemente utilizado de la enzima clave o etapa limitante de la velocidad es erróneo. El control del flujo de una vía metabólica se reparte entre varios sitios y no se ubica en una sola etapa. La Teoría de Control Metabólico o MCA permite **cuantificar** el control que ejerce una enzima sobre el flujo (coeficiente de control de flujo) y sobre la concentración de un intermediario (coeficiente de control de concentración), y explica el por qué una enzima ejerce control y otras no (coeficiente de elasticidad).
2. Una vía metabólica se puede manipular para tratar de variar la velocidad de producción del producto final (*i.e.*, el flujo) o la concentración de algún intermediario relevante. Como lo indica el escaso éxito de los experimentos de sobre-expresión de enzimas, no basta con manipular a un solo sitio (la supuesta etapa limitante) o a muchos sitios; lo más recomendable sería realizar el análisis experimental de la estructura de control de la vía metabólica previo a intentar sobre-expresar a una o a varias enzimas. La Teoría de Control Metabólico sugiere que los sitios (enzimas y transportadores) que deberán manipularse son **todos** aquellos con los coeficientes de control más altos. Por ejemplo, si de 6 enzimas, 3 muestran coeficientes de control de flujo de 0.2 o mayores y las 3 restantes de 0.1 o menores, lo más apropiado es sobre-expresar a las 3 enzimas con control alto (si se desea aumentar el flujo), o inhibir a estas 3 enzimas (si se busca bloquear el flujo), y no solamente a una de ellas. Si alguna de las enzimas seleccionadas para sobre-expresión muestra una fuerte inhibición por producto o inhibición alostérica (feedback), es probable que para aumentar el flujo no sea suficiente con la sobre-expresión de las enzimas y los transportadores con mayor control, sino también se requerirá incrementar moderadamente a las enzimas que consumen al producto o al modulador alostérico.
3. Cuando el interés del investigador radica en incrementar la concentración de algún intermediario metabólico, el cual no es el producto final de la vía, la Teoría de Control Metabólico sugiere que se sobre-expresen a aquellas enzimas ( y transportadores),



ubicadas dentro del bloque productor del metabolito, con los coeficientes de control más altos, y/o se reprima la expresión de aquellas enzimas, ubicadas dentro del bloque consumidor, con los coeficientes de control también más altos. Este tipo de manipulaciones se pueden complicar si el metabolito de interés tiene interacciones alostéricas con enzimas o transportadores (inhibición y activación: feed-back inhibition y feed-forward activation) de los bloques productor y consumidor. Recordando el resultado de sobre expresar a la PFK-I, la supuesta etapa limitante de la glicólisis, tenemos que la producción de etanol en levaduras o de lactato y acetato en lactobacterias no aumentó y hasta se observó una ligera disminución de flujo, cuando el nivel de sobre-expresión era excesivo. Sin embargo, analizando cuidadosamente estos estudios observamos que la concentración de uno de los productos de la PFK-I, la fructosa-1,6-bifosfato se eleva varias veces por arriba del nivel control. Otra estrategia sería la de abatir, mediante la introducción de mutaciones, la retroinhibición (negative feedback) en las enzimas de la vía que se ubiquen cerca del metabolito de interés.

La aplicación del análisis de control metabólico para determinar cuál o cuáles deben ser las enzimas que debe aumentarse su actividad para obtener incrementos en el flujo o en la concentración de un metabolito (en procesos de interés biotecnológico) o al contrario, para inhibir el flujo de una vía (en estudios con fines terapéuticos), requiere de contar con un marco teórico y experimental específico que difícilmente se puede conseguir en un solo laboratorio, por lo que la aplicación de este enfoque debe ser complementario a la investigación que se realiza en los laboratorios de ciencias básicas y aplicadas.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el donativo No. 43811-Q de CONACyT-México.

### Referencias

1. Newsholme EA, Start C (1973) Regulation of Metabolism. John Wiley and Sons. London.
2. Fell D (1997) Understanding the control of metabolism. Portland Press, London.
3. Moreno-Sánchez R, Torres-Márquez ME (1991) Control of oxidative phosphorylation in mitochondria, cells and tissues. *Int. J. Biochem.* 23: 1163-1174.
4. Webster KA (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp. Biol.* 206: 2911-2922
5. Heinisch J (1986) Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofructokinase in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 202: 75-82.
6. Davies SEC, Brindle KM (1992) Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 31: 4729-4735.
7. Hauf J, Zimmermann FK, Muller S (2000) Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 688-698.
8. Altenberg B, Greulich KO (2004) Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84: 1014-1020.
9. Schaaf I, Heinisch J, Zimmermann FK (1989) Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast* 5: 285-290.
10. Smits HP, Hauf J, Muller S, Hobbey TJ, Zimmermann FK, Hahn-Hagerdal B, Nielsen J, Olsson L (2000) Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16: 1325-1334.
11. Emmerling M, Bailey JE, Sauer U (1999) Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metab. Eng.* 1: 117-127.

12. Emmerling M, Bailey JE, Sauer U (2000) Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 67: 623-627.
13. Solem C, Koebmann BJ, Jensen PR (2003) Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase has no control over glycolytic flux in *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.* 185: 1564-1571.
14. Rivoal J, Hanson AD (1994) Metabolic control of anaerobic glycolysis. Overexpression of lactate dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the Davies-Roberts Hypothesis and points to a critical role for lactate secretion. *Plant Physiol.* 106: 1179-1185
15. Thomas S, Mooney PJF, Burrell MM, Fell DA (1997) Metabolic control analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochem. J.* 322: 119-127.
16. Urbano AM, Gillham H, Groner Y, Brindle KM (2000) Effects of overexpression of the liver subunit of 6-phosphofructo-1-kinase on the metabolism of a cultured mammalian cell line. *Biochem. J.* 352: 921-927.
17. O'Doherty RM, Lehman DL, Seoane J, Gómez-Foix AM, Guinovart JJ, Newgard CB (1996) Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 20524-20530.
18. Andersen HW, Pedersen MB, Hammer K, Jensen PR (2001) Lactate dehydrogenase has no control on lactate production but has a strong negative control on formate production in *Lactococcus lactis*. *Eur. J. Biochem.* 268: 6379-6389.
19. Koebmann BJ, Andersen HW, Solem C, Jensen PR (2002) Experimental determination of control of glycolysis in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 237-248.
20. Thomas S, Fell DA (1998) A control analysis exploration of the role of ATP utilization in glycolytic-flux control and glycolytic-metabolite-concentration regulation. *Eur. J. Biochem.* 258: 956-967.
21. Hofmeyr JHS, Cornish-Bowden A (2000) Regulating the cellular economy of supply and demand. *FEBS Lett.* 476: 47-51
22. Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, photosynthetic protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev. En Prensa.*
23. Cornish-Bowden A, Cárdenas ML (2001) Information transfer in metabolic pathways. Effects of irreversible steps in computer models. *Eur. J. Biochem.* 268: 6616-6624.
24. Meister A (1995) Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 251: 3-13.
25. Noctor G, Arisi AC, Jouanin L, Foyer C (1998) Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol.* 118: 471-482.
26. Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999) Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 121: 1169-1177.
27. Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS (2003) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 131: 656-663.
28. Niederberger P, Prasad R, Miozzari G, Kacser H (1992) A strategy for increasing an *in vivo* flux by genetic manipulation: The tryptophan system of yeast. *Biochem. J.* 287: 473-479.
29. Pilon-Smits EAH, Hwang S, Mel LC, Zhu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T, Terry N (1999) Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiol.* 119: 123-132.
30. Hatzfeld Y, Cathala N, Grignon C, Davidian JC (1998) Effect of ATP sulfurylase overexpression in Bright yellow 2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 116: 1307-1313.
31. Saito K, Kurosawa M, Tatsugochi K, Takagi Y, Murakoshi I (1994) Modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase. *Plant Physiol.* 106: 887-895.
32. Harms K, von Ballmos F, Brunold C, Hofgen R, Hesse H (2002) Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J.* 22: 335-343.
33. Inoue Y, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A (1998) Molecular identification of glutathione synthetase (C<sub>2</sub>SH<sub>2</sub>) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1395: 315-320.
34. Kim SJ, Shin YH, Park EH, Sa JH, Lim CJ (2003) Regulation of the gene encoding glutathione synthetase from fission yeast. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36: 326-331.
35. Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Jouanin L, Terry N (1999) Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119: 73-79.

36. Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 11: 1277-1291.
37. Grant CM, MacIver FH, Dawes IW (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide  $\gamma$ -glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell* 8: 1699-1707.
38. Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270: 4721-4728.
39. Katsumata R, Ikeda M (1993) Hyperproduction of triptophan in *Corynebacterium glutamicum* by pathway engineering. *Bio/Technology* 11: 921-925.
40. Morbach S, Sahm H, Eggeling L (1995) Use of feed-back resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux towards L-isoleucine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4315-4320.
41. Koffas MAG, Jung GY, Aon JC, Stephanopoulos G (2002) Effect of pyruvate carboxylase overexpression on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5422-5428.
42. Padilla L, Kramer R, Stephanopoulos G, Agosin E (2004) Overproduction of trehalose: Heterologous expression of *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in *Corinebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 370-376.
43. Radmacher E, Vaitsikova, Burger U, Krumbach K, Sahm H, Eggeling L (2002) Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2246-2250.
44. Simic P, Willuhn J, Sahm H, Eggeling L (2002) Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyl transferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3321-3327.
45. Kacser H, Burns JA (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27: 65-104.
46. Kacser H, Burns JA (1979) Molecular democracy: who shares the controls? *Biochem. Soc. Trans.* 7: 1149-1160.
47. Heinrich R, Rapoport SM, Rapoport TA (1977) Metabolic regulation and mathematical models. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 32: 1-82.
48. Heinrich R, Rapoport TA (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 42: 107-120.
49. Flint HJ, Tateson RW, Barthelmess IB, Porteous DJ, Donachie WD, Kacser H (1981) Control of the flux in the arginine pathway of *Neurospora crassa*. Modulations of enzyme activity and concentration. *Biochem J.* 200: 231-246.
50. Cohen NS, Cheung CW, Sijuwade E, Rajjman L (1992) Kinetic properties of carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) and ornithine carbamoyltransferase in permeabilized mitochondria. *Biochem J.* 282: 173-180.
51. Powers-Lee SG, Mastico RA, Bendayan M (1987) The interaction of rat liver carbamoyl phosphate synthetase and ornithine transcarbamoylase with inner mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 15683-15688.
52. Wanders RJA, van Roermund CWT, Meijer AJ (1984) Analysis of the control of citrulline synthesis in isolated rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 142: 247-254.
53. Cohen NS, Cheung CW, Rajjman L (1987) Channeling of extramitochondrial ornithine to matrix ornithine transcarbamylase. *J. Biol. Chem.* 262: 203-208.
54. Middleton RJ, Kacser H (1983) Enzyme variation, metabolic flux and fitness: alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 105: 633-650.
55. Moreno-Sánchez R, Devars S, López-Gómez F, Uribe A, Corona N (1991) Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1060: 284-292.
56. Moreno-Sánchez R (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260: 12554-12560.
57. Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocker C, Mazat JP (2000) Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J.* 347: 45-153.
58. García C, Pardo JP, Moreno-Sánchez R (1996) Control of oxidative phosphorylation supported by NAD-linked substrates in rat brain mitochondria. *Biochem. Arch.* 12: 157-176.
59. López-Gómez FJ, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R (1993) Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int. J. Biochem.* 25: 373-377.

60. Wisniewski E, Kunz WS, Gellerich FN (1993) Phosphate affects the distribution of flux control among the enzymes of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268: 9343-9346.
61. Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*.283: 1482-1488.
62. Erecinska M, Dagan F (1990) Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. Effects of  $K^+$ ,  $Na^+$ , and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. *J. Gen. Physiol.* 95: 591-616.
63. Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R (2000) Substrate oxidation and ATP supply in ADS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 375: 21-30.
64. Gellerich FN, Kunz WS, Bohnensack R (1990) Estimation of flux control coefficients from inhibitor titrations by non-linear regression. *FEBS Lett.* 274: 167-170.
65. Brown GC, Lakin-Thomas PL, Brand MD (1990) Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* 192: 355-362.
66. Hafner RP, Brown GC, Brand MD (1990) Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate proton leak rate and proton motive force in isolated mitochondria using the 'top-down' approach of metabolic control theory. *Eur. J. Biochem.* 188: 313-319.
67. Wanders RJA, Groen AK, van Roermund CWT, Tager M (1984) Factors determining the relative contribution of the adenine-nucleotide translocator and the ADP-regulating system to the control of oxidative phosphorylation in isolated rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 142: 417-424.
68. Groen AK, Van Roermund CWT, Vervoorn RC, Tager JM (1986) Control of gluconeogenesis in rat liver cells. *Biochem. J.* 237: 379-389.
69. Mendoza-Cózatl D (2005). Mecanismo de resistencia a  $Cd^{2+}$  mediado por tioles en *Euglena gracilis*. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM.
70. Kruckeberg AL, Neuhaus HE, Feil R, Gottlieb LD, Stitt M (1989) Decreased-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. Impact on mass-action ratios and fluxes to sucrose and starch, and estimation of flux control coefficients and elasticity coefficients. *Biochem J.* 261: 457-67.
71. Quant PA, Robin D, Robin P, Girard J, Brand MD (1993) A top-down control analysis in isolated rat liver mitochondria: can the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA pathway be rate-controlling for ketogenesis? *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 135-143.
72. Fell DA, Snell K (1988) Control analysis of mammalian serine biosynthesis. Feed-back inhibition on the final step. *Biochem. J.* 256: 97-101.
73. Galazzo JL, Bailey JE (1990) Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 162-172.
74. Mendes P (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 563-571
75. Cornish-Bowden A, Hofmeyr JHS (1991) MetaModel: a program for modelling and control analysis of metabolic pathways on the IBM PC and compatibles. *Comp. Appl. Biosci.* 7: 89-93.
76. Sauro HM (1993) SCAMP: a general-purpose simulator and metabolic control analysis program. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 441-450
77. Sauro, H.M. (2000) JARNAC: a system for interactive metabolic analysis. In: *Animating the Cellular Map* (Hofmeyr, J.-H.S., Rohwer, J.M. & Snoep, J.L., Eds.), pp. 221-228. Stellenbosch University Press, Stellenbosch, South Africa.
78. Olivier BG, Rohwer JM, Hofmeyr JH (2005) Modelling cellular systems with PySCeS. *Bioinformatics* 21: 560-561.
79. Poolman MG, Assmus HE, Fell D (2004) Applications of metabolic modelling to plant metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1177-1186.
80. Teusink B, Passarge J, Reijenga CA, Esgalhado E, van der Weijden CC, Schepper M, Walsh MC, Bakker BM, van Dam K, Westerhoff HV, Snoep JL (2000) Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur. J. Biochem.* 267: 5313-5329.
81. Pritchard L, Kell DB (2002) Schemes of flux control in a model of *Saccharomyces cerevisiae* glycolysis. *Eur. J. Biochem.* 269: 3894-3904.
82. Bakker BM, Michels PA, Opperdoes FR, Westerhoff HV (1999) What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J. Biol. Chem.* 274: 14551-14559.
83. Wright BE, Albe KR (1994) Carbohydrate metabolism in *Dictyostelium discoideum*: I. Model construction. *J. Theor. Biol.* 169: 231-241.
84. Nielsen J, Jorgensen HS (1995) Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway in a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Progr.* 11: 299-305.
85. Poolman MG, Fell DA, Thomas S (2002) Modeling photosynthesis and its control. *J. Exp. Bot.* 51: 319-328.

86. Chassagnole C, Fell DA, Rais B, Kudla B, Mazat JP (2001) Control of the threonine-synthesis pathway in *Escherichia coli*: a theoretical and experimental approach. *Biochem J.* 356: 433-444.
87. Speiser DM, Abrahamson, SL, Banuelos G, Ow DW (1992) *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. *Plant. Physiol.* 99: 817-821.
88. Vande WJG, Ow DW (2001) Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt2<sup>+</sup>. *Mol. Microbiol.* 42: 29-36.
89. Small JR, Kacser H (1992) Responses of metabolic systems to large changes in enzyme activities and effectors. 1. The linear treatment of unbranched chains. *Eur. J. Biochem.* 213: 613-624.
90. Torres NV, Souto R, Meléndez-Hevia E (1989) Study of the flux and transition time control coefficient profiles in a metabolic system *in vitro* and the effect of an external stimulator. *Biochem. J.* 260: 763-769.
91. Giersch, C (1995) Determining elasticities from multiple measurements of flux rates and metabolite concentrations. *Eur. J. Biochem.* 227: 194-201.
92. Saavedra E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J.* 272: 1767-1783.
93. Kurreck J (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 270: 1628-1644.
94. Stitt M, Quick WP, Schurr U, Schulze ED, Rodermeil SR, Bogorad L (1991) Decreased Rubisco in transgenic tobacco transformed with 'antisense' *rbcS* II. Flux control coefficients for photosynthesis in varying light, CO<sub>2</sub> and air humidity. *Planta* 183: 555-566.

## EL ANÁLISIS DE CONTROL DE FLUJO COMO HERRAMIENTA EN LA MANIPULACIÓN DE VÍAS METABÓLICAS

### Resumen

El análisis de control de una vía metabólica permite determinar cuantitativamente el grado de control que una enzima (E<sub>i</sub>) ejerce sobre el flujo J (coeficiente de control de flujo,  $C_{E_i}^J$ ) y sobre la concentración de intermediarios M (coeficiente de control de concentración,  $C_{E_i}^M$ ), sustituyendo así el concepto cualitativo y ambiguo de *etapa limitante* en el estudio de vías metabólicas. Asimismo, ayuda a entender (i) las razones por las cuales una enzima ejerce un control alto o bajo, y (ii) porqué el control de la vía no reside en una sola enzima o transportador (denominada comúnmente "la etapa limitante"), sino que el control se distribuye entre varias de ellas.

Se han desarrollado diversas estrategias experimentales para determinar los  $C_{E_i}^J$ . Por ejemplo, se han utilizado inhibidores específicos en el análisis de control de la fosforilación oxidativa tanto de mitocondrias aisladas como de células intactas. Por otro lado, el análisis de elasticidades es tal vez el enfoque experimental más profusamente empleado en muchas vías metabólicas pero principalmente en el análisis de control de la glicólisis. Este enfoque consiste en determinar la sensibilidad de una enzima (o bloque de enzimas) a la variación en la concentración de su sustrato o su producto, durante el funcionamiento de la vía metabólica en estado estacionario. Si la actividad no cambia significativamente con la variación en alguno de sus ligandos (baja elasticidad,  $\varepsilon_{E_i}^J$ ), entonces la enzima, transportador o bloque de enzimas esta cercana a la saturación y por lo tanto, tendrá un alto grado de control sobre el flujo de la vía (alto  $C_{E_i}^J$ ) o "limitará" el flujo (en la antigua terminología); esto es, existe una relación inversamente proporcional entre la elasticidad de una enzima y el grado de control que esta ejerce sobre el flujo.

Un tercer enfoque, mucho menos utilizado debido a su complejidad metodológica, se podría llamar genético y consiste en determinar el efecto sobre el flujo al variar selectivamente la expresión de una enzima *in vivo*, sin alterar el contenido y actividad del resto de las enzimas de la vía metabólica estudiada. Otro enfoque de desarrollo reciente es el modelaje matemático de las vías metabólicas ("*in silico* Biology"), la cual requiere el análisis de las propiedades cinéticas de las enzimas y transportadores obtenidas experimentalmente, tanto en las proteínas purificadas como en aquellas contenidas en homogenados y extractos celulares, además de un software apropiado para la integración de los datos. Un último enfoque experimental consiste en la reconstrucción *in vitro* de la vía metabólica utilizando enzimas comerciales o recombinantes, en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Cualquiera que sea la estrategia experimental disponible, el objetivo inicial y principal del análisis de control es el de establecer cuál o cuáles enzimas y transportadores ejercen un control significativo del flujo (y/o de la concentración de los intermediarios metabólicos) y cuales no, cuando la vía está sujeta a una variedad de condiciones experimentales de interés tales como exposición a diferentes temperaturas, a variaciones en el pH, condiciones de estrés oxidativo, el efecto de hormonas, plaguicidas o metales pesados, o bien estados patológicos y enfermedades. Cabe resaltar que el establecer la distribución de control de una vía metabólica permite identificar cuáles son los sitios potenciales que deberían de modificarse para alterar exitosamente el flujo o la concentración de algún metabolito de interés biotecnológico o clínico tales como aminoácidos y lípidos esenciales, vitaminas, antibióticos o glutatión.

Una vez identificados los sitios de control, es recomendable investigar las razones bioquímicas, celulares y genéticas por las cuales esas proteínas ejercen control, y las restantes enzimas no. Para esto último se requiere determinar las elasticidades de las enzimas controladoras y no-controladoras hacia sus sustratos y productos así como también hacia sus otros posibles ligandos (tales como activadores e inhibidores fisiológicos); además, es necesario determinar sus propiedades cinéticas (si es que estas no han sido estudiadas), su localización subcelular y su concentración intracelular.

Cuando se haya generado toda esta información, es altamente probable que se pueda manipular exitosamente el flujo o la concentración de algún intermediario metabólico. Tal vez por carecer de esta información, o de ignorarla, ha resultado que los intentos de manipulación de las vías metabólicas usando las herramientas de la biología molecular o fármacos específicos para la supuesta enzima limitante sean a la fecha poco alentadores; quizá con la única excepción exitosa de la sobreproducción de varios aminoácidos en *Corynebacterium glutamicum*.

Existen pocos ejemplos de la modificación del flujo o de la concentración de algún metabolito mediante la manipulación genética o química sustentada en el análisis de control: la modulación del metabolismo energético en células tumorales o en levaduras para disminuir su elevada proliferación o para aumentar la producción de etanol, respectivamente. De manera interesante, hay reportes donde el análisis de control ha permitido identificar las enzimas que se alteran en algunos estados patológicos, y las razones por las cuales esto ocurre.

**Palabras Clave:** Análisis de control, estructura de control, coeficiente de control, sobre-expresión de enzimas, modelaje, reconstitución de vías metabólicas.

## **Semblanza del Dr. Rafael Moreno Sánchez.**

Nació en 1956 en México, D.F. Es biólogo de la FES-Iztacala, UNAM (1981), con maestría en ciencias en el CINVESTAV-Zacatenco (1982) y doctorado en ciencias en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM (1985). Recibió el premio Weizmann 1986 de la Academia Mexicana de Ciencias en el área de Ciencias Naturales a la mejor tesis doctoral. Realizó una estancia post-doctoral con R. Hansford en el NIH, NIA de Baltimore, Maryland (1986-1988), y posteriormente se desempeñó como research assistant professor en la Hahnemann University de Philadelphia, Pennsylvania con H. Rottenberg (1991-1993). Es actualmente jefe del departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología. Sus principales líneas de investigación son: (1) Control del metabolismo energético en mitocondrias, células y órganos; (2) Mecanismos de resistencia a metales pesados en microorganismos. Su trabajo experimental se ha publicado en 77 artículos internacionales, los cuales han recibido más de 1,000 citas internacionales. También ha publicado 22 artículos en revistas nacionales y 1 libro. Es investigador nacional nivel 3 en el Sistema Nacional de Investigadores desde 2002. Ha dirigido 12 tesis de licenciatura y 10 de maestría; además, se han formado en su laboratorio 7 doctores en ciencias, de los cuales 4 ya se desempeñan actualmente como investigadores independientes y han ingresado y permanecido en el Sistema Nacional de Investigadores. Cada semestre imparte un curso en el posgrado de ciencias bioquímicas de la UNAM sobre cinética enzimática o regulación metabólica.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## **TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LAS CÉLULAS CEBADAS: Mecanismos que controlan la desgranulación y la síntesis diferencial de citocinas**

Claudia González Espinosa, Jaciel Medina Tamayo  
y Juan Pablo Benítez Garrido  
Departamento de Farmacobiología. Cinvestav-Coapa.  
Calzada de los Tenorios # 235, Col. Granjas Coapa, Tlalpan.  
México D.F. 14330, México.  
[cgonzal@cinvestav.mx](mailto:cgonzal@cinvestav.mx)

### **SIGNAL TRANSDUCTION IN MAST CELLS Mechanisms that regulate degranulation and synthesis of cytokines**

#### **Abstract**

*Cell to cell communication is behind the orchestration of many complex responses in multicellular organisms. Inside the immune system, different signal transduction mechanisms allows to each cell to develop specific coordinated responses involving distinct tissues. Mast cells are a specialized group of immune cells who have been identified as the principal initiators of type I hypersensitive reactions (better known with the generic name of allergic reactions). These cells are mainly activated by the antigenic crosslinking of the high affinity receptor for Immunoglobulin E (FcεRI receptor), who binds the Fc fraction of IgE. The signal transduction system of this receptor involves Src family kinases activation, formation of macromolecular aggregates inside the plasma membrane, activation of the phosphoinositide-calcium pathway, MAPK phosphorylation and selective transcription of a numerous group of genes that codifies for distinct cytokines. This molecular network regulates degranulation and cytokine production in mast cells and are the responsible of the early and the late phase of the allergic response. The delicate mechanism that controls gene expression specificity seems to be dependent on the intensity of the signal generated in the plasma membrane, which indicates mast cells have the capacity of develop a signal integration process able to convert signal intensity in transcriptional specificity. This integration process is the responsible too of the distinct responses that mast cells can elicit after different triggering ligands. That enormous plasticity places mast cell as a central player in distinct physiological process, like innate immunity and tissue neovascularization.*



**Keywords:** Signal transduction; IgE; mast cell; allergy, cytokine; gene transcription; FcεRI receptor.

---

## Introducción

Las respuestas fisiológicas de todos los organismos se encuentran moduladas por interacciones con su medio ambiente. Del mismo modo, dentro de cada uno de ellos, los cambios de distinta magnitud y temporalidad en el metabolismo celular mantienen en equilibrio a las células con su entorno particular. En el interior de un organismo multicelular, los cambios metabólicos son inducidos por mensajeros químicos como hormonas, neurotransmisores y citocinas, quienes llevan mensajes de un lugar a otro orquestando respuestas complejas.

Estos mediadores inducen cambios controlados en el metabolismo debido a que cada célula posee receptores específicos para cada uno de ellos, y la activación de estos receptores produce a su vez cambios en los estados de agregación y fosforilación de diversas proteínas intracelulares, modificando su actividad y modulando finalmente, la transcripción genética. Al conjunto de eventos moleculares mediante los cuales se reconocen las señales externas y se traducen en respuestas específicas que cambian la fisiología de una célula, se le llama, de manera general, proceso de transducción de señales (1).

En el sistema inmunológico (SI) la comunicación celular es inherente a su función y es indisoluble de su fisiología. En todas las respuestas donde el SI interviene directamente, se aprecia con claridad la participación coordinada de células activadas por moléculas sintetizadas con la finalidad de desencadenar diversas reacciones. Mensajeros extracelulares como las interleucinas, factores quimiotácticos y anticuerpos son producidas cuando células del SI entran en contacto con agentes extraños. Estas moléculas a su vez, provocan distintos cambios metabólicos en las células blanco, quienes realizan un proceso de integración de la información presente en su entorno y la transforman en respuestas específicas, como la apoptosis, la migración, la secreción de diversos compuestos, la síntesis de nuevos anticuerpos y la liberación de nuevas citocinas (2). De esta manera, el estudio de los procesos de transducción de señales en las células del SI constituye un campo muy activo de investigación, debido a que tales procesos son los responsables a nivel celular, de la eficiencia en el funcionamiento de todo nuestro sistema de defensa y autoreconocimiento.

En las próximas páginas se describirán algunos sistemas de transducción de señales los cuales permiten que una célula muy particular del sistema inmune participe en diversas respuestas como las reacciones anafilácticas, la defensa contra patógenos y la generación de nuevos vasos sanguíneos. Comenzaremos con una descripción general de las células cebadas (MC) para analizar posteriormente cuáles son las moléculas y los mecanismos de transducción de señales que le permiten responder a diversos estímulos extracelulares, modulando la secreción de mediadores preformados y la transcripción de diversos genes para dar origen a la síntesis de citocinas.

## Las células cebadas

Las células cebadas (referidas en general como MC por su nombre en inglés: mast cells), fueron descritas por primera vez por Paul Ehrlich en 1872. Este tipo celular es el

responsable de las reacciones de hipersensibilidad tipo I, mas comúnmente conocidas como reacciones alérgicas. Las MC se derivan de células hematopoiéticas que migran hacia virtualmente todos los tejidos vascularizados, donde completan su maduración (3). Las MC maduras residen normalmente cerca de los epitelios, los vasos sanguíneos, los nervios y en los tractos respiratorio y gastrointestinal, cerca de células de músculo liso y de las glándulas productoras de moco. Microscópicamente se identifican fácilmente, porque presentan en su citosol un número grande de gránulos electrodensos (ver Figura 1) que contienen diversos mediadores como la histamina, la heparina, diversas proteasas y citocinas como el factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).



**Figura 1.** Microfotografía electrónica de una célula cebada típica. Se puede apreciar su citoplasma con los gránulos donde se almacena histamina, proteasas, y diversos mediadores químicos.

La cantidad de células cebadas en los tejidos se controla por el reclutamiento de precursores, la maduración local de éstos y su proliferación en cada sitio. Debido a su maduración en el tejido residente, el contenido granular no es el mismo entre las distintas poblaciones de células cebadas, las cuales pueden presentar variaciones en el tipo de proteasas que contienen, o la cantidad de histamina que se encuentra en sus gránulos. Sin embargo, algo que todas las células cebadas tienen en común es la presencia de receptores de alta afinidad para la inmunoglobulina E (IgE) en su membrana plasmática. De esta manera, las células cebadas pueden unir a la fracción Fc de la IgE por medio de un receptor de alta afinidad (el receptor Fc $\epsilon$ RI) y así, quedar habilitadas para reconocer antígenos (en este caso, también llamados alérgenos) los cuales son, a su vez, reconocidos por las IgEs. La presencia del Fc $\epsilon$ RI en la superficie de las células cebadas se utiliza frecuentemente, como un marcador que permite identificarlas (4).

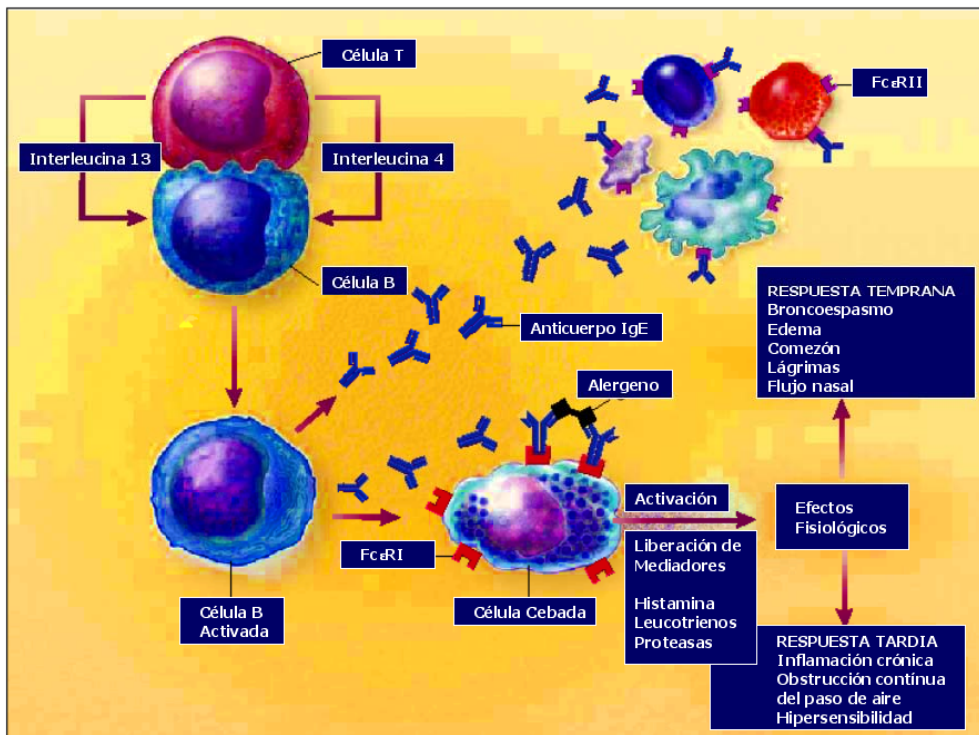
## **Integración de diversas señales extracelulares en las células cebadas**

### **I. Participación de las células cebadas en las reacciones anafilácticas**

El proceso de producción de la IgE es complejo y aún se desconoce porqué algunos antígenos son capaces de provocar específicamente una respuesta inmune mediada por esta inmunoglobulina. Sin embargo, una vez sintetizada y unida al receptor Fc $\epsilon$ RI de las células

cebadas se encuentra lista para reconocer al antígeno cuando éste se presenta posteriormente.

La activación del Fc $\epsilon$ RI mediante el reconocimiento del antígeno por la IgE, desencadena una respuesta que induce la desgranulación y la síntesis de citocinas en las MC (Figura 2).



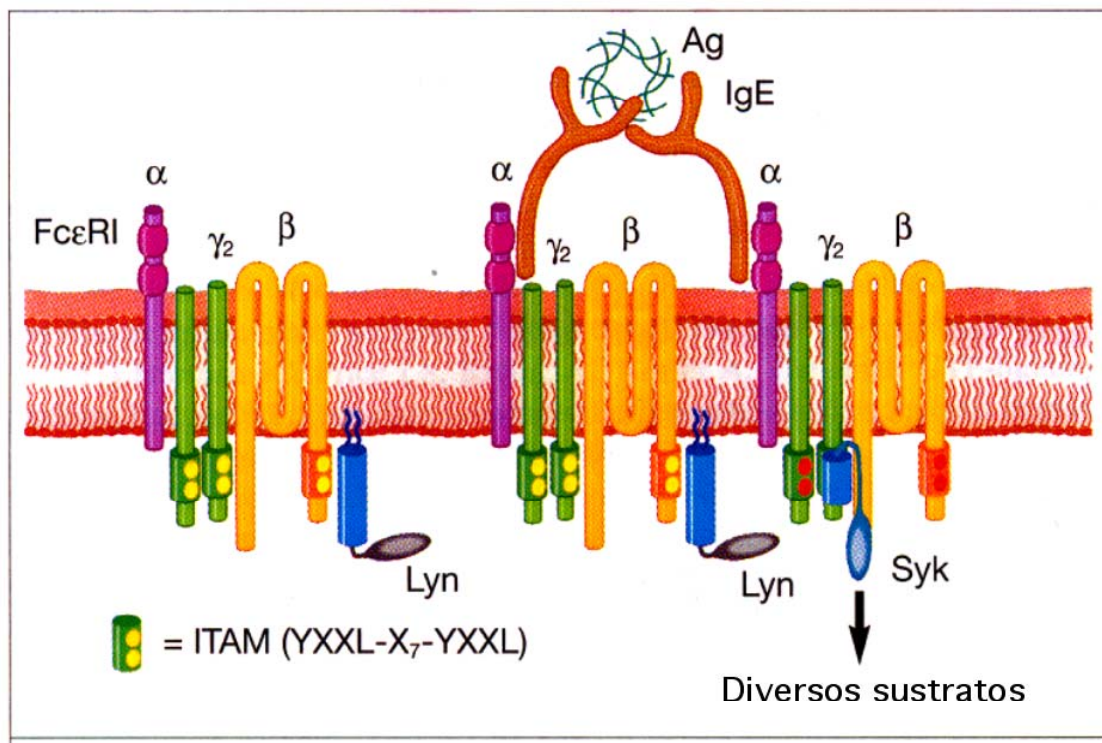
**Figura 2.** Mecanismo de producción de IgE y la activación de las células cebadas en las reacciones alérgicas. Para que se inicie la síntesis de IgE, los alérgenos deben encontrarse con las células presentadoras de antígenos en los diferentes epitelios. Esas células migran a los nódulos linfáticos, donde presentan los antígenos procesados a los linfocitos T y B. Distintas interacciones entre estas células inician respuestas coordinadas por citocinas y la presencia o ausencia de moléculas coestimuladoras (como la IL-4 y la IL-13). Una vez que la IgE es sintetizada y liberada por las células B, ésta circula brevemente en la sangre antes de unirse a los receptores de alta afinidad para la IgE (los Fc $\epsilon$ RI), localizados en la membrana de las células cebadas y basófilos. También puede unirse a receptores de baja afinidad localizados en linfocitos, eosinófilos, plaquetas y macrófagos. Cuando la IgE se une al receptor Fc $\epsilon$ RI de la membrana de las células cebadas, quedan expuestos los sitios Fab, que permiten el reconocimiento del antígeno cuando éste se presenta de nuevo. La formación de complejos antígeno-IgE-Fc $\epsilon$ RI en la membrana celular activa al receptor y se produce una respuesta consistente en la salida brusca del contenido granular y en la síntesis posterior de citocinas reguladoras. Estos eventos son los responsables de las diversas fases (temprana y tardía) de las reacciones alérgicas.

Después de que la IgE unida a su receptor reconoce algún antígeno, se lleva a cabo un complicado proceso de activación que involucra la dimerización del receptor, la activación de cinasas de tirosina de la familia Src, la formación de complejos macromoleculares en el interior

de la membrana plasmática, el incremento de la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, la liberación del contenido de los gránulos al exterior de la célula, y la síntesis *de novo* de diferentes citocinas que son secretadas horas después de que el estímulo se presentó. Mientras que los mediadores pre-formados que se liberan por la desgranulación son los responsables de la fase temprana de la respuesta alérgica, las citocinas secretadas regulan la fase tardía de las alergias y probablemente coadyuvan a su establecimiento crónico, dado que modulan la producción de anticuerpos, la migración y la proliferación de otros tipos celulares involucrados en la inflamación.

### El receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$

El receptor  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  (Figura 3) pertenece a la familia de los receptores de múltiples subunidades en el sistema inmune que no tienen una actividad intrínseca de cinasa, pero se asocia reversiblemente con proteínas cinasas de tirosinas (PTK). En su forma "típica", el  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  se expresa en las células cebadas (y los basófilos) de origen humano y murino, como un heterotetrámero compuesto por una cadena  $\alpha$ , una  $\beta$  y dos cadenas  $\gamma$ , éstas últimas unidas por puentes disulfuro (5). El sitio de unión del fragmento Fc de la IgE se encuentra dentro de la cadena  $\alpha$ , y constituye el componente extracelular más grande del  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ . Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  son

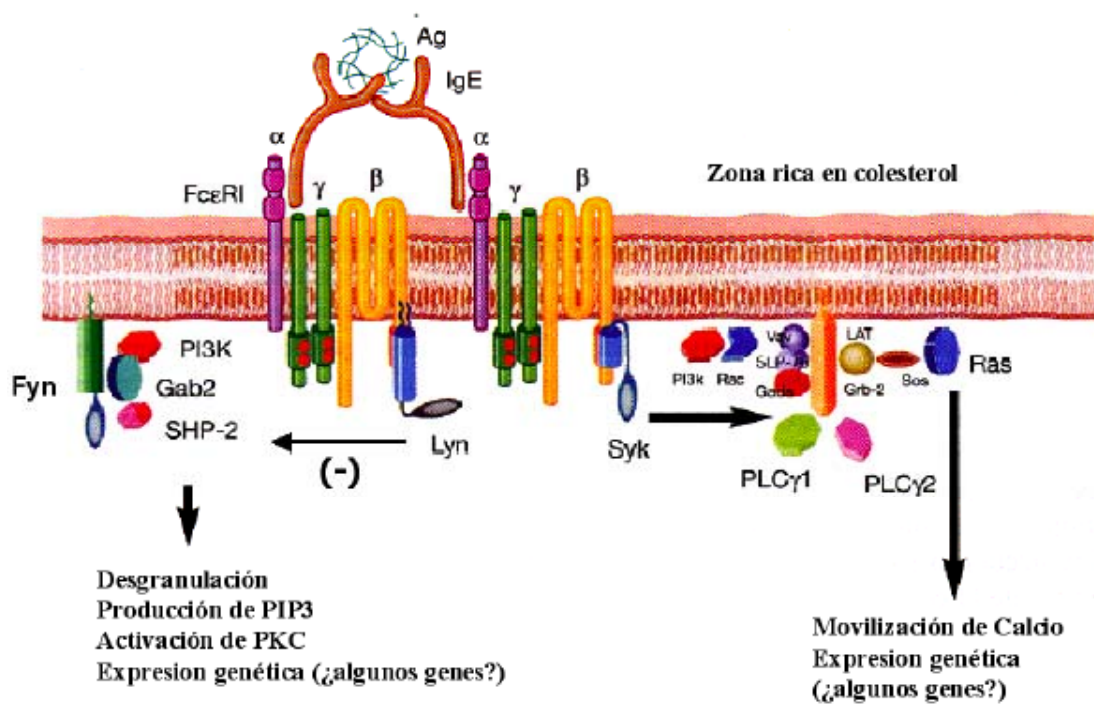


**Figura 3.** Estructura del receptor de alta afinidad para la IgE ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ). Ver texto para los detalles.

las responsables de la propagación de la señal al interior de la célula, a través de la fosforilación de sus sitios de activación ricos en tirosina (ITAMs). El dímero  $\gamma$  es esencial para la expresión membranal del receptor y para la transducción de la señal. La cadena  $\beta$  del receptor ha sido descrita como un amplificador de la señal y, en células humanas, no se requiere para la expresión del Fc $\epsilon$ RI. Existe heterogeneidad del receptor en células humanas y de esta forma, hay células como los monocitos y las células dendríticas, cuyos receptores Fc $\epsilon$ RI carecen de la subunidad  $\beta$ .

### El sistema de transducción de señales del receptor Fc $\epsilon$ RI

La activación del Fc $\epsilon$ RI ocurre cuando un alérgeno favorece la agregación del receptor al formar complejos de diversos tamaños en la superficie de la célula cebada (6). Este evento ocasiona la fosforilación de los ITAMs de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  por cinasas de la familia de Src, quienes pueden ser Lyn o Fyn. Los ITAMs fosforilados reclutan a su vez a otra cinasa llamada Syk, que se une a ellos a través de sus dominios SH2 y se activa aún más por una fosforilación mediada por Lyn (ver Figura 3).



**Figura 4.** Activación del receptor Fc $\epsilon$ RI en la membrana de las células cebadas y la formación de diversos complejos macromoleculares dentro y fuera de las "islas de colesterol". Ver el texto para los detalles.

Syk cataliza la fosforilación de algunas proteínas adaptadoras, como LAT, SLP-76 y NTAL, formando un agregado multimérico (Figura 4) que aglutina y activa a varias enzimas, como la isoforma  $\gamma$  de la fosfolipasa C (PLC- $\gamma$ ), quien regula la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la actividad de la proteína cinasa C (PKC) al hidrolizar el fosfolípido de membrana PI-4,5 P2 (fosfatidil inositol 4,5, bifosfato) para formar  $\text{IP}_3$  (inositol trifosfato) soluble y diacilglicerol (DAG) unido a la membrana plasmática. El reclutamiento de otras proteínas, como Vav, Shc, Grb2 y Sos culmina con la activación de varias enzimas de bajo peso molecular que hidrolizan GTP (GTPasas), como Ras, Rac y Rho. Estas GTPasas regulan la activación de diversos miembros de la familia de las MAPK como ERK, JNK y p38, las cuales regulan la actividad de numerosos factores de transcripción para la producción de citocinas y la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) para generar compuestos derivados del ácido araquidónico.

Otra enzima efectora muy importante en el sistema de transducción del receptor Fc $\epsilon$ RI es la PI3K (cinasa del fosfatidil inositol). La subunidad reguladora p85 de esta enzima controla su reclutamiento a los complejos formados en la membrana plasmática, lo que ocasiona que la subunidad catalítica (p110) fosfore al PI-4,5 P2 y genere un segundo mensajero fundamental, el PI-3,4,5P<sub>3</sub>. Nuestro conocimiento de la activación de la PI3K después del entrecruzamiento del Fc $\epsilon$ RI se ha incrementado considerablemente durante los últimos tres años. La proteína adaptadora Gab2, quien se fosforila en tirosinas rápidamente después de la agregación del receptor, puede unir a la subunidad p85 de la PI3K, ocasionando su activación. Además, recientemente se encontró que otra cinasa de la familia de Src, llamada Fyn es la cinasa responsable de la fosforilación de Gab2 (independientemente de Lyn, Syk o LAT). De manera muy similar a lo que ocurre con Lyn, Fyn se asocia con la subunidad  $\beta$  del receptor Fc $\epsilon$ RI en las células cebadas y esta interacción se hace más firme cuando el Fc $\epsilon$ RI se activa. Aquí cabe señalar que el reclutamiento de dos cinasas de la familia de Src al Fc $\epsilon$ RI (Lyn y Fyn), tiene una enorme similitud con los eventos tempranos que ocurren después de la activación del receptor de las células T, donde las cinasas activadas son Lck y Fyn.

Este proceso bioquímico de formación coordinada de complejos en la membrana plasmática, organizado por diversas proteínas adaptadoras fosforiladas por cinasas dependientes de la agregación del receptor, no puede concebirse separado de la participación de algunos dominios de la membrana plasmática, llamados de manera general islas de colesterol o "lipid rafts".

Aunque existe evidencia controversial acerca del papel de estos "lipid rafts" en la capacidad del receptor de transducir la señal, en ciertas células cebadas modelo (como las células RBL-2H3) es indispensable que los agregados multimoleculares se formen en esas zonas de la membrana para observar la activación celular (como la secreción del contenido granular). Los resultados indican claramente que es posible obtener un inmunoprecipitado en el cual se encuentran el receptor, LAT, VAV-1, SLP76, y PLC $\gamma$  pocos segundos después de la estimulación. Por distintas técnicas de microscopía se ha observado la localización de este complejo macromolecular en zonas discretas ricas en colesterol, de la membrana de la célula cebada (7) (Figura 3). Sin embargo, existen proteínas (como Gab2, PI3K y una parte de Fyn) que se encuentran excluidas de estas zonas de la membrana plasmática (8).

### **El mensaje llega al núcleo celular: La síntesis de citocinas.**

La activación de diversas moléculas en el interior de complejos membranales desencadena una serie de cambios importantes también en el grado de activación de diversas proteínas citoplásmicas, como diversas MAPK quienes a su vez, fosforilan a distintos factores de transcripción (Figura 5).

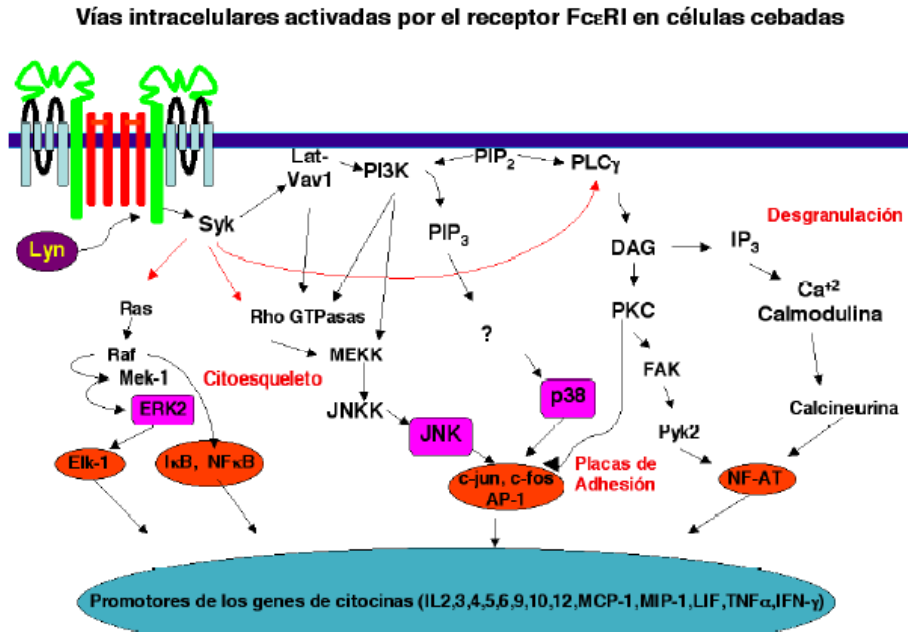
Existe evidencia experimental (9) que indica que las tres distintas cinasas MAP: ERK2, JNK y p38, forman parte de la cascada de amplificación de la señal del FcεRI, lo que a su vez, culmina con la translocación nuclear de varios factores de transcripción, como el NFκB, NF-AT, ATF-2, Elk-1, SRF y AP-1. El flujo de Ca<sup>2+</sup> activa a la calcineurina, una fosfatasa de serina/treonina dependiente de calcio/calmodulina, que a su vez desfosforila al factor de transcripción NF-AT y causa su translocación al núcleo celular, induciendo la transcripción de diversos genes, como el de la IL-2 (interleucina 2).

Una vez que los factores de transcripción son activados, se unen en diferentes combinaciones a las regiones promotoras de distintos genes, iniciando una respuesta transcripcional compleja que desemboca en la síntesis de por lo menos 25 citocinas diferentes, dependiendo del origen de la célula cebada estudiada. Las citocinas son sintetizadas y liberadas varias horas después de que el estímulo antigénico se presentó. Estos mediadores ocasionan inflamación y regulación de respuestas mediadas por células T y coordinan la fase tardía de las respuestas alérgicas.

Se han realizado estudios que indican que la expresión de los genes de citocinas en una población homogénea de células cebadas puede ser modulada diferencialmente por la estimulación del receptor FcεRI (10). Utilizando ensayos de protección contra RNasa I con sondas múltiples, se construyó un perfil de 45 citocinas inducidas tras la activación del FcεRI, en células cebadas derivadas de médula ósea de ratones normales. De estas 45 citocinas, se seleccionó un grupo de 12 por su facilidad de detección y su importancia en la regulación de las respuestas alérgicas. Al estudiar detalladamente la expresión de tales genes, se encontró que una estimulación de baja intensidad FcεRI, ocasiona una potente producción de citocinas quimiotácticas (MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, M-CSF e IL-4) en condiciones donde se observa una mínima desgranulación y muy poco RNAm de algunas citocinas reguladoras como IL-2, IL-3, IL-10, TNFα, IL-13, IFNγ, LIF e IL-6 (Figura 6).

La intensidad de la señal mediada por el receptor FcεRI en la membrana plasmática de una célula puede ser manipulada experimentalmente mediante la incubación de las células con cantidades saturantes de IgE y concentraciones muy pequeñas de antígeno. El tamaño de los agregados formados por receptor-IgE-antígeno, es pequeño y las señales intracelulares producidas son traducidas en la activación transcripcional específica de solo algunos genes. Esto indica que en este sistema de transducción, distintas intensidades de estimulación son traducidas de manera específica en el interior de la célula, e interpretadas como señales cualitativamente distintas a nivel transcripcional. Del mismo modo, el número de agregados en la membrana puede ser manipulado si las células se incuban en presencia de distintas concentraciones de IgE específica para determinado antígeno, en combinación con IgE inespecífica, la cual ocupa al receptor, pero no puede reconocer al antígeno. En este tipo de

experimentos de ocupación selectiva, los resultados también indican que una señal membranal de baja intensidad, llega de manera directa solamente a ciertos promotores de genes en el núcleo celular, desencadenando la síntesis de citocinas quimiotácticas de manera selectiva.



**Figura 5.** Eventos de activación de MAPK y factores de transcripción que ocurren después del entrecruzamiento del receptor FcεRI.

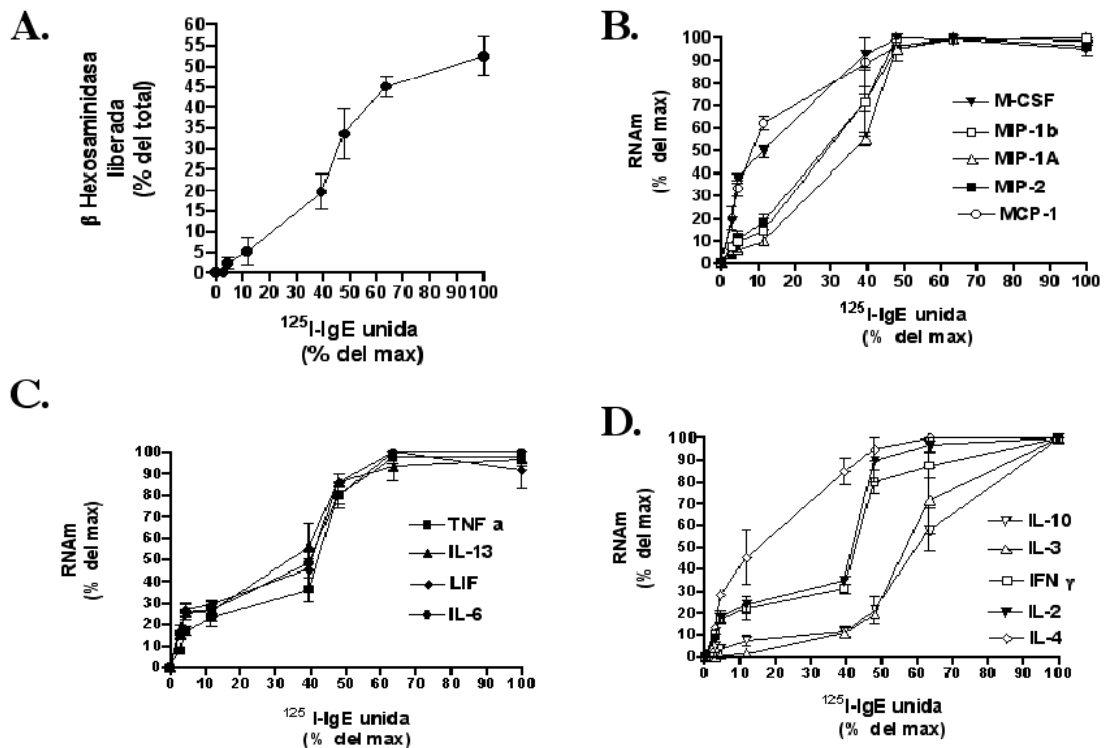
## II. Participación de las células cebadas en la inmunidad innata

La ubicación de las células cebadas en los distintos tejidos sugiere su participación como un tipo celular de “interfase” entre el exterior y el interior del organismo y se ha comprobado recientemente su papel fundamental en la defensa contra patógenos por medio de experimentos con ratones que carecen de este tipo celular.

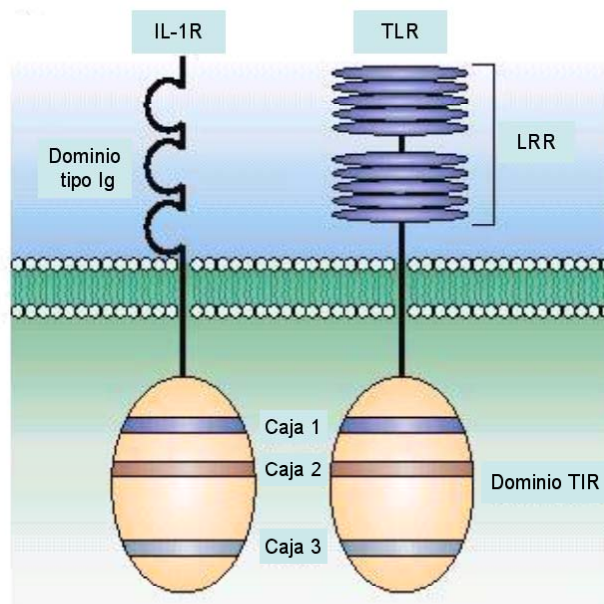
Sabemos que este importante rol en la respuesta inmune innata se debe a que las MC presentan en su superficie diversos miembros de una familia de receptores llamados “Toll-like receptors” (TLR), cada uno de ellos capaz de reconocer y responder a productos bacterianos, parásitos o virus.

Los receptores “Toll-like” son una familia de receptores transmembranales que se caracterizan por poseer un dominio extracelular rico en leucinas (Figura 7), al que se le conoce en inglés como leucine-rich repeat (LRR), y un dominio intracelular llamado Toll/IL-1 (TIR) por sus siglas en inglés. La mayoría de los TLR funcionan como homodímeros, pero también pueden formarse heterodímeros funcionales TLR1/TLR2 y TLR2/TLR6 (11).





**Figura 6.** Los diferentes RNAm para citocinas son expresados dependiendo de la ocupación del receptor en la membrana plasmática de la célula cebada. La desgranulación presenta una relación lineal con la ocupación del receptor (A), pero la síntesis de citocinas reguladoras (IL-6 e IL-10) llega a su máximo solo cuando la ocupación del receptor es mayor del 70% (C). La síntesis de citocinas quimiotácticas llega a su máximo con solamente una fracción de los sitios ocupados (B). Con ensayos de RT-PCR pueden apreciarse las distintas familias de genes de citocinas en las células cebadas (D). Figura tomada de la referencia (10).



**Figura 7.** Estructura general de los TLR. Ver texto para detalles.

Tras la activación de los TLR, se produce una cascada de señalización que culmina en la producción de diferentes citocinas inflamatorias, citocinas quimiotácticas, así como la inducción de genes relacionados con la defensa del hospedero como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y péptidos antimicrobianos los cuales pueden destruir directamente a patógenos. Aunque todas estas respuestas son inducidas por la activación de los TLR, queda cada vez más claro que existen diferencias en la cascada de señalización de cada uno de ellos, de esta manera aunque se producen citocinas tras la activación, no todos los TLR son capaces de inducir la producción de las mismas citocinas ni en las mismas cantidades. De esta forma, un proceso de integración selectiva de la información emitida por los TLR en la membrana plasmática ocurre dentro de la célula cebada para producir distintos patrones de citocinas, de manera similar a lo observado por la estimulación antigénica.

Las vías de transducción descritas para los distintos TLR se clasifican de manera general en dos grupos: 1) la vía común (compartida por varios miembros TLR) y 2) las vías específicas (descritas solamente para algunos miembros). La vía común (Figura 8), incluye la participación de cuatro componentes esenciales: la proteína adaptadora MyD88, IRAK, TRAF6 y de TAK1. La proteína MyD88 posee dos dominios de interacción, un dominio death en el amino terminal y un dominio TIR en el carboxilo terminal que le permite interactuar con el receptor, mientras que por el dominio "death" interactúa con la proteína IRAK reclutándola al complejo. Una vez reclutada IRAK, esta se autofosforila y se asocia con TRAF6 la cual induce la activación de la cinasa TAK1 y de MKK6, que activan a NF- $\kappa$ B, JNK y p38 respectivamente.

Las vías específicas han sido descritas para el TLR4 y el TLR3 y son independientes del adaptador MyD88. En el caso del TLR4, esta vía incluye a las proteínas adaptadoras TRIF y TRAM, mientras que para el TLR3 solo es necesaria TRIF.

Esto indica que el TLR4 puede usar varias proteínas adaptadoras las cuales pueden controlar la activación de distintas vías de señalización, de hecho, cabe señalar que el reconocimiento del LPS por el TLR4 es complejo y requiere de varias proteínas accesorias, como por ejemplo de LBP, el receptor CD14, la proteína MD-2 y recientemente se ha descrito la participación de la proteína RP105 la cual esta relacionada con la activación de las cinasas de tirosinas de la familia Src como la cinasa Lyn.

De la variedad de TLR que puede expresar la célula cebada los más estudiados han sido el TLR2 y el TLR4 (Ver Figura 8). Se ha comprobado que la activación del TLR2 por proteoglicanos (PGN) en células cebadas induce la movilización de calcio intracelular, ocasionando la desgranulación de la célula en un proceso indistinguible del provocado por la estimulación del receptor Fc $\epsilon$ RI, además de activarse la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, así como liberación de TNF- $\alpha$ .

Por su parte, el TLR4 posee un papel importante en la supervivencia mediada por la célula cebada en el modelo de peritonitis bacteriana por ligadura intestinal, ya que los ratones que carecen de estas células (W/W<sup>V</sup>) mueren entre el tercer y cuarto día después de que se les provoca una peritonitis, mientras que los ratones que fueron reconstituidos con células cebadas silvestres, logran sobrevivir. Por su parte, ratones que son reconstituidos con células cebadas carentes del TLR4 no lo logran. La activación del TLR4 provoca la liberación de interleucinas como la IL-1, IL-6 e IL-13 así como la liberación del TNF- $\alpha$ , sin embargo, la activación de este receptor a diferencia del TLR2, no provoca la desgranulación de la célula cebada, ni movilización

de calcio. Por otra parte se ha demostrado que la activación del TLR4 por lipopolisacárido (LPS) produce la fosforilación de las MAPK p38 y ERK1/2, así como la activación de JNK y la del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en las células cebadas, indicando una activación de distintas enzimas que también son activadas por la estimulación antigénica mediada por IgE.

De esta manera, las células cebadas son capaces de controlar de manera diferencial su actividad transcripcional para inducir la síntesis específica de citocinas dependiendo del estímulo exterior, en un proceso de integración y activación simultánea de diversas proteínas y factores de transcripción. El encontrar puntos de control en las vías, donde las señales se integran, se bifurcan o se potencian para ocasionar la respuesta celular, es uno de los campos de investigación más activos y prometedores en la actualidad, debido a diversas correlaciones clínicas entre enfermedades alérgicas e infecciones de distintos tipos.

### **III. Participación de las células cebadas en angiogénesis.**

Existen numerosos reportes que señalan la presencia de células cebadas en procesos donde se observa la generación de nuevos vasos sanguíneos, tales como la cicatrización, la inflamación, la ovulación y el crecimiento tumoral, donde se ha demostrado que las MC se acumulan alrededor de diversos nódulos carcinomatosos en la etapa que precede a la neovascularización (12). En condiciones normales, se puede observar que las células cebadas de tejido conectivo se encuentran anatómicamente adosadas a los vasos sanguíneos de pequeño calibre y existen varios ejemplos donde se ha observado de manera inequívoca que las MC desgranulan directamente en capilares y membranas epiteliales basales. En ratones con deficiencia de células cebadas, la angiogénesis ocurre a una velocidad reducida y se normaliza cuando la cantidad de células cebadas se reestablece. En lo que se refiere a procesos malignos, las células cebadas se han asociado con el cáncer de mama, hemangioma, hemangioblastoma, cáncer colorectal y cérvicouterino.

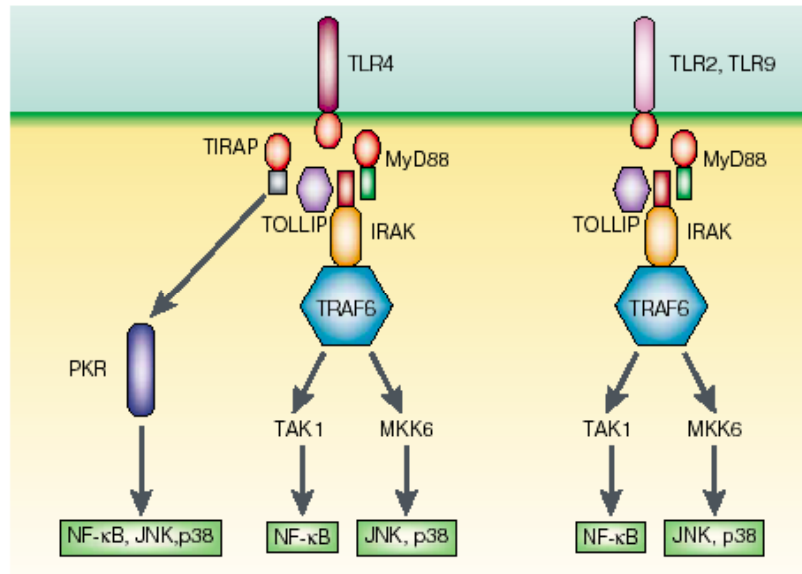
La participación de las MC en angiogénesis parece depender de su capacidad de desgranulación y se ha observado de manera general que los productos secretados por las MC incrementan la vascularidad y la tortuosidad de los nuevos vasos. Este efecto puede observarse en distintos tejidos y uno de los ejemplos mejor documentados es la neovascularización en la arteria mesentérica de rata después de la activación de las MC.

#### **Mediadores angiogénicos producidos por las células cebadas**

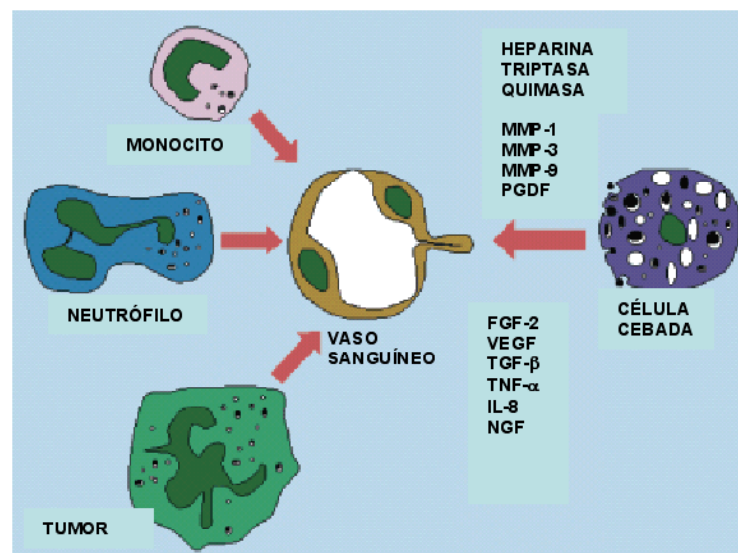
Se han identificado diversos mediadores angiogénicos derivados de las células cebadas, por ejemplo, la heparina que participa estimulando la proliferación de las células endoteliales y la migración de éstas *in vitro*. Por su parte la histamina liberada tiene efectos angiogénicos mediados a través de sus receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> incrementando la permeabilidad de la microvasculatura de ésta manera facilitando la migración de células endoteliales para la formación de nuevos vasos.

Las células cebadas sintetizan y liberan metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9) y proteinasas de serina de dos tipos: triptasa y quimasa. MMP-2 y MMP-9 degradan tanto al colágeno de los tipos IV, V, VII y X como al fibrinógeno, que son componentes del estroma intersticial y de la membrana basal. Esta degradación de la matriz extracelular permite la

neovascularización permitiendo la migración de células endoteliales a zonas avasculares. La triptasa es la proteasa predominante en los gránulos de las células cebadas de piel, pulmón y tracto gastrointestinal. Esta enzima induce crecimiento de capilares y junto con las quimasas participan directamente en la angiogénesis degradando componentes de la matriz extracelular e indirectamente activan metaloproteinasas, lo cual permite tanto la migración y proliferación de células endoteliales (Ver Figura 9). La quimasa también participa de manera importante mediante la producción de angiotensina II, que es un péptido que induce angiogénesis.



**Figura 8.** Sistema de transducción de algunos miembros de la familia de los TLR presentes en las células cebadas. Ver texto para detalles.



**Figura 9.** Mediadores químicos secretados por MC que regulan la formación de vasos sanguíneos.

Otros factores liberados por las células cebadas como Ang1 (angiopoyetina-1), FGF-2 (Factor de crecimiento derivado de fibroblastos -2), VEGF (Factor de crecimiento vascular y endotelial), TGF- $\beta$  (Factor transformante- $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-8 (Interleucina-8), también tienen un efecto importante en la angiogénesis. La Ang-1 estimula la migración de las células endoteliales *in vitro* y a través de su receptor Tie2, localizado en el endotelio vascular, optimiza la manera en la cual las células endoteliales se integran con las células de soporte y de esta manera estabilizan la pared vascular, mientras que el FGF-2 induce el crecimiento de los nuevos vasos formados.

Por su lado, el VEGF (a través de su receptor VEGFR-2) permite el incremento en la permeabilidad vascular permitiendo la extravasación de proteínas plasmáticas, las cuales son el andamio para la migración celular. El TNF- $\alpha$ , junto con el VEGF inducen al factor de transcripción EGR-1, involucrado en la regulación del factor tisular (TF) que a su vez participa en la angiogénesis. IL-8, por su parte, participa en cicatrización, así como en la angiogénesis de tumores.

#### **Estimulos inductores de la liberación de factores angiogénicos.**

Si bien se han caracterizado los mediadores liberados por las células cebadas que producen angiogénesis, no ha sido posible identificar a las moléculas ni a los sistemas de transducción que son activados para inducir su síntesis. Existe evidencia de que la adenosina promueve la angiogénesis a través de la activación de receptores  $A_{2B}$  y  $A_3$  mediante la estimulación de la secreción de factores angiogénicos desde las células cebadas, la estimulación de los receptores  $A_{2B}$  la célula cebada induce la secreción de VEGF e IL-8. Por su parte, la estimulación de receptores  $A_3$  provoca la liberación de angiopoyetina-2. No se ha podido determinar en este caso el origen de la adenosina, que podría liberarse incluso desde la propia célula cebada, en un mecanismo de estimulación autócrino. Por otro lado, se ha demostrado que la estimulación antigénica mediada por el receptor Fc $\epsilon$ RI induce la síntesis de VEGF, fenómeno que podría ser de gran relevancia en el proceso de remodelación del tejido pulmonar observado en el asma alérgica.

#### **La célula cebada como un modelo para estudiar los mecanismos de procesamiento de la información extracelular.**

Hemos dado un vistazo a las diferentes señales que una célula cebada puede recibir y hemos podido apreciar que las consecuencias de cada tipo particular de estímulo determinan que se presente una reacción alérgica, la defensa contra patógenos o la generación de nuevos vasos sanguíneos. Cada población de células cebadas, inmersa en un entorno característico dependiendo del tejido donde se encuentre, recibirá distintos conjuntos de mensajes extracelulares y deberá alterar su fisiología modulando su desgranulación y la síntesis de citocinas dependiendo de un proceso de integración de información (13). Los mensajeros sintetizados y liberados por la célula cebada alterarán, de manera directa o indirecta, el conjunto de mensajes presentes en ese entorno. De esta manera, el fenotipo de una célula cebada, definido como el conjunto de proteínas y vías metabólicas expresadas en un momento dado, es una característica cambiante, modulada por estímulos previos. El responder cuáles son los elementos que controlan la respuesta final, integrando los distintos mensajes sentidos en el exterior de una célula, será, sin lugar a dudas, un campo de enorme actividad de investigación en los años venideros.

## Referencias:

1. García-Sáinz JA. (1996). Hormonas, mensajeros químicos y comunicación celular. Segunda. Edición. Colección "La Ciencia desde México", vol. 28. Fondo de Cultura Económica, SEP, CONACyT. México.
2. Abbas KA, Litchman AH, Pober JS (2000). Cellular and Molecular Immunology, Capítulo 29. Cuarta edición. WB Sanders. Philadelphia, Pennsylvania.
3. Metcalfe DD, Baram D, Mekori Y. (1997). Mast Cells. *Physiol Rev* 77: 1033-1079.
4. Kinet JP. (1999). The high affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI): From physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17: 931-972.
5. Rivera J, González-Espinosa C, Kovarova M, Parravicini V. (2002). *ACI International* 14: 25-36.
6. Rivera, J. (2002). Molecular adapters in Fc $\epsilon$ RI signaling and the allergic response. *Curr Opin Immunol* 15: 688-693.
7. Wilson B, Pfeiffer JR, Oliver JM. (2000). Observing Fc $\epsilon$ RI from the inside of the mast cell membrane. *J Cell Biol* 149: 1131-1142.
8. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, González-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LW, O'Shea J, Rivera J. (2002). Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE dependent mast cell degranulation. *Nature Immunol* 3: 741-748.
9. Zhang C, Beaven M. (1999). The MAP kinases and their role in mast cells and basophils. En: Razin E, Rivera J (eds). *Signal Transduction in mast cells and basophils*. Springer Verlag, Berlin. pp. 247-265.
10. González Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Cid-Martínez ME, Spiegel S, Penninger JM, Rivera J. (2003). Preferential signaling and induction of selected allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* 197: 1453-1465.
11. Marshall J. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature Immunol Rev* 4: 567-573.
12. Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. 6: 389-395.
13. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldeston MA, Piliponsky P, Williams CMM, Tsai M. (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23: 749-786.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LAS CÉLULAS CEBADAS

### Mecanismos que controlan la desgranulación y la síntesis diferencial de citocinas

#### Resumen

La comunicación celular modula distintos cambios mediante los cuales se orquestan respuestas complejas dentro de un organismo. En el sistema inmunológico, los diferentes procesos de transducción de señales permiten que cada célula responda de manera específica con el fin de montar respuestas características que involucran cambios en diversos tejidos. Las células cebadas son un grupo de células especializadas del sistema inmune y son también las responsables de iniciar las respuestas de hipersensibilidad tipo I (comúnmente conocidas como reacciones alérgicas). Su principal sistema de activación depende del entrecruzamiento antigénico del receptor de alta afinidad para la IgE (el receptor Fc $\epsilon$ RI), que une a la fracción Fc de esa inmunoglobulina. El sistema de transducción de este receptor involucra la activación de cinasas de la familia de Src, la formación de complejos macromoleculares en la membrana plasmática, activación de la vía del recambio de fosfoinosínicos-Calcio, la fosforilación de diversas cinasas MAP y la transcripción controlada de un grupo numeroso de genes. Esta maquinaria molecular regula la desgranulación de la célula cebada y la producción de citocinas, responsables de las fases temprana y tardía de las respuestas alérgicas. El mecanismo de control de la especificidad en la síntesis de citocinas parece depender de la intensidad de la señal generada en la membrana de la célula cebada y así, éste tipo celular es capaz de realizar un proceso de integración que le permite generar respuestas específicas a diversos agentes extracelulares. Esta extraordinaria plasticidad de la célula cebada la coloca en un lugar importante en diversos mecanismos de la respuesta inmune innata y en procesos de neovascularización.

**Palabras clave:** Transducción de señales; IgE; célula cebada; alergia; transcripción de genes; citocinas; receptor FcεRI.

## **Semblanza de la Dra. Claudia González Espinosa**



La Dra. Claudia González Espinosa es investigadora del departamento de Farmacobiología del Cinvestav-Coapa. Obtuvo su doctorado en Investigación Biomédica Básica, en la Universidad Nacional Autónoma de México, el 29 de Mayo, 1995. Realizó estancias posdoctorales en el Departamento de Biología Celular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, 1996-1998 y en la Molecular Inflammation Section, del National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, NIH. Bethesda, MD. USA, 1999-2001. Ha publicado diversos artículos científicos en revistas especializadas de su campo, es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel I). Sus líneas de investigación actuales versan sobre los mecanismos moleculares de las respuestas alérgicas, la transducción de señales en células cebadas y sobre aspectos de biología molecular que regulan diferencialmente la transcripción de los genes para citocinas.



---

Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).  
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

---

## EVALUACIÓN DE LA ENSEÑANZA DE BIOQUÍMICA EN ODONTOLOGÍA

Gloria Gutiérrez Venegas

Laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado. Facultad de Odontología.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

[gloria@fo.odonto.unam.mx](mailto:gloria@fo.odonto.unam.mx)

### EVALUATION OF BIOCHEMISTRY TEACHING AT A DENTISTRY SCHOOL

#### Abstract

*Many students believe basic science contents are distant from clinical practice. A high percentage of the students are interested mainly in treating patients and don not fully understand the importance of Biochemistry in dental school syllabus. Consequences are high failure and desertion rate.*

*In order to solve this problem at Facultad de Odontología of the Universidad Nacional Autónoma de México, we worked on three different strategies: experimental biochemistry teaching, multimedia tools and a meeting organization. In the first, a laboratory practice manual for experimental biochemistry teaching was designed and laboratory equipment was acquired. The second strategic line involved the production of textbooks and multimedia compact discs on the following themes: water and pH; carbohydrate metabolism; enzymes kinetics; and hormones. The third line was a meeting organization linking biochemistry and dental research.*

*A survey was designed to evaluate experimental biochemistry teaching. Evaluation considered six aspects of the Experimental Course: Communication, Evaluation, Development of New Abilities, Organizational Environment, Evaluation of the Teaching-Learning Process and Professor's Performance.*

*Finally, we organized the First Oral Biology Meeting to divulge the research work carried out at our Dentistry School. Oral disease epidemiology, cement biology, mouth cancer, molecular mechanisms involved in bilayer formation, genetics of periodontal disease, and bacteria-host*



*communication mechanisms, were among the works presented. Other investigations done at our school included factors involved in caries development and disease caused by mastication disorders; we have also compiled research on peri-apical disease and on the interaction between oral biology and dental materials.*

*A survey was designed to evaluate the quality of the congress. We wanted to find out if students had attended other congress previously, if their perception of basic science subjects had improved, and if these type of events motivate and raise interest in research. With these data we may conclude that to be able to link teaching and research, it is important for students to be aware of schools ongoing research projects, and invite them to participate.*

**Keywords:** Biochemistry Teaching; Multimedia; Research; Dentistry.

---

## **Introducción**

Los cursos de bioquímica dirigidos a los estudiantes de odontología representan un gran reto académico, porque a pesar de que por mucho tiempo se ha argumentado que las ciencias biomédicas son una poderosa herramienta para el tratamiento de pacientes y aunque es posible que los avances que surjan en esta área sean la estrategia que se utilice a mediano plazo en la práctica clínica, las ciencias básicas continúan siendo poco apreciadas en la comunidad de la educación dental (1-8).

Baum (4,6) comenta que aunque los estudiantes en Norte América tienen acceso a revistas especializadas, revisiones bibliográficas y a redes de cómputo, muchos de ellos transcurren por la escuela de odontología sin recibir ninguna experiencia relacionada con los progresos en las ciencias biomédicas. En la escuela de odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, los estudiantes por mucho tiempo han considerado que en los primeros años de la carrera deben memorizar conceptos científicos que son irrelevantes o que en un futuro cercano dejarán de lado por que en la práctica clínica no tendrán ninguna utilidad.

Por otra parte Hendricson (9) comenta que la reducción en el tiempo de práctica clínica es un punto de "no comienzo" ya que la formación en odontología es en esencia técnica. Lo mismo sucede en la escuela de odontología en México en donde los estudiantes consideran que la asignatura de bioquímica que se imparte en el primer año de la carrera presenta contenidos muy complejos y que en ocasiones resulta difícil su comprensión, lo que conlleva a un bajo desempeño como lo demuestra el porcentaje de alumnos no acreditados en el año de 1995 el cual fue del 35%. A partir de esta fecha y con el propósito de abordar esta problemática de no acreditación y para lograr motivar a los estudiantes para que ingresen en los proyectos de investigación y los programas de doctorado, se diseñó y puso en marcha un ambicioso proyecto en el que los estudiantes que cursan la asignatura de bioquímica deben recibir de manera simultánea formación teórica y experimental. Para cumplir con este propósito, se integró a la planta docente un grupo de jóvenes odontólogos que están inscritos en el programa de posgrado en Ciencias Odontológicas y se diseñó un Manual de Prácticas de Bioquímica, en donde los estudiantes se familiarizan con las técnicas experimentales básicas de la bioquímica a través del manejo de muestras que provienen de la cavidad oral. En el manual se incluyen doce prácticas experimentales en donde se manejan las técnicas más ampliamente utilizadas en bioquímica como son la cromatografía, la electroforesis, la cuantificación de proteínas y los carbohidratos, la titulación ácido-base, la transformación bacteriana y los mapas de digestión de los plásmidos. De

igual forma se revisan protocolos de investigación y búsqueda bibliográfica de artículos relevantes en el área dental; todo esto permite introducir a los estudiantes en el manejo del método científico y contribuir en el desarrollo de un pensamiento lógico y crítico. Así mismo se ha diseñado material didáctico y de multimedia que facilitan la comprensión de los temas que los alumnos consideran complejos. Finalmente se organizó un congreso de Biología Oral, cuyo objetivo fue mostrar a los alumnos la importancia de la bioquímica en la Investigación Odontológica.

Con el propósito de evaluar, si las actividades implementadas en el departamento de Bioquímica, favorecen y motivan a que los alumnos mejoren su desempeño en la asignatura, se elaboraron y analizaron encuestas para que sus resultados nos permitan tomar nuevas decisiones en cuanto al diseño de nuevos protocolos experimentales. Por este motivo, el objetivo de este estudio consistió en la evaluación que realizan los estudiantes sobre el desempeño de los profesores en la enseñanza experimental, sobre el material didáctico y sobre el Congreso de Biología Oral. Nuestros resultados mostraron que la evaluación del desempeño docente por parte de los alumnos es una herramienta muy poderosa para que los docentes incorporen elementos de la evaluación en el mejoramiento de la práctica docente, que el material multimedia facilita la comprensión de la bioquímica y que la asistencia a los congresos motiva a los alumnos a estudiar bioquímica y los estimula para ingresar en diferentes proyectos de Investigación.

## **Resultados**

### **Evaluación de la enseñanza experimental**

En el ciclo escolar 2000-2001, el 79.6% (n=499) de la población estudiantil participó en la encuesta de forma anónima de un total de 627 estudiantes inscritos en dicho ciclo escolar. Para el ciclo escolar 2001-2002, el porcentaje de participación fue del 62.4% (n=430) de los 689 estudiantes del mismo nivel que cursaron la materia de Bioquímica. Por ser una encuesta anónima se omitió la edad y el género de los participantes en la encuesta.

En la tabla 1 se pueden observar la media y desviación estándar ( $\pm$  D.E.) de los porcentajes de evaluación por categorías y en su conjunto de la evaluación. Nuestros resultados muestran que existió un incremento con diferencias significativas en la evaluación que realizaron los escolares para el ciclo escolar 2001-2002 en comparación con el ciclo anterior. En específico, la habilidad que tuvo el profesor en transmitir sus ideas y la forma en que favoreció la adquisición de nuevos conocimientos (comunicación), se observó un 5.1% de incremento. En el seguimiento del desempeño del alumno por el profesor (evaluación), se obtuvo un incremento del 5.5% con relación al ciclo 2000-2001. Al preguntar a los alumnos si las prácticas de laboratorio contribuyeron al desarrollo de un razonamiento analítico (habilidades), se obtuvo un 7.5% mayor de lo que se presentó en el ciclo anterior. Cuando el alumno fue cuestionado sobre la realización de las prácticas de laboratorio y si éstas se desarrollaban bajo un ambiente adecuado promovido por el profesor (clima organizacional), se obtuvo una evaluación favorable superior del 5.2% que en ciclo anterior. Se observó un incremento del 4.7%, en la supervisión del trabajo de los alumnos por parte del profesor y en como resolvía las dudas que se presentaban durante la práctica y si discutían los conceptos adecuadamente (proceso enseñanza-aprendizaje) y finalmente se obtuvo un 5.5% de incremento en el cumplimiento de las reglas establecidas dentro del laboratorio, así como las reglas de seguridad e higiene (Desempeño del Profesor), en comparación con el ciclo pasado. En la evaluación global se observó un incremento del 5.4% en

el desempeño de las prácticas de laboratorio en el curso de bioquímica. Las diferencias que se observaron entre un ciclo y otro en las medias por categorías de evaluación y en su conjunto, fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 1.** Comparación de la media del porcentaje de evaluación por los alumnos del curso práctico de Bioquímica (puntaje obtenido/puntaje máximo X100)

Categorías de evaluación	Ciclo escolar	
	2000-2001 (n=499) Media (D.E.)	2001-2002 (n=430) Media (D.E.)
Comunicación	75.46 (17.25)	80.54 (15.25)*
Evaluación	83.21 (14.48)	88.66(10.93)*
Desarrollo de nuevas Habilidades	70.90(21.10)	78.38(18.33)*
Clima Organizacional	76.00(18.25)	81.17(14.84)*
Evaluación del proceso enseñanza-aprendizaje	78.80(17.46)	83.51(15.02)*
Desempeño del profesor.	85.17(15.54)	90.58(11.51)*
Total	78.58(14.43)	84.04(11.65)*

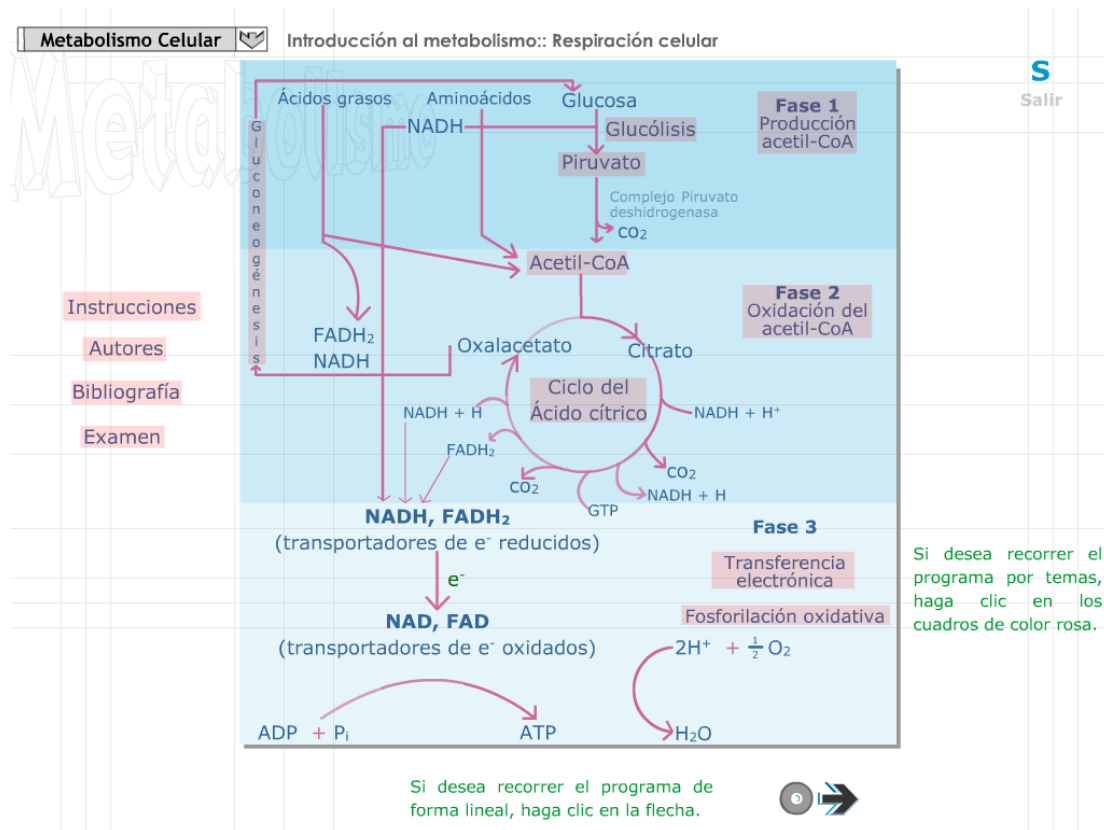
\*Prueba "t" de Student  $p < 0.001$

### Realización del Material Multimedia

Para la elaboración del multimedia se realizó la combinación de audio digital, imágenes digitales, video digital, y toda otra información digital que una computadora pueda desplegar o presentar, tal como gráficos, animación, datos y texto (Figuras 1-4).

En el ciclo escolar 2002-2003 participaron 50 estudiantes que utilizaron como apoyo didáctico en materiales de multimedia. Nuestros resultados mostraron que todos los alumnos tienen acceso a equipo de cómputo y que no requirieron de soporte técnico para acceder al material de multimedia, así mismo no mostraron dificultad en la utilización, búsqueda y exploración del programa (95%).

El 88% consideró que los materiales de multimedia favorecen la enseñanza en bioquímica. De igual forma pensaron que es una herramienta muy poderosa que va a modificar los métodos de enseñanza. Sin embargo, consideraron (70%) que la utilización del multimedia no es un sustituto del profesor y que requieren así mismo de libros de texto (72%) para profundizar en los contenidos del material de multimedia. Así mismo, encontramos que el 60% de los alumnos trabajó en equipo. Finalmente al comparar el desempeño de los alumnos que utilizaron el multimedia como una herramienta accesoria a las clases junto con el libro de texto, obtuvieron una mejoría en la calificación del 18.2%.



**Figura 1.** Presentación. Todos los multimedia contienen una sección introductoria la cual es opcional y que al pasar a la siguiente pantalla se mostrará la presentación del multimedia. Todo el texto encuadrado en rosa permite la navegación en los contenidos del multimedia.

### Evaluación del Congreso de Biología Oral

El 81.2% (n=415) de la población estudiantil participó en la encuesta de forma anónima de un total de 511 estudiantes inscritos en el ciclo escolar 2005-2006. Nuestros resultados mostraron que el 12.1% (n=50) de los alumnos ya habían asistido a algún congreso relacionado con el área odontológica. La gran mayoría de los alumnos sabían que la facultad tiene una División de Estudios de Posgrado y que en ella se realiza investigación, 92.5% y 75.2% respectivamente. De igual forma, la mayoría de los alumnos (n= 323) consideraron que el Congreso los motivó para ingresar a realizar investigación. Un alto porcentaje de los alumnos (75.3%) consideraron que la investigación que se realiza en el posgrado está encaminada a resolver problemas en la salud buco-dental. El 59.8% se interesó por asistir a más congresos relacionados con el área odontológica. Así mismo los alumnos consideraron que requieren un mayor conocimiento en Ciencias Básicas para la comprensión de las ponencias. Finalmente los investigadores que participaron en el Congreso realizaron un artículo sobre los avances de sus proyectos de investigación, los cuales se recopilaron y editaron en un libro (Figura 5)



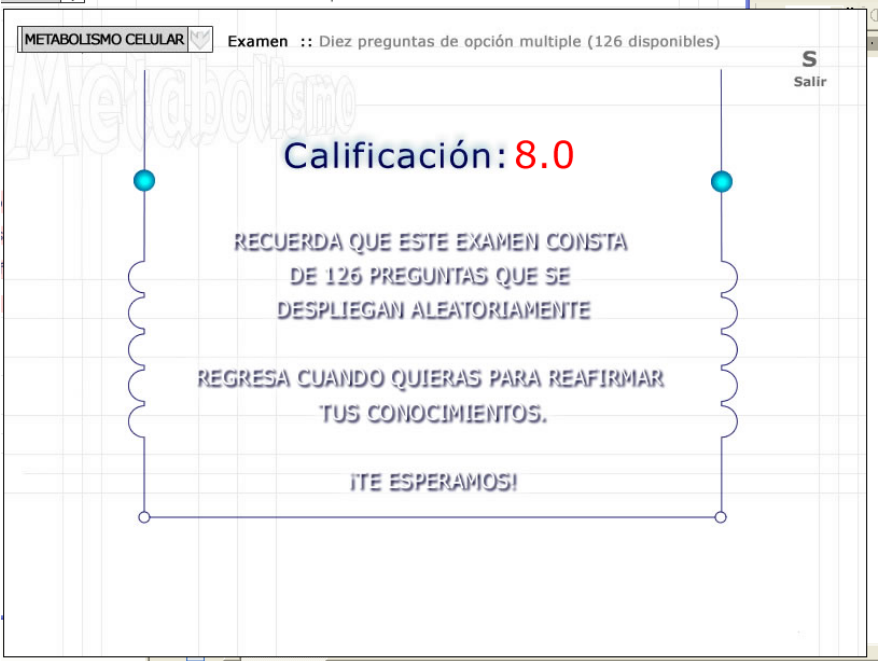
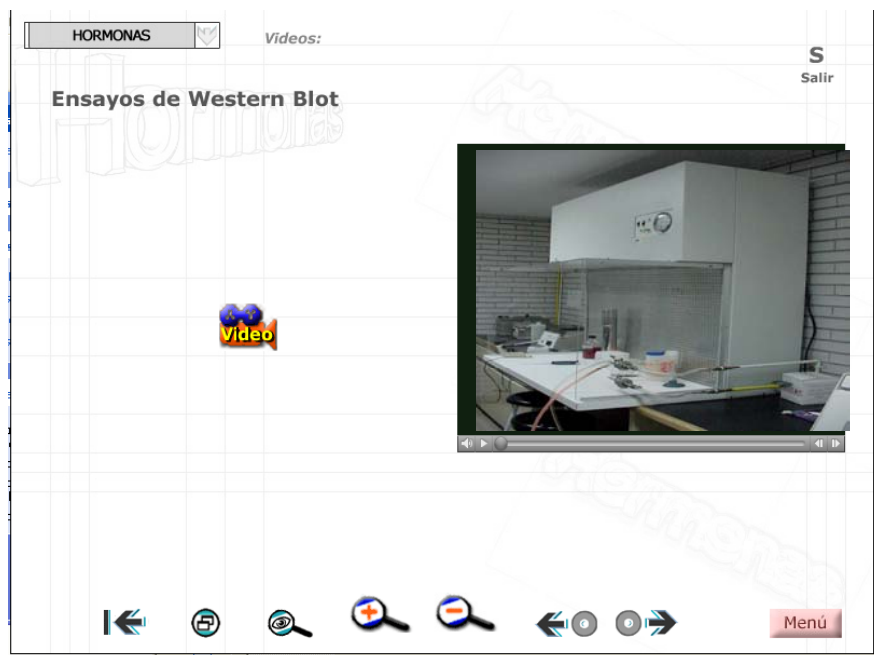


Fig. 3 Examen. Todos los multimedia contienen un banco de preguntas para el usuario se autoevalúe. En cada sesión de estudio despliegan 10 preguntas y al término indica la calificación obtenida.

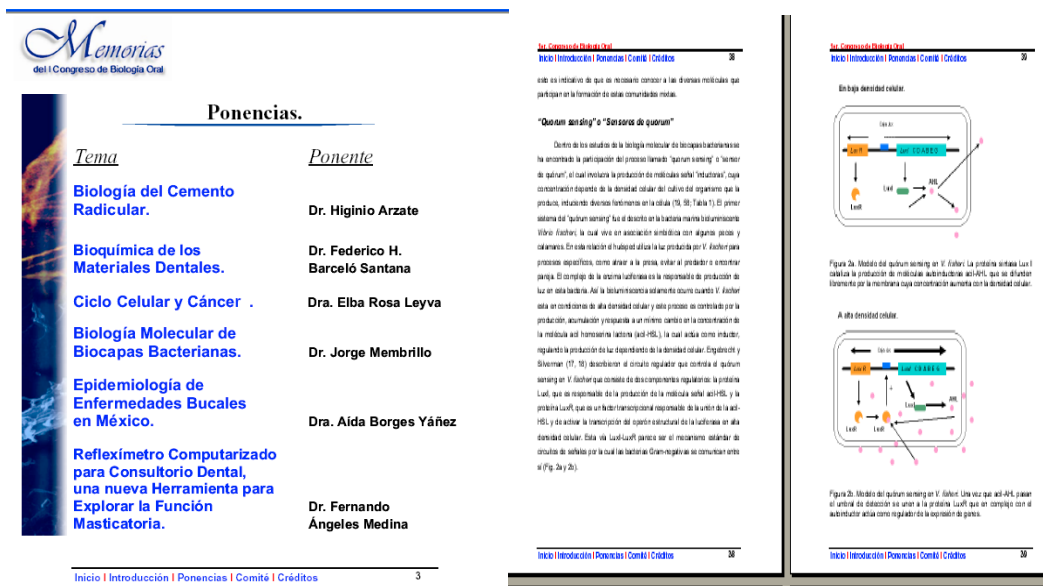
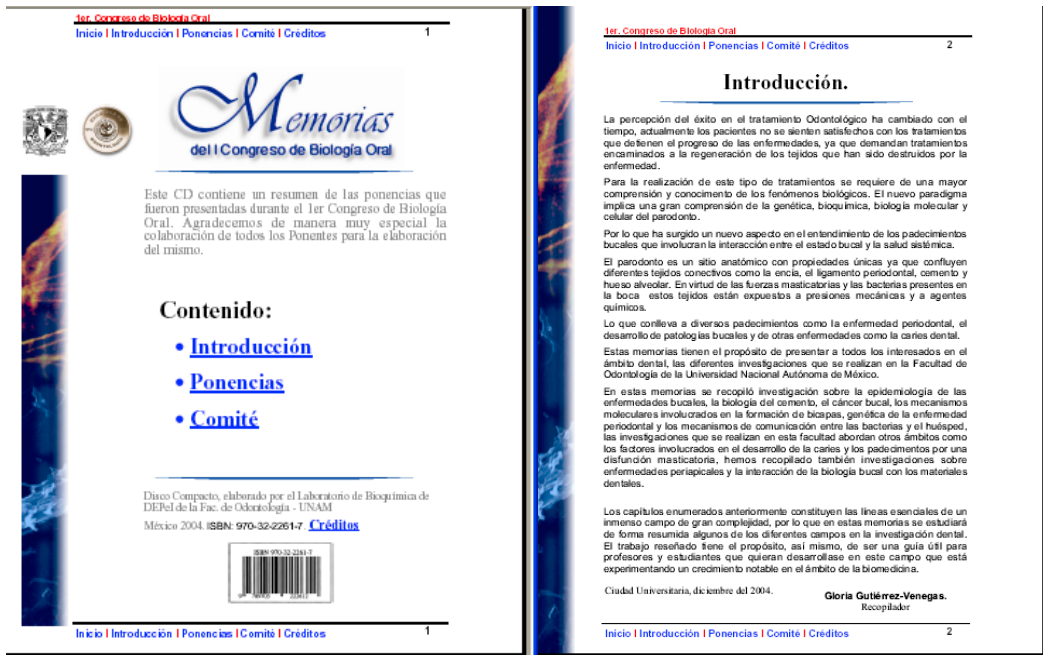


**Fig. 4 Videos.** En cada multimedia se coloca una sección de videos en la que se muestran a los estudiantes las técnicas se realizan en investigación para el conocimiento de algún tema.

## Discusión

Una de las principales problemáticas detectadas en la carrera de Odontología en México consiste en el deficiente rendimiento en las áreas de ciencias básicas y en específico en bioquímica. Los estudiantes consideran que esta materia esta llena de contenidos temáticos complejos y que no encuentran una aplicación práctica con la clínica. De Paola y colaboradores (1) mencionan que presentan una problemática similar en América del Norte y Europa. Estos autores señalan que la información que se obtiene de las ciencias básicas puede ser una herramienta importante para ser utilizada en la prevención y control de las enfermedades dentales. Mencionan así mismo, que la formación de los profesionales de la salud dental continúa enfocada en la Odontología restauradora. En México existe un enfoque similar, a pesar de que no se han podido prevenir y controlar las principales enfermedades como es la caries y la enfermedad periodontal.

Con la finalidad de evaluar el rendimiento del desempeño de los profesores de la materia, se diseñó un cuestionario en donde de forma anónima, los estudiantes evaluaron a los profesores en dos diferentes periodos. Encontramos que en las cinco categorías evaluadas se muestra una mejoría significativa en el último periodo. En la categoría de comunicación, los alumnos evalúan más satisfactoriamente a los profesores, lo que nos sugiere que se ha mejorado la relación de la teoría con la práctica y la relación de esta materia con otras asignaturas del Plan de Estudios. En la categoría de evaluación, encontramos que los profesores



**Fig. 5** Elaboración de las Memorias del Primer Congreso de Biología Oral. Las memorias se presentaron en versión de Disco Compacto. En la parte superior se muestra la presentación del libro e introducción y en la parte inferior una de las páginas del índice de los ponentes y una imagen de los artículos. La navegación del disco se realiza señalando el texto que está en coloración azul.



se apegan a las reglas establecidas en el departamento. Sin embargo, en la categoría de habilidades, aunque existen diferencias significativas, el promedio de evaluación está por debajo del 80% (puntaje máximo 100%). Al discutir esta problemática en el departamento de Bioquímica, los profesores señalan que este resultado se debe a que los grupos son numerosos y a que el profesor no puede supervisar con mayor detenimiento el proceso de desarrollo de las prácticas. Para abordar esta problemática en el presente periodo el 50% de los grupos cuenta con dos profesores y al término del curso se evaluará esta intervención. Los alumnos evalúan de forma satisfactoria la categoría de clima organizacional, lo que nos muestra que se sienten motivados por aprender más acerca de la Bioquímica.

En la categoría de evaluación del proceso enseñanza- aprendizaje, los alumnos expresan que existe una interacción favorable entre el alumno y el profesor lo que permite la discusión de los diferentes tópicos tratados en las prácticas. En lo que se refiere a la categoría de cumplimiento, los alumnos consideran que los profesores se apegan a los lineamientos establecidos al inicio del curso, la evolución global es muy favorable y por encima del 80%.

En conclusión, la evaluación que realizan los estudiantes sobre las actividades en el departamento de Bioquímica son una herramienta muy valiosa, ya que los profesores al recibir y analizar de forma personal su evaluación, pueden mejorar su desempeño en las categorías poco favorables y permite así mismo que las modificaciones se realicen de forma conjunta por el departamento y de esta forma los estudiantes del primer año reciban la misma calidad de enseñanza en Bioquímica experimental. Por otra parte la utilización del material de multimedia es una herramienta muy valiosa como apoyo a las actividades docentes y finalmente la organización de eventos permite el acercamiento de los estudiantes con las actividades de investigación que se realizan en la facultad.

Finalmente como parte del fortalecimiento de la enseñanza en Bioquímica, desde el año de 2000 se inició un proyecto de investigación odontológica que consiste en estudiar a la enfermedad periodontal que es la principal causa de pérdida dental. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación en las encías ocasionada por la infección de bacterias gram negativas. Los lipopolisacáridos (LPS) están presentes en la pared celular de las bacterias gram negativas y promueven la inducción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en fibroblastos gingivales humanos. El objetivo del proyecto consiste en caracterizar los mecanismos de transducción que se activan en fibroblastos gingivales en respuesta al tratamiento con LPS de las bacterias *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, microorganismos asociados a periodontitis muy severas. Hemos encontrado que los LPS inducen un rápido y marcado incremento en la fosforilación de las proteínas activadas por mitógenos (p-38, ERK y JNK) en fibroblastos gingivales humanos. La interrupción de la vía de transducción de p38 por el pretratamiento con el inhibidor específico SB203580 y la posterior estimulación con LPS bloquea completamente la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la síntesis de óxido nítrico. Por otra parte la inhibición de p38 bloquea de forma parcial la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX2) y la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2). En conclusión nosotros encontramos que p38 está involucrada en la inducción de iNOS y participa en la expresión de COX2 y la síntesis de PGE2. Así mismo los LPS inducen la activación de p38 y de la proteína cinasa B en un evento mediado por los receptores TLR-4 (10,11,12).

## **Materiales y Métodos**

### **Evaluación de la enseñanza experimental**

El estudio se desarrolló al final de los ciclos 2000-2001 y 2001-2002 con la finalidad de comparar el desempeño de los profesores involucrados con la enseñanza experimental en dichos periodos, de acuerdo a la percepción de los estudiantes que cursaron la materia de Bioquímica como parte de su formación como Cirujano Dentista. En dicho curso los estudiantes complementaron sus conocimientos teóricos con las prácticas de laboratorio, las cuales permitieron integrar el conocimiento y su aplicación en la clínica.

### **Cuestionario de evaluación del Desempeño de los Profesores involucrados con la enseñanza experimental**

Los cuestionarios se repartieron a todos los estudiantes del primer año de la Facultad de Odontología de la UNAM, junto con la explicación del propósito del estudio. La participación fue voluntaria y de forma anónima. Aproximadamente se requirieron 20 minutos para completar el cuestionario.

El cuestionario consiste en 25 preguntas organizadas en forma aleatoria en donde se evalúan cinco categorías: 1) Comunicación ( determina si el maestro comunica con claridad sus ideas y si los contenidos temáticos se relacionan con otras asignaturas); 2) Evaluación ( consiste en el cumplimiento del profesor en cuanto a las reglas establecidas al inicio del curso); 3) Desarrollo de nuevas habilidades (consiste en que los alumnos determinen si el curso sirvió para aprender a analizar y resolver problemas); 4) Clima Organizacional (determina si el profesor promovió un ambiente propicio en el laboratorio); 5) Evaluación del proceso enseñanza - aprendizaje (se refiere a la supervisión y análisis por parte del profesor de los resultados obtenidos); 6) Desempeño del Profesor (se refiere al respeto por las reglas de seguridad e higiene y cumplimiento) (Tabla 2).

### **Índice del desempeño de la enseñanza experimental**

Se obtuvo de la sumatoria de cada una de las categorías antes mencionadas. Comunicación ( 4 preguntas por 5 que es el valor máximo de la evaluación lo que da un puntaje de 20 ); Evaluación ( 6 preguntas por 5 que es el valor máximo de la evaluación lo que da un puntaje de 30); Desarrollo de nuevas habilidades ( 3 preguntas por 5 que es el valor máximo de la evaluación lo que da un puntaje de 15 ); Clima Organizacional ( 5 preguntas por 5 que es el valor máximo de la evaluación lo que da un puntaje de 25); Evaluación del proceso enseñanza – aprendizaje ( 4 preguntas por 5 que es el valor máximo da un puntaje de 20 ); Desempeño del profesor (3 preguntas por 5 que es el valor máximo da un puntaje de 15 ) la suma de estos es igual a 125 y sacar el porcentaje de multiplicó por 100. Lo que se ilustra en la ecuación que se presenta a continuación. (Tabla 3)

$$IDPL = \frac{\sum [(Comunicación) + (Evaluación) + (Desarrollo de nuevas habilidades) + (Clima Organizacional) + (Evaluación del proceso enseñanza aprendizaje) + (Desempeño del Profesor)]}{125} \times 100$$

### **Recopilación del Contenido Educativo para el desarrollo de multimedia**

En la primera etapa se realizó la recopilación de información que debía contener el Programa Multimedia.

**Tabla 2.** Categorías y elementos de evaluación aplicados por los alumnos del Curso Práctico de Bioquímica

Categorías de evaluación	Elementos de evaluación	Puntaje máximo
Comunicación	Comunica sus ideas con claridad.	20
	Relaciona los contenidos del laboratorio con la teoría.	
	Relaciona los contenidos del laboratorio con otras asignaturas.	
Evaluación	La realización de las prácticas me aporta nuevos conocimientos.	30
	Cumple con las normas de evaluación establecidas.	
	Entrega con prontitud las calificaciones. Indica los criterios de evaluación.	
	Me entrega corregidos los informes de cada práctica.	
Desarrollo de nuevas Habilidades	En los exámenes de laboratorio se evalúan los contenidos del curso.	15
	El sistema de evaluación utilizado me motiva a trabajar con más cuidado.	
	Fomenta el desarrollo de nuevas habilidades. Fomenta el desarrollo de mi capacidad para analizar y resolver problemas.	
Clima organizacional	Conduce la práctica de manera que se estimula el proceso de toma de decisiones.	25
	Propicia un clima de respeto en el laboratorio. Promueve que exprese mis ideas con claridad. Estimula mi participación en la discusión de la práctica.	
	Despierta mi interés por el laboratorio. Propicia el trabajo de equipo cuando la situación lo requiere.	
Evaluación del proceso enseñanza-aprendizaje	Supervisa mi trabajo en el laboratorio. Resuelve las dudas que surgen durante la práctica.	20
	Analiza con el grupo los resultados obtenidos en la práctica.	
	Los conceptos involucrados en la práctica se discuten adecuadamente.	
Desempeño del Profesor	Cumple con el horario establecido. Promueve el seguimiento de las reglas de higiene y seguridad.	15
	Cumple con las reglas establecidas al inicio del curso.	
	Total	

### Autoría del programa multimedia

Para la elaboración del multimedia educativo, se utilizaron programas de desarrollo multimedia como Director 8.5, Authorware 5.0 ambos en Macromedia y Flash. Para la incorporación de elementos de audio, video, imagen y texto se recurrió a la utilización de programas de cómputo destinados a la creación, edición y manipulación de cada uno de estos medios, así como aparatos y equipo especial para su captura y digitalización. Para la captura de los videos digitales se utilizó la tarjeta Buz de Iomega, después se editaron en el programa Adobe Premiere 6.0 y se optimizaron con Quick Time 5.0 de Apple. El audio digital fue grabado por un micrófono Shure SM58 por vía del puerto de entrada de audio de una Apple Macintosh G5, para su captura, edición y optimización mediante el programa Sound Edit 16 de Macromedia y Deck II de Bias. Para la sincronía entre el audio y video se utilizó la aplicación Pro/Tools LE 5.0 de Digidesign.

**Tabla 3.** Criterios para la frecuencia del puntaje de evaluación

Frecuencia	Puntos
Casi nunca	1
Algunas veces	2
Regularmente	3
Frecuentemente	4
Casi siempre	5

### Evaluación de los programas multimedia

Al término de la utilización del Programa Multimedia se realizó una encuesta que buscó reforzar los datos recabados por el programa, pidiendo la opinión a los alumnos. Esta encuesta se dividió en dos partes. En la primera se realizaron preguntas sobre las características del programa multimedia y en la segunda sobre su importancia como auxiliares en la enseñanza y en la computación.

### Índice del Desempeño para Profesor de Laboratorio (IDPL)

$$IDPL = \frac{\sum [(Comunicación) + (Evaluación) + (Desarrollo de nuevas Habilidades) + (Clima organizacional) + (Evaluación del proceso enseñanza-aprendizaje) + (Desempeño del profesor)]}{125} \times 100$$

### Recopilación de información sobre el uso del multimedia

La información sobre el uso que se dio al multimedia se realizó mediante su recopilación en discos de 3.5" utilizados por cada alumno, lo que permitió conocer el índice de utilización del programa multimedia, así como los resultados de las diferentes interactividades y exámenes de contenidos dentro del mismo.

### **Clasificación del tiempo que emplearon los alumnos en la utilización del programa multimedia**

El tiempo que emplearon los alumnos en la utilización del programa multimedia se analizó midiendo los tiempos totales de las sesiones por unidad, con lo que se buscó conocer el tiempo de utilización por alumno de cada una de las unidades contenidas en el multimedia. Los tiempos se dividieron en cuatro intervalos: de 0 a 15 min; de 16 a 30 min; de 31 a 45 min y más de 45 min.

### **Cuestionario de evaluación del Congreso de Biología Oral**

Este texto es igual al del resumen. Los cuestionarios se repartieron a los asistentes al congreso que en su mayoría eran estudiantes del primer año de la Facultad de Odontología, UNAM, junto con la explicación del propósito del estudio. La participación fue voluntaria y de forma anónima. El cuestionario se llenó en un tiempo aproximado de 10 a 15 minutos.

El cuestionario consistió en 13 reactivos organizados en forma aleatoria en donde se evaluó la participación de los alumnos en otros Congresos, la calidad del mismo, la importancia de las ciencias básicas en la investigación Odontológica y el interés por ingresar a realizar investigación.

### **Análisis de resultados**

Consistió en chi-cuadrada. Utilizando el programa SPSS para Windows, versión 12.

### **Agradecimientos**

Agradecemos a la Dirección de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyecto PAPIME-EN205403 y PAPIT-IN224398, por el financiamiento de este proyecto.

### **Referencias**

1. Baum BJ. (1991). Has modern biology entered the mouth? The clinical impact of biological research. *J. Dent. Educ.* 55: 299-303.
2. Baum BJ. (1992). Commentary on "education for dental practice in the year 2005: a beginning dialogue". *J.Dent. Educ.* 56: 377-378.
3. Baum BJ. (1996). The dental curriculum: what should be new in the 21<sup>st</sup> century. *J. Public Health Dent* 56: 286-290.
4. Baum BJ. (1997). The absence of a culture of science in dental education. *Eur J Dent Educ.* 1: 2-5.
5. Baum BJ. (2003). Can Biomedical science be made relevant in dental education. A North American perspective. *J. Dent. Educ.* 7: 49-55.
6. Nash DA. (1998). "And the band played on....". *J. Dent Educ* 62: 964-974
7. Maudsley G, Strivens J. (2000). Science, critical thinking and competence for tomorrow's doctors. A review of terms and concepts. *Med Educ*34:53-60
8. Mc Manus IC. (1991). How will medical education change? *The Lancet* 337:1519-1521.
9. Hendricson WD, Cohen PA. (2001). Oral health care in the 21<sup>st</sup> century: implications for dental and medical education. *Acad. Med* 76: 1181-1206.
10. Gutiérrez-Venegas G., Maldonado-Frías S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cárdenas P. (2005). Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci.* 77: 60-73.
11. Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Portillo Garcés C, Pérez-Garzón M, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S. (2005). Luteolin effect on lipopolysaccharides actions on human gingival fibroblasts. *Int. J. of Biochem. and Cel. Biol.* (en prensa).

12. Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki- Cárdenas P, Cruz-Arroyo SR, Pérez-Garzón M. (2005). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates the phosphorylation of p44 and p42 MAP kinases through CD14 and TLR-4 receptor activation in human gingival fibroblasts. Life Sci (en prensa).

## EVALUACIÓN DE LA ENSEÑANZA DE BIOQUÍMICA EN ODONTOLOGÍA.

### Resumen

Las ciencias básicas abordan una serie de contenidos temáticos que en ocasiones son considerados muy lejanos de la práctica clínica, por esta razón un gran porcentaje de los estudiantes, cuyo propósito fundamental es el manejo de pacientes, no identifican la importancia de la asignatura de Bioquímica en el plan de estudios de la carrera. Por este motivo esta asignatura presentaba un alto índice de no acreditación y de deserción.

Para resolver esta problemática en la escuela de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se ha trabajado en tres frentes. En el primero, mediante la implementación de la enseñanza experimental en Bioquímica, para lo cual se elaboró un manual de prácticas y se adquirió el equipo. En el segundo mediante la elaboración de libros y discos multimedia, de los temas específicos de agua y pH, metabolismo de carbohidratos, cinética enzimática y hormonas. En tercer lugar mediante la organización de congresos que relacionen a la Bioquímica con la Investigación Odontológica.

Para analizar la enseñanza de Bioquímica se han diseñado encuestas que evalúan cada uno los puntos antes mencionados. Las encuestas se resolvieron de manera anónima y voluntaria. La evaluación de la enseñanza experimental abordó seis aspectos del curso experimental que consistieron en: Comunicación, Evaluación, Desarrollo de nuevas habilidades, Clima organizacional, Evaluación del proceso de enseñanza-aprendizaje y Desempeño del profesor. La evaluación del curso experimental se llevó a cabo por medio de la obtención de medias y desviación estándar ( $\pm 1$  DE), se compararon las medias y su conjunto a través de la prueba *t* de Student para muestras independientes, utilizando el programa SPSS para Windows, versión 12.

Para la evaluación de la enseñanza experimental un total de 499 estudiantes participó por el ciclo 2000-2001 y 430 durante el ciclo 2001-2002. La media del 2000-2001 vs. 2001-2002 de las diferentes categorías fueron las siguientes: Comunicación  $75.46 \pm 17.25$  vs.  $80.54 \pm 15.25$ , Evaluación  $83.21 \pm 14.48$  vs.  $88.66 \pm 10.93$ , Desarrollo de nuevas habilidades  $70.90 \pm 21.10$  vs.  $78.38 \pm 18.33$ , Clima Organizacional  $76.00 \pm 18.25$  vs.  $81.17 \pm 14.84$ , Evaluación del proceso enseñanza- aprendizaje  $78.80 \pm 17.46$  vs.  $83.51 \pm 15.02$ , Desempeño del profesor  $85.17 \pm 15.54$  vs.  $90.58 \pm 11.51$ . La media de la evaluación de la enseñanza experimental entre el periodo 2000-2001 y 2001-2002 fue la siguiente  $78.58 \pm 14.43$  vs.  $84.04 \pm 11.65$  respectivamente. Las diferencias que se observaron entre un ciclo y otro fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

Para la evaluación de los libros y discos multimedias se entregó el material a 50 alumnos distribuidos en los turnos matutino y vespertino para que estudiaran de forma coordinada con la revisión del contenido temático con el profesor. Al concluir con los contenidos temáticos a los se evaluó a los alumnos. Así mismo se les repartió un cuestionario que consistió en 23 preguntas dirigidas a evaluar la calidad del multimedia. Para el análisis de los resultados se determinó la diferencia estadística mediante la prueba de ANOVA, posteriormente se realizó la prueba poshoc de Scheffe para detectar la diferencia entre los grupos. Las pruebas se realizaron con un nivel de confianza del 95%. Nuestros resultados mostraron que los alumnos que utilizaron los materiales

multimedia como herramienta de aprendizaje obtuvieron mejores resultados en comparación con los alumnos que no lo utilizaron (85.6% y 67.4% respectivamente  $p=0.01$ ).

Por otra parte, la mayoría de los estudiantes se mostraron entusiasmados con esta estrategia de aprendizaje (88%); consideraron de igual forma que es una herramienta muy efectiva (95%) y finalmente la mayoría de los estudiantes prefirieron estudiar en multimedia para reforzar los contenidos del libro de texto (82%). Sin embargo, una tercera parte consideró que el multimedia es un auxiliar didáctico pero no sustituye al profesor. Con los datos recopilados podemos concluir que el programa multimedia permite servir como auxiliar en la enseñanza de la materia de Bioquímica.

Finalmente, con el propósito de divulgar las investigaciones que se realizan en la Facultad de Odontología se efectuó el Primer Congreso de Biología Oral. A fin de evaluar la calidad del Congreso se diseñó una encuesta para establecer si los alumnos tenían experiencia previa de asistencia a otros congresos, si mejoraba la percepción de las materias básicas y finalmente para establecer si estos eventos motivan y despiertan el interés por la investigación. La encuesta consistió de 13 reactivos y fue contestada de manera voluntaria y anónima y les llevó aproximadamente de 10 a 15 minutos concluirla.

Encontramos que de los 415 participantes, solo el 27% ( $n = 112$ ) había asistido anteriormente a un congreso. De estos 112 alumnos, 85 habían asistido a Congresos del área biológica y solo 50 del área Odontológica. En su mayoría los alumnos sabían que la Facultad cuenta con una División de Estudios de Posgrado (92%) y sabían que en ella se realiza investigación (75%) y el 31% reconoce que el Congreso los motivó para ingresar a realizar investigación y finalmente el 89% consideró que requieren de mayor formación en ciencias básicas para la comprensión de la investigación odontológica.

Con estos datos podemos concluir que para promover la vinculación entre docencia e investigación, es importante mostrar a los alumnos la investigación que se realiza en la Facultad a la pertenecen y de esta forma invitarlos a que participen en proyectos de investigación.

**Palabras clave:** Enseñanza de Bioquímica, Multimedia, Investigación, Facultad de Odontología.

## Semblanza de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.



Es bióloga de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (1985) y maestra y doctora en Ciencias Químicas – Bioquímica- de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó la tesis de Licenciatura en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química bajo de tutoría de la Dra. Irma Bernal Lugo en “Factores Bioquímicos involucrados en el envejecimiento del Frijol”. La tesis de maestría bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García-Saíenz sobre la “Caracterización de los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos en plaquetas” y la tesis doctoral con el Dr. Jesús Adolfo García Saíenz sobre la “Caracterización de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en hepatocitos de pollo”. Ha trabajado como profesor de asignatura en Bioquímica Experimental en la Facultad de Química desde 1989 y como profesor de asignatura en Bioquímica en la Facultad de Odontología desde 1994. Desde el año de 1995 es Coordinador de Bioquímica en la Facultad de Odontología. En 1998 inició el proyecto de investigación sobre la “Caracterización de los mecanismos de transducción por lipopolisacáridos de bacterias periodontopatógenas en fibroblastos gingivales humanos” Tiene 12 artículos internacionales publicados y 7 artículos nacionales que han recogido más de 100 citas internacionales. También ha publicado 21 libros y 3 multimedias. Ha dirigido 56 tesis de licenciatura y 5 de maestría y actualmente dirige tres tesis de maestría y 3 de licenciatura. Por sus investigaciones ha obtenido 6 premios Nacionales y un premio internacional.