

Mensaje Bioquímico

Temas Bioquímicos de Vanguardia 2003



Editores: H. Riveros-Rosas; O. Flores-Herrera;
A. Sosa-Peinado; E. Vázquez-Contreras.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM





Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

Editorial

Ser editor de un libro es un trabajo delicado, hay que estar pendiente de muchos detalles y ninguno de ellos es menos importante que otro. Si además la edición del libro, está estrechamente ligada a la presentación oral de un resumen de cada capítulo de la edición, por el autor, un distinguido científico, el proceso se hace más laborioso. Hay que tomar en cuenta que el libro se edita desde hace veintiséis años y las conferencias se imparten hace veintinueve; para los editores-organizadores el evento es una gran responsabilidad, pero participar en este trabajo resulta en una experiencia enriquecedora para los asistentes al evento y para los lectores del libro. Concientes de lo anterior, los miembros del comité editorial del volumen XXVII del Mensaje Bioquímico y del XXX Taller de Actualización Bioquímica emprendimos una serie de actividades, todas ellas encaminadas a presentar un excelente material bibliográfico, así como un evento académico de alto nivel en torno a áreas del conocimiento bioquímico de vanguardia. Todo lo anterior es únicamente posible, gracias a la participación de los destacados investigadores que participan con nosotros, en la elaboración del libro y las exposiciones en el evento. Muchas gracias.

En el año 2003 conmemoramos muchos eventos de relevancia bioquímica. Se conmemoran 50 años de funcionamiento del campus de Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, pilar de la investigación mexicana. Este año el Señor Rector, Dr. Juan Ramón de la Fuente, otorgó el reconocimiento Forjadores de la Ciencia en la UNAM a 30 destacados científicos universitarios, que gozando de un nombramiento de investigadores definitivos de tiempo completo titulares nivel "C", han alcanzado una antigüedad académica en la

institución de 45 años o más. Dentro de estas personalidades se encuentran algunos de los bioquímicos mexicanos más connotados, como el Dr. Barbarín Arreguín Lozano del Instituto de Química y el Dr. Armando Gómez-Puyou del Instituto de Fisiología Celular. También hace cinco décadas los famosos James Watson y Francis Crick con la ayuda de la poco conocida Rosalind Franklin, descifraron la estructura de la doble hélice del ADN, y es posible que en este año tengamos base por base la secuencia completa del genoma humano, es decir todas las instrucciones para hacer a uno de nuestra especie. Así mismo estamos a 50 años de que Frederick Sanger secuenció la primera proteína, la hormona insulina de bovino, aún así quedan muchas preguntas por resolver en torno a estas maravillosas moléculas. Igualmente en este año conmemoramos la tercera década de existencia del **taller de actualización bioquímica** y como la ocasión lo impone, realizamos ciertas modificaciones al conjunto de actividades involucradas para tal fin.

Desde el año pasado el mensaje bioquímico tiene además de la edición en papel que regularmente se genera, una edición en línea (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico/>), que es una innovación importante para la difusión de la información emanada de este evento. Este año, hemos incluido la semblanza del conferencista y responsable de cada una de las publicaciones en la última página de las mismas. Trabajamos en colaboración con los autores para que la calidad de las figuras presentadas en el libro fuese de la mejor calidad posible. Agradecemos la colaboración de Julieta Ambríz para tal fin. Nuestra página web (<http://bq.unam.mx/~comiteta/>) fue modificada para hacer más atractiva la navegación a través de la información que ahí presentamos y, contribuimos con el material fotográfico de nuestra Universidad (ver información de la portada del libro), para la realización del cartel del evento.

Como puede observarse en la última página de cada capítulo, los invitados a colaborar en esta publicación, son científicos sobresalientes en sus muy diversos campos de investigación, todos ellos de vanguardia en esta área del conocimiento. Además de colaborar en esta edición, también difundieron sus experiencias a través de una plática que discutieron con alumnos, maestros y profesionales del campo en el Taller de Actualización Bioquímica 2003. Los temas que estas personalidades científicas desarrollaron para esta ocasión, recorren caminos muy diversos que mencionamos a continuación: el **Dr. Gerardo Jiménez Sánchez** Investigador (Johns Hopkins University), y Director Consorcio Promotor del Instituto de Medicina Genómica, nos platica sobre las enfermedades relacionadas con fallas en el metabolismo de un organelo, el peroxisoma; la **Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou** Investigador emérito del Instituto de Fisiología Celular-UNAM, nos habla sobre los descubrimientos mas recientes en una enzima que ha participado en la generación de tres premios Nóbel: la ATPsintasa; la **Dra. Bertha González Pedrajo** Investigador (Yale University) nos relata la diversidad de los sistemas de secreción bacterianos; el **Dr. José Federico del Río Portilla** Investigador (Inst. Química-UNAM) nos platica cómo se realiza la determinación de la estructura tridimensional de una proteína en solución acuosa; el **Dr. Armando Gómez-Puyou** Investigador emérito (Inst. Fisiología Celular-UNAM) y quien este año recibió junto con otros distinguidos investigadores el reconocimiento Forjadores de la Ciencia UNAM, describe las relaciones entre la estabilidad, la flexibilidad y la catálisis enzimática; el **Dr. Jorge Ramírez Salcedo** Director de la Unidad de Microarreglos-UNAM escribe sobre una de las tecnologías más modernas: los microarreglos de ADN; el **Dr. Enrique Piña** profesor emérito, Depto. Bioquímica,

Fac. Medicina-UNAM, nos platica sobre la toxicidad causada por el etanol; los modelos más novedosos para la expresión de proteínas eucariontes: peces y gusanos son presentados respectivamente por el **Dr. Ernesto Maldonado** y la **Dra. Rosa Navarro** ambos Investigadores Instituto de Fisiología Celular-UNAM; el **Dr. Ranulfo Romo** Investigador Instituto de Fisiología Celular-UNAM nos escribe sobre la neurobiología de la toma de decisiones; el **Dr. Diego González-Halphen** Jefe del Depto. Genética Molecular, Inst. Fisiología Celular-UNAM nos platica sobre la migración de genes mitocondriales al núcleo celular, y el **Dr. Alfonso León del Río** Investigador (Inst. Investigaciones Biomédicas-UNAM) nos relata la información relevante sobre los mecanismos de regulación de la transcripción por vitaminas. Además dentro de la información contenida en este libro, se puede encontrar un capítulo escrito por la **Act. Iliana Cuenca Almazán**, Consultora de Sistemas, sobre el uso de una herramienta hipertextual, el Atlas Ti, para enseñar y aprender, ambos eventos son uno mismo y necesitan de herramientas novedosas para facilitarse. Agradecemos nuevamente la dedicación de los autores de los capítulos del libro.

La edición de este libro y el ciclo de conferencias, también necesitan de otro tipo de colaboradores que son los patrocinadores. Este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin la ayuda siempre emprendedora y entusiasta de la Dra. Ana María López Colomé (jefa del Departamento de Bioquímica), ella es prácticamente un organizador más de todas estas actividades. También agradecemos el apoyo del Dr. José Narro Robles (Director de la Facultad de Medicina), así como del Dr. Hugo Aréchiga Urtuzuástegui, (Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación FM-UNAM). En busca de financiamiento nuestro trabajo concursó en la convocatoria del PAPIME, UNAM 2002 y fuimos apoyados con el financiamiento al proyecto EN220903; desafortunadamente los montos solicitados no pudieron ejercerse en esta ocasión, pero forman parte de aquellos que utilizaremos en los siguientes dos años. También este proyecto fue apoyado económicamente por la Red Latinoamericana de Biología (RELAB), dependiente de CONACYT, y agradecemos en especial el dedicado apoyo de la Dra. Alicia González Manjares para este fin. También recibimos apoyo financiero del posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, y del posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM sede Fac. de Química, agradecemos a los coordinadores respectivos, Dr. Luis Felipe Abreu Hernández y Dra. Rosario Muñoz Clares por su confianza. En la Facultad de Medicina, agradecemos a la Lic. Julieta Ambriz y al personal de diseño gráfico a su cargo; a todo el personal de la imprenta por su compromiso con el trabajo, en especial al CP Alfonso Aguirre Herrera y los Sres. Félix Pacheco y Juan Carlos Macias; al Departamento de Servicios de Computo por las facilidades prestadas; al Lic. Armando Barbosa Calderón y al personal administrativo del Depto. Bioquímica. La compañía NESTLÉ, nos apoyó con café durante los intermedios del evento, y grupo Dartos S.A. donó las carpetas que se entregaron a los inscritos al Taller. Finalmente, no quisieramos dejar de mencionar a las siguientes personas, quienes de una u otra manera, nos apoyaron en diferentes etapas del desarrollo de este evento: Dra. Alicia Cea Bonilla, Dra. Patricia del Arenal Mena, Dr. Antonio Caso, Quím. Héctor Delgado, Biol. Adriana Julián Sánchez, Sra. Marivel Rojas García y Sra. Rosa María López.

Aquí pues les mostramos lo que pensamos puede ser la última edición del Mensaje Bioquímico y la primera edición de una serie de libros anuales que en esta ocasión denominamos "**temas bioquímicos de vanguardia: 2003**". Los miembros del comité editorial de este libro

estamos seguros de que si la información que el lector necesita es de actualidad, seguramente la encontrará en este libro.

Agosto de 2003.

Edgar Vázquez-Contreras.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

BASES BIOQUÍMICAS Y FISIOPATOLÓGICAS DE LAS ENFERMEDADES PEROXISOMALES

Gerardo Jiménez-Sánchez^{1,2} e Irma Silva-Zolezzi^{1,3}

¹Consortio Promotor del Instituto de Medicina Genómica, México.

²McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore MD, USA.

³Programa Doctoral en Biomedicina Molecular, CINVESTAV, México.

gjimenez@bs.jhmi.edu

Introducción

Los peroxisomas son organelos de membrana sencilla presentes en prácticamente todas las células eucariotes. En los mamíferos su abundancia varía desde menos de cien hasta más de mil peroxisomas por célula (1). Los peroxisomas varían en tamaño desde 0.1 a 1 μm de diámetro y generalmente se observan como vesículas circulares u ovoides (2,3).

Este organelo fue descubierto por el investigador belga Christian de Duve y sus colaboradores en la década de 1950, poco después de que describiera la bioquímica de los lisosomas. En 1965, de Duve propuso el nombre de peroxisoma para este organelo dado que parecía tanto generar como degradar peróxido de hidrógeno (4,5). Sus descubrimientos, empleando abordajes bioquímicos, sobre la organización funcional de la célula le llevaron a ganar el Premio Nobel en Medicina en 1974.

La membrana sencilla de los peroxisomas es impermeable a protones y moléculas pequeñas, dando lugar a un microambiente con características enzimáticas y químicas únicas dentro de la célula (6). La matriz granular de este organelo es densa, con una concentración de proteínas de 200-300 $\mu\text{g/ml}$, de hecho, algunas proteínas alcanzan concentraciones tales que se cristalizan en la luz del peroxisoma (Figura 1).

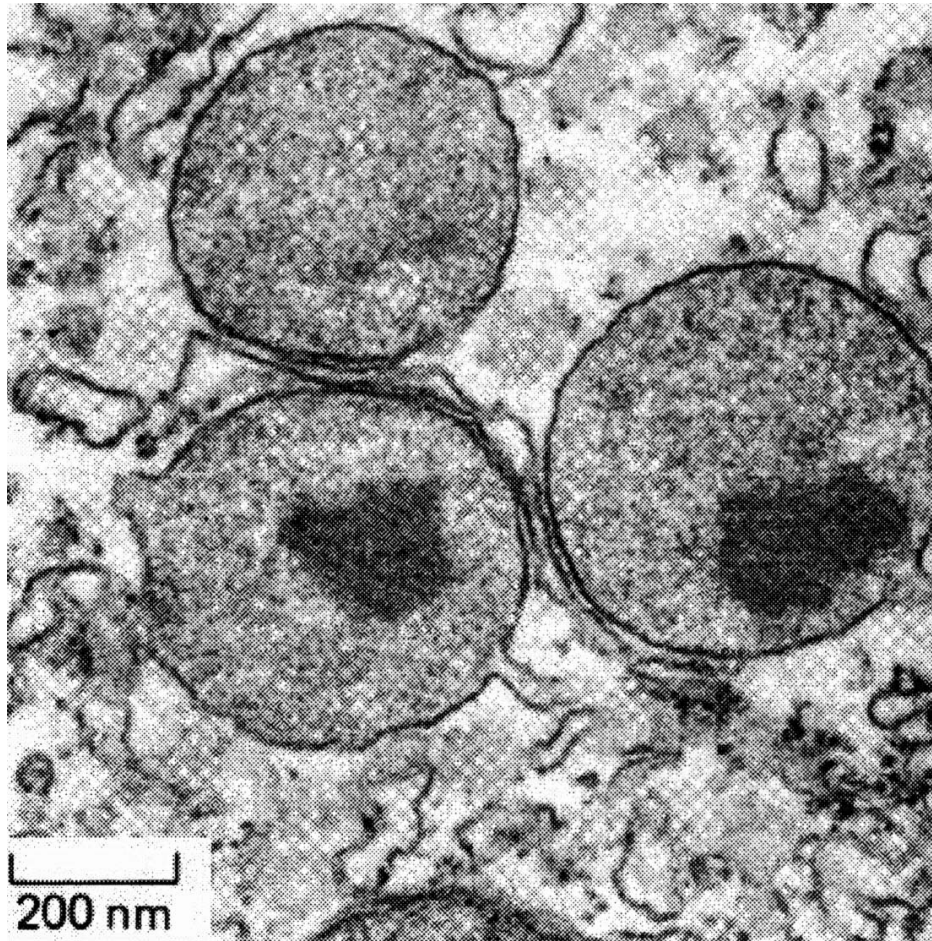


Figura 1. Micrografía de hígado de rata en la que se identifican tres peroxisomas al centro, en dos de los cuales se observa la formación de cristales en su matriz.

Los peroxisomas contienen más de 50 enzimas que participan en una gran variedad de vías metabólicas que incluyen la β -oxidación de algunos ácidos grasos y la biosíntesis de moléculas como ácidos biliares (7), éter-fosfolípidos (plasmalógenos) (8) y compuestos isoprenoides (9). En estos procesos bioquímicos participan tanto las enzimas de la matriz, como proteínas de la membrana peroxisomal. La falla de alguna de estas proteínas puede dar lugar a enfermedades humanas que varían en sus manifestaciones clínicas y grado de severidad. A

continuación se revisan las bases celulares y bioquímicas de los peroxisomas, así como sus implicaciones en la fisiopatogenia de las enfermedades genéticas a las que se asocian.

La biogénesis de los peroxisomas

El peroxisoma es uno de cuatro sistemas de organelos dentro de las células de mamífero. Al igual que el núcleo, las mitocondrias y los organelos del sistema secretorio/endocítico (retículo endoplásmico (ER), aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, vesículas de transporte, vesículas secretorias etc.); el peroxisoma parece usar un mecanismo específico para su biogénesis. La formación del organelo normalmente sigue uno de dos modelos: el crecimiento y la división, o bien el ensamblaje a través de fusión de vesículas. En contraste, el aparato de Golgi depende del continuo suplemento de proteínas y lípidos mediante transporte vesicular del retículo endoplásmico.

Dentro de este limitado margen de opciones existe una gran discusión sobre el mecanismo que da lugar a los peroxisomas (10-12). Por un lado un gran número de estudios ofrecen evidencias que apoyan el modelo en que los peroxisomas crecen y se dividen a partir de peroxisomas preexistentes (13-16). Sin embargo, otros estudios igualmente sólidos, demuestran que los peroxisomas pueden ser sintetizados en ausencia de peroxisomas preexistentes (17). Es por esto, que actualmente se piensa que los peroxisomas se pueden formar por ambos mecanismos. El modelo más aceptado propone ambos mecanismos para la biogénesis peroxisomal; el principal incluye el crecimiento de peroxisomas preexistentes por incorporación directa de proteínas de matriz y de membrana, seguido de la división del organelo una vez que su masa alcanza un umbral determinado, y como mecanismo secundario, el ensamblaje de los peroxisomas a partir de vesículas pre-peroxisomales (posiblemente otra endomembrana de la célula). Este último mecanismo explica la reaparición de peroxisomas en células deficientes en estos organelos (18).

Los genes PEX codifican para una serie de proteínas conocidas como peroxinas que participan y son indispensables en la biogénesis de los peroxisomas. Estas proteínas incluyen a los receptores para la secuencia blanco de peroxisomas -1 y -2 (PTS-1 y PTS-2)¹, así como a otras proteínas citosólicas y de membrana que participan en la importación de proteínas a la matriz y membrana peroxisomal. A la fecha existen más de 25 genes PEX (19), 15 de ellos identificados en el genoma humano. Como se esperaría en otros procesos biológicos complejos, la biogénesis de los peroxisomas incluye un gran número de genes y sus proteínas (20). En consecuencia, las enfermedades genéticas de la biogénesis de los peroxisomas son genéticamente heterogéneas. Esto se evidencia en experimentos de fusión celular usando fibroblastos de pacientes con desórdenes de la biogénesis de peroxisomas. Los experimentos iniciales mostraron la existencia de seis diferentes grupos de complementación en estos pacientes, actualmente se han identificado más de 12 de ellos (21).

Una vez formada la membrana peroxisomal, comienza la importación de proteínas de matriz. Sobre este proceso existe una gran cantidad de información que incluye las señales de importación, así como los receptores citosólicos que participan. Las evidencias actuales señalan que la importación de proteínas de membrana requiere de procesos citosólicos y peroxisomales.

¹ PTS, del inglés Peroxisomal Targeting Signal.

La mayor parte de las proteínas de matriz tienen una secuencia señal en el extremo C-terminal conocida como PTS-1 con una secuencia consenso -S-K-L-COOH (22), aunque hoy en día se conocen variaciones del consenso que cumplen la misma función. Esta secuencia es reconocida por un receptor citosólico (PEX5) con el que las proteínas a importar por esa vía forman un complejo carga-receptor, justo antes de su importación. Un grupo menor de proteínas de la matriz peroxisomal son dirigidas al peroxisoma mediante una secuencia señal en el extremo N-terminal conocida como PTS-2. Esta señal fue identificada por primera vez en la tiolasa de hígado de rata (23) y tiene una secuencia consenso -R-L-X₅-H-L-. Los mecanismos de importación de proteínas al peroxisoma son muy complejos y continuamente se descubren genes cuyos productos participan en este proceso. Hoy en día se reconocen cuatro etapas independientes para la biogénesis de los peroxisomas que consisten en: (1) reconocimiento de la carga y/o proteína a transportar, (2) anclaje del complejo carga-receptor a la membrana peroxisomal, (3) translocación, y (4) reciclaje del receptor (19,24). Las proteínas de membrana del organelo son específicas del peroxisoma y, al igual que sus proteínas de matriz, son sintetizadas por ribosomas libres en el citosol y dirigidas al peroxisoma por mecanismos específicos de los que se conocen pocos detalles.

La β -oxidación peroxisomal

En las células animales, las mitocondrias y los peroxisomas son los organelos encargados del catabolismo de los ácidos grasos (AG), a través del proceso bioquímico conocido como β -oxidación. Originalmente se pensó que en los peroxisomas se llevaban a cabo pocos procesos metabólicos como la síntesis y degradación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (5), y que la β -oxidación peroxisomal tenía como única función apoyar al sistema mitocondrial en el caso de un incremento en la ingesta de AG. El papel de los peroxisomas en el metabolismo celular cobró importancia al descubrirse que en su interior ocurren una gran variedad de procesos como son: la síntesis de plasmalógenos (25) y de ácidos biliares (26), o el catabolismo de AG de cadena muy larga (>C24) (7,27), ácidos dicarboxílicos de cadena larga (28), AG ramificados (29,30), compuestos xenobióticos con cadenas alifáticas laterales (31), y prostaglandinas entre otros (32,33).

La β -oxidación peroxisomal en forma similar a la mitocondrial, requiere que los AG sean activados a ésteres de acil-CoA (Figura 2a). En los mamíferos esta activación la realizan acil-CoA sintetetas que se encuentran en la cara citosólica de la membrana peroxisomal (34). Los peroxisomas contienen dos acil-CoA sintetetas: una para AG de cadena larga (FACL) (34,35) y otra para AG de cadena muy larga (VLCS)² (36,37).

A diferencia de las acil-CoA sintetetas, todas las enzimas que participan en la vía de la β -oxidación peroxisomal están localizadas en la matriz peroxisomal (38). La primera reacción en la β -oxidación peroxisomal es una deshidrogenación catalizada por las enzimas acil-CoA oxidasas, las cuales transforman ésteres de acil-CoA en ésteres de 2-*trans*-enoil-CoA. La acil-CoA oxidasa clásica, fue identificada en rata, donde esta enzima reconoce sustratos de cadena lineal (39). Además, se han caracterizado dos oxidasas de sustratos ramificados: pristanoil-CoA oxidasa (40,41), y di- / tri-hidroxicolestanoil-CoA oxidasa (42,43). En el humano se han identificado solo dos oxidasas, una que reconoce sustratos de cadena lineal (ACOX1) y otra sustratos ramificados (ACOX2) (44).

² VLCS, del inglés Very Long-Chain acyl-CoA Synthetase.

Durante la segunda y la tercera reacción de la β -oxidación peroxisomal, los ésteres de 2-*trans*-enoil-CoA son hidratados a 3-hidroxiacil-CoA, los cuales posteriormente son oxidados a los ésteres 3-cetoacil-CoA correspondientes. Ambas reacciones son catalizadas por un mismo polipéptido que posee tres actividades enzimáticas: hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (45) e isomerasa (46). Hasta el momento se han descrito dos proteínas con estas características, cada una específica para intermediarios con diferente estereoquímica (L- o D-), denominadas proteínas L- y D-bifuncionales –LBP (47) y DBP (48,49)–. Estudios iniciales sugerían que la proteína LBP metaboliza preferentemente AG saturados de cadena lineal, y la DBP a los AG ramificados y precursores de ácidos biliares. Estudios más recientes en pacientes con defectos peroxisomales, indican que la deficiencia de la actividad de DBP genera una pérdida casi total de la capacidad de metabolizar AG saturados de cadena lineal (en particular los C26:0), cuestionando así la función de LBP (50).

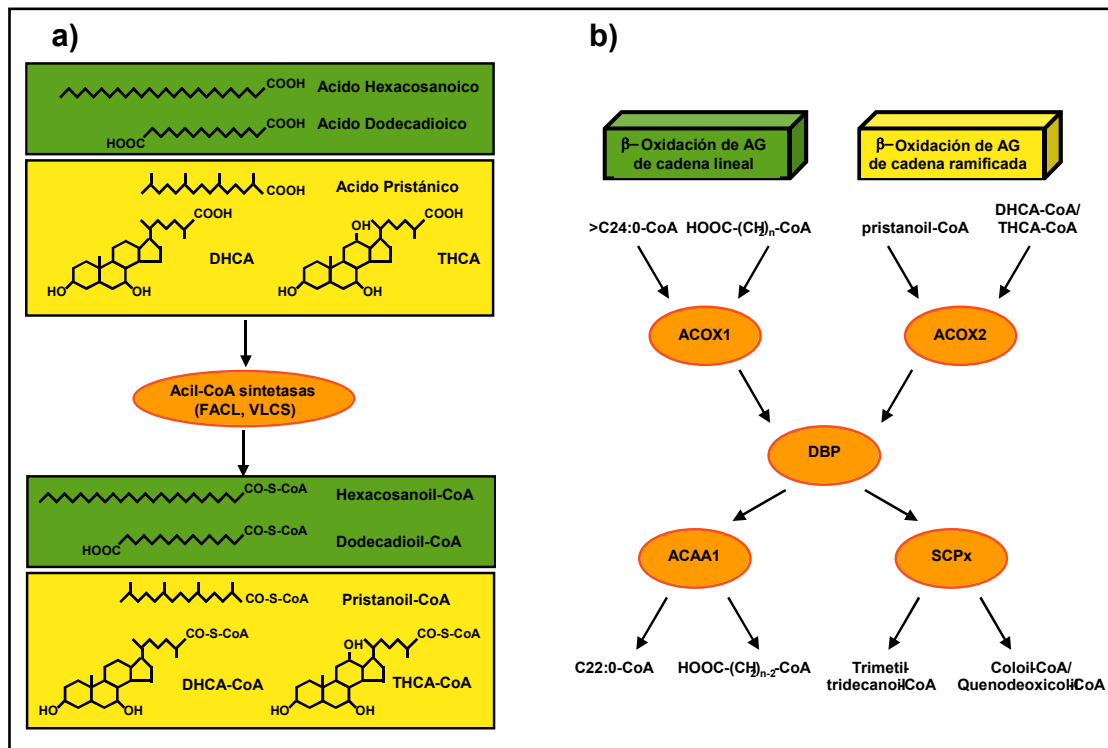


Figura 2. a) Activación de sustratos para la β -oxidación peroxisomal. Para ser metabolizados los ácidos grasos (AG) de cadena lineal (verde) y los de cadena ramificada (amarillo) son activados en la cara citosólica de la membrana peroxisomal por la acil-CoA sintetasas de AG de cadena larga (FACL) y de cadena muy larga (VLCS). **b)** Enzimas que participan en la β -oxidación peroxisomal. Los sustratos sufren cuatro transformaciones en secuencia que se repiten de manera cíclica hasta acortar las cadenas a una longitud de cadena media: 1) deshidrogenación mediada por la acil-CoA oxidasa de cadena lineal (ACOX1) y la de cadena ramificada (ACOX2); 2 y 3) hidratación y deshidrogenación, mediadas por la proteína D-bifuncional (DBP) y 4) corte tiorlítico mediada por la tiorlisa clásica (ACAA1), y la de AG ramificados (SCPx). (DHCA: 3 γ ,7 γ -dihidroxi-5 β -colestanoico, THCA: 3 α ,7 α ,12 γ -trihidroxi-5 β -colestanoil-CoA).

La cuarta y última reacción de la β -oxidación es el corte tiolítico de los ésteres de 3-cetoacil-CoA, lo que da lugar a una molécula de acetil-CoA y una de acil-CoA dos residuos de carbono más corta que la original. Esta reacción la catalizan las enzimas 3-cetoacil tiolasas. Por varios años se pensó que sólo existía una tiolasa peroxisomal, aunque a la fecha se han caracterizado dos tiolasas diferentes: la tiolasa peroxisomal 1 (ACAA1), que actúa sobre sustratos de cadena lineal (51) y la tiolasa peroxisomal 2 (SCPx) que actúa sobre sustratos ramificados (52-55).

Los sistemas de β -oxidación tanto peroxisomal como mitocondrial realizan la degradación de AG de longitud variable, saturados y no saturados, a través de cuatro pasos en secuencia que se repiten de manera cíclica: deshidrogenación, hidratación, deshidrogenación y corte tiolítico (56) (Figura 2b). Tanto en la β -oxidación peroxisomal, como en la mitocondrial, las modificaciones químicas sobre los sustratos y los intermediarios que se generan son idénticos, pero está bien establecido que existen diferencias importantes entre ambos sistemas, las cuales se describen a continuación.

a) Naturaleza de los sustratos

La mitocondria metaboliza principalmente AG de cadena larga, media y corta, mientras que el peroxisoma de manera general se encarga de los AG de cadena muy larga, dicarboxílicos y ramificados, precursores de ácidos biliares (ácidos cólico y quenodeoxicólico), así como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. En particular, los ácidos hexacosanoico (C26:0) y tetracosanoico (C24:0) son exclusivamente metabolizados por el peroxisoma (50).

b) Transporte de sustratos

En el caso de la mitocondria el sistema de transporte de ácidos grasos activados (acil-CoA) al interior de la mitocondria está bien caracterizado. Se sabe que está mediado por un sistema de transportadores que dependen del cofactor carnitina (ácido β -hidroxyl- γ -trimetilaminobutírico) (57). Los mecanismos de transporte de los ácidos grasos activados al interior del peroxisoma no han sido caracterizados, aunque existen evidencias que sugieren que pudieran ser transportados independientemente de carnitina por transportadores del tipo ABC (58,59).

c) Acortamiento de sustratos

La β -oxidación mitocondrial es un proceso que continúa hasta completarse, es decir, los ácidos grasos son metabolizados hasta acetil-CoA; en contraste, el sistema peroxisomal funciona como un sistema de acortamiento de las cadenas de carbono, que se detiene cuando éstas alcanzan la longitud de una cadena media. Hasta la fecha, para la mayoría de los sustratos no se ha logrado determinar el momento en que se detiene el acortamiento de la cadena de carbonos, aunque se sabe que la acil-CoA oxidasa de cadena lineal no reacciona sobre sustratos de menos de ocho carbonos de longitud (39).

d) Enzimas

Las enzimas que llevan a cabo las transformaciones bioquímicas en los sistemas de β -oxidación peroxisomal y mitocondrial, tienen funciones similares pero están codificadas en genes distintos. Una característica que distingue a ambos sistemas enzimáticos es el primer paso de deshidrogenación, en el cual las oxidasas del peroxisoma donan los electrones generados a una molécula de oxígeno (O_2) generando así H_2O_2 , en contraste a lo que ocurre en la mitocondria en donde las deshidrogenasas de acil-CoA, donan los electrones a una flavoproteína de la cadena

respiratoria, participando así en la formación del gradiente electroquímico que alimenta al sistema de producción de ATP (32). Es así que, a diferencia de la β -oxidación mitocondrial, la β -oxidación peroxisomal no está acoplada directamente a un sistema de generación de energía.

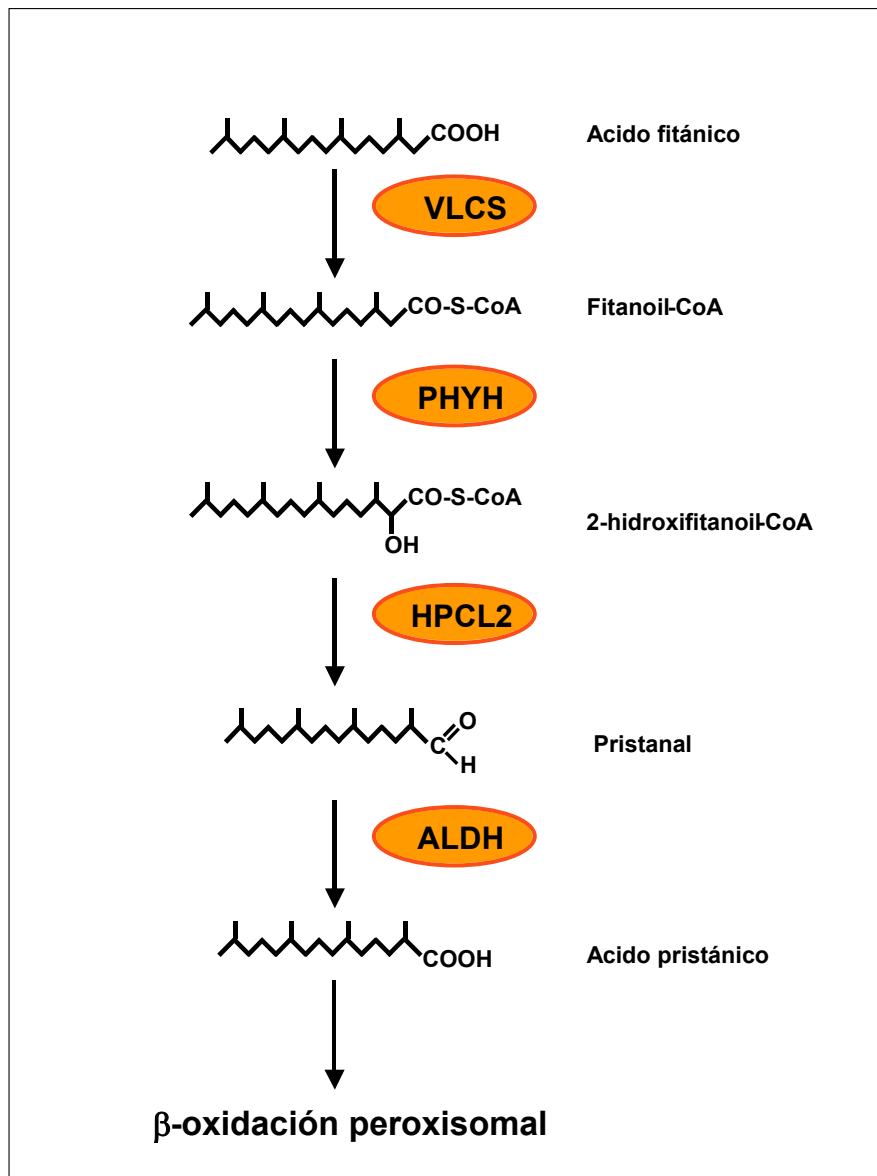


Figura 3. La α -oxidación peroxisomal. Los AG ramificados con un grupo metilo en la posición C3 previo a ser metabolizados por la vía de β -oxidación deben ser procesados para quedar con el grupo metilo en la posición C2. Se muestra la vía para el caso del ácido fitánico el sustrato más común en este caso. (VLCS: acil-CoA sintetasa de AG de cadena muy larga, PHYH: fitanoil-CoA hidroxilasa, HPCL2: hidroxifitanoil-CoA ligasa, ALDH: aldehído deshidrogenasa).

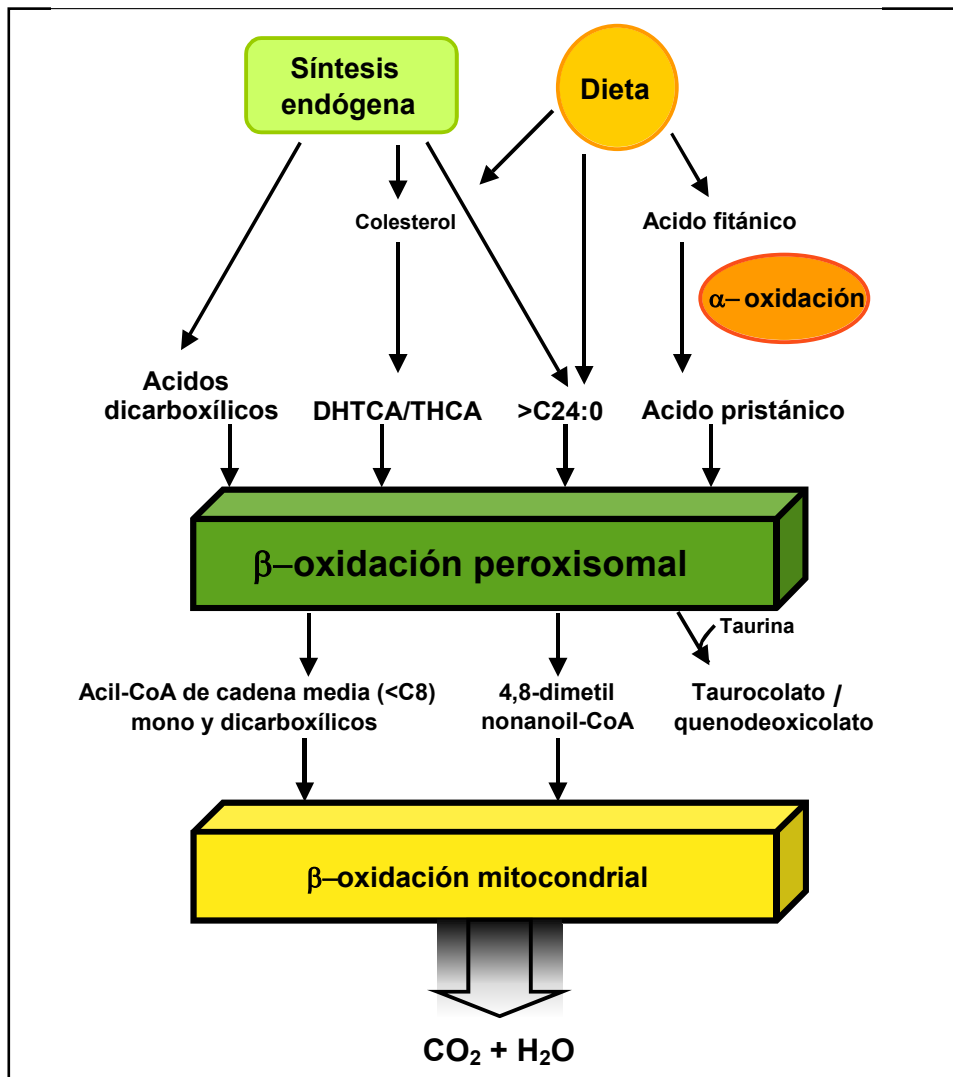


Figura 4. Resumen de los procesos de α - y β -oxidación peroxisomal. La mayoría de los productos de la β -oxidación peroxisomal completan su metabolismo en la mitocondria. Aunque no se incluyen en el esquema, también son sustratos peroxisomales, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y AG mono y poli-insaturados.

La α -oxidación

Los AG que presentan un grupo metilo en el tercer átomo de carbono no pueden ser metabolizados por los sistemas de la β -oxidación, el ejemplo mejor conocido es el ácido fitánico (3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico), un AG muy particular que no es sintetizado *de novo* por el

humano, pero que es ingerido en la dieta, ya que se acumula en grasa de rumiantes (60), productos lácteos, carne (61) y pescado (62).

El ácido fitánico y el producto de su α -oxidación, el ácido pristánico, han cobrado particular importancia al descubrirse que son ligandos endógenos de un factor de transcripción de tipo receptor nuclear que participa en la proliferación peroxisomal denominado PPAR α (63,64)³, el cual tiene un papel fundamental en el metabolismo de lípidos y la homeostasis energética en general (65). A pesar de que inicialmente se pensaba que el metabolismo del ácido fitánico era mitocondrial, la idea de que este proceso ocurre en el peroxisoma surgió de la observación en pacientes con defectos peroxisomales, algunos de los cuales presentan acumulación de ácido fitánico y sus fibroblastos tienen una α -oxidación de ácido fitánico deficiente (66,67).

Para ser metabolizado, el ácido fitánico debe ser transformado en ácido pristánico mediante un proceso de α -oxidación. Como en el caso de la β -oxidación, para ser metabolizado el ácido fitánico debe ser activado (fitanoil-CoA) por una acil-CoA sintasa (68,69). La α -oxidación consiste en una serie de tres pasos: hidroxilación, corte y deshidrogenación (50,70) (Figura 3).

La reacción de hidroxilación es realizada por la fitanoil-CoA hidroxilasa (PHYH) (71,72), una enzima peroxisomal cuya actividad es dependiente de la presencia de α -cetoglutarato, ascorbato o glutatión, Fe²⁺ y O₂; posteriormente el intermediario generado (2-hidroxifitanoil-CoA) es hidrolizado por la 2-hidroxifitanoil-CoA ligasa (HPCL2) dependiente de pirofosfato de tiamina (73), dando lugar a una molécula de ácido fórmico y un aldehído (pristanal). Se piensa que el ácido fórmico es eventualmente transformado a CO₂ en el citosol (72), mientras que el aldehído es oxidado por una deshidrogenasa, generando un AG metilado en la posición 2, un carbono más corto que el sustrato original (ácido pristánico), el cual puede entonces continuar su metabolismo en el peroxisoma por la vía de β -oxidación (Figura 4). El sitio específico en el que ocurre esta última reacción aún no se ha determinado con precisión.

Aunque las enzimas participantes en la α -oxidación y el mecanismo general está descrito, aún quedan varios puntos que es necesario estudiar con más detalle, por ejemplo, la localización celular de algunos componentes de la vía y los sistemas de transporte de sustratos e intermediarios.

Biosíntesis de los éter-fosfolípidos

Los éter-fosfolípidos se distinguen de los diacil fosfolípidos por tener un enlace éter en la posición sn-1 del esqueleto de glicerol. Existen dos tipos de éter-fosfolípidos, los primeros tienen un enlace alquilo adyacente al enlace éter, y los segundos un enlace alquenoilo (vinilo) en la misma posición, en ambos casos el grupo alcohol unido al fosfato es generalmente etanolamina o colina (74). El nombre común de los éter-fosfolípidos que poseen el grupo vinilo es plasmalógenos. Los plasmalógenos se localizan en todos los tejidos de mamíferos, aunque se encuentran en mayores cantidades en músculo, corazón y cerebro. Si bien su función biológica

³ PPAR α : del inglés Peroxisome Proliferator-Activated receptor alpha.

no es clara, se les ha asociado a procesos relacionados con la estructura y fusión de membranas biológicas, protección contra el estrés oxidativo y transducción de señales (8).

Los dos pasos iniciales en la biosíntesis de los éter-fosfolípidos ocurren en el peroxisoma y en el retículo endoplásmico. Las enzimas peroxisomales que participan son: 1) dihidroxiacetona fosfato (DHAP) aciltransferasa (GNPAT) (75), que cataliza la acilación de DHAP para formar un acil-DHAP, utilizando como donadores de acilo AG de cadena larga activados (acil-CoAs) y; 2) alquil-DHAP fosfato sintasa (AGPS) (76,77), que cataliza la sustitución del grupo acilo por un alcohol de cadena larga, dando lugar a un alquil-DHAP. El procesamiento subsiguiente de este intermediario incluye una reducción y la adición de cabezas polares, así como desaturaciones opcionales, las cuales son realizadas por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico (8).

Biosíntesis de colesterol y otros isoprenoides

Los isoprenoides son vitales para una gran diversidad de funciones celulares, algunos ejemplos de este tipo de moléculas incluyen a los esteroides (especialmente el colesterol), ubiquinona, dolicol, etc. La biosíntesis de isoprenoides se lleva a cabo a través de la vía metabólica de mevalonato (Figura 5).

Las evidencias de que el peroxisoma participa en la biosíntesis del isoprenoides incluyen, la localización peroxisomal de casi todas las enzimas de la vía del mevalonato como la acetoacetil-CoA tiolasa (ACAT), la hidroximetilglutaril-CoA sintasa (HMGCS), la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), la mevalonato cinasa (MVK), la mevalonato fosfato cinasa (PMVK), la mevalonato pirofosfato descarboxilasa (MVD), la isopentenil pirofosfato isomerasa (IDI1) y la farnesil difosfato sintasa (FDPS) (78) (Figura 5). Otras evidencias son: la capacidad peroxisomal *in vitro* de convertir mevalonato en colesterol y dolicol; así como la reducción en la actividad enzimática en la vía del mevalonato en muestras de pacientes con defectos peroxisomales (9). Si bien estos últimos datos son controversiales (79), es importante señalar también que la expresión peroxisomal de la proteína acarreadora de esteroides tipo 2 (SCP-2), estimula la síntesis de colesterol y dolicol (80,81).

Metabolismo del ácido pipecólico

El ácido pipecólico es un intermediario en el metabolismo del aminoácido lisina, el cual es degradado por dos vías metabólicas, la de sacaropina y la del L-pipecolato, siendo ésta última la de mayor actividad en el caso específico del cerebro. El ácido pipecólico se sintetiza a partir de L-lisina a través de tres reacciones enzimáticas, siendo la última una deshidrogenación realizada por la enzima peroxisomal L-pipecolato oxidasa (PIPOX) (82). La importancia de la participación de esta enzima en la vía se determinó en estudios realizados en pacientes con defectos peroxisomales, algunos de los cuales acumulan ácido pipecólico en plasma (83).

Metabolismo de las especies de oxígeno reactivas (ROS)⁴

La acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS), es uno de los factores que contribuyen a la senescencia celular, el acortamiento de telómeros, daño al ADN e inestabilidad genómica (84). Lo anterior ha generado un gran interés en su estudio, en particular para analizar su participación en la carcinogénesis (85), infertilidad (86), aterosclerosis (87) y otras condiciones patológicas (88), así como en el proceso de envejecimiento (89).

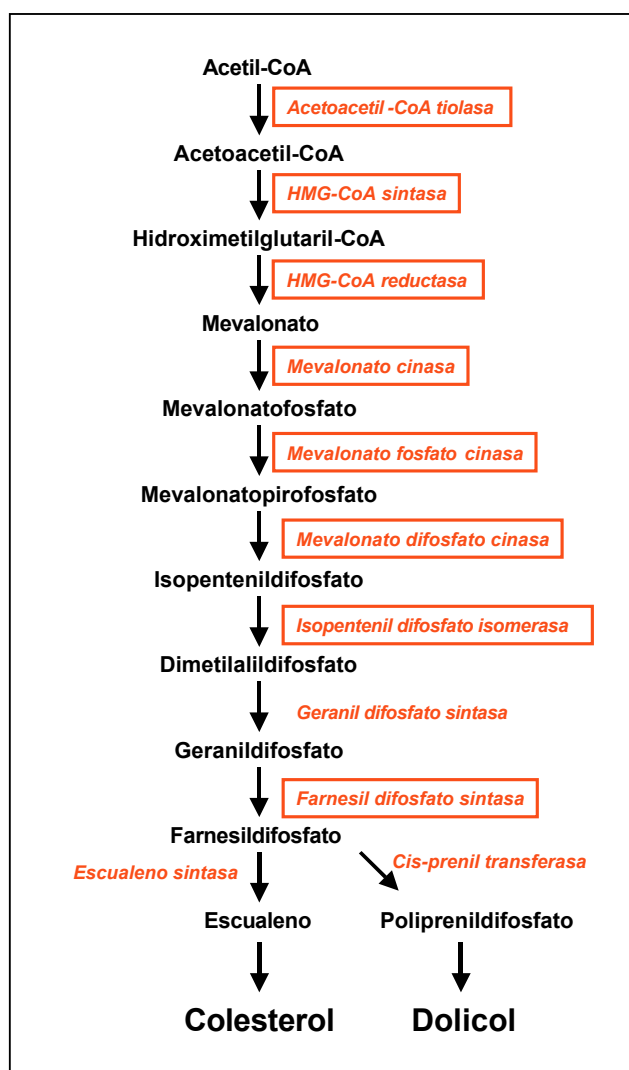


Figura 5. Participación del peroxisoma en la síntesis de isoprenoides por la vía del mevalonato. Las enzimas que están enmarcadas están presentes en el peroxisoma aunque no de manera exclusiva.

⁴ ROS, del inglés: Reactive Oxygen Species.

Los peroxisomas poseen una gran variedad de enzimas que remueven electrones de metabolitos, los cuales son utilizados para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de oxígeno molecular (O_2), estos organelos también poseen a la enzima catalasa, la cual descompone el H_2O_2 (90). La co-existencia de estos sistemas permite que exista un balance entre la producción y generación de ROS con el fin de evitar en lo posible, llegar a un estado de estrés oxidativo. Se ha postulado que el peroxisoma consume aproximadamente del 10 al 30% de todo el oxígeno celular consumido en hígado, por lo que se le atribuye una participación importante en el metabolismo de ROS (38).

Enfermedades peroxisomales

Las enfermedades peroxisomales de origen genético se dividen en dos grandes grupos: 1) defectos en la biogénesis peroxisomal y 2) deficiencias de una sola enzima. A la fecha se conocen cuando menos 21 enfermedades peroxisomales con manifestaciones clínicas y bioquímicas heterogéneas, la mayor parte de ellas presentan daño neurológico –ver Tabla 1– (18,91).

a) Defectos en la biogénesis peroxisomal

En 1964, el Dr. Hans Zellweger y sus colaboradores reportaron una enfermedad hereditaria que hoy conocemos como el Síndrome de Zellweger (SZ) (92). Este y otros casos fueron revisados e identificados como parte de una misma entidad que se conoce como Síndrome Cerebrohepatorrenal de Zellweger, término que se emplea en la actualidad para describir este desorden prototípico de la biogénesis de los peroxisomas. Estas enfermedades ocurren con una incidencia de aproximadamente 1 por cada 50,000 nacimientos (93,94). La primera evidencia de que este síndrome está causado por defectos en la biogénesis de los peroxisomas, se obtuvo de observaciones de Goldfisher y colaboradores, quienes mostraron que las proteínas de la matriz peroxisomal no se compartimentalizaban apropiadamente en tejidos de pacientes con esta enfermedad (95). A través del tiempo, hemos conocido fenotipos menos severos como la adrenoleucodistrofia neonatal (NALD)⁵ (96) y la enfermedad de Refsum infantil (IRD)⁶ (97). Estas patologías constituyen un espectro de severidad conocido como el espectro Zellweger y se heredan en forma autosómica recesiva. Más adelante, se describió la Condrodisplasia Rizomélica Puntata (RCDP)⁷ (98,99) como parte del espectro, estos pacientes se caracterizan por tener ausencia de peroxisomas, o bien, por la presencia de estructuras conocidas como “fantasmas” que representan membranas peroxisomales que no lograron formar el organelo. Como consecuencia, muchas de las enzimas peroxisomales no se encuentran activas, dando lugar a alteraciones metabólicas complejas.

Los defectos en la biogénesis de los peroxisomas presentan alteraciones durante el período gestacional dando lugar, entre otras cosas, a una migración anormal de las neuronas a nivel cerebral, a diferentes tipos de malformaciones congénitas, y a daño en el sistema nervioso central que se manifiesta desde muy temprana edad.

⁵ NALD, del inglés: Neonatal Adrenoleukodystrophy.

⁶ IRD, del inglés: Infantile Refsum's Disease.

⁷ RCDP, del inglés: Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de algunas enfermedades peroxisomales en función de la edad de inicio.

Datos clínicos	Enfermedad
Período neonatal Hipotonía muscular severa. Encefalopatía, crisis convulsivas. Dismorfias craneofaciales. Dismorfias varias. Anormalidades esqueléticas (calcificaciones en forma de puntillero, antebrazos cortos)	SZ, SZ-like, NALD SZ Deficiencia de Acil-CoA oxidasa (pseudo-NALD) Deficiencia de proteína bifuncional Deficiencia de tiolasa peroxisomal (pseudo SZ) Alteraciones de la β -oxidación peroxisomal no clasificados Aciduria mevalónica RCDP tipos 1, 2 y 3
Primeros 6 meses de vida Detención de crecimiento y desarrollo Alteraciones digestivas, malabsorción Hipocolesterolemia, Deficiencia de Vitamina E Hepatomegalia, ictericia prolongada Alteraciones visuales (retinopatía, cataratas, displasia de nervio óptico)	IRD, pseudo-IRD Formas menos severas o atípicas de SZ, NALD y RCDP Acidemia hiperpípecólica Aciduria mevalónica
Pre-escolar y escolar Pérdida de habilidades adquiridas Deterioro neurológico progresivo Insuficiencia suprarrenal Ceguera Hiperpigmentación notoria en lecho ungueal y encías, y/o en el resto del cuerpo	Adrenoleucodistrofia ligada al X (X-ALD)
Adulto joven y maduro Neuropatía periférica Debilidad muscular	Adrenomieloneuropatía (X-ALD forma adulta o AMN)

Síndrome de Zellweger. El SZ tiene como manifestación principal la presencia de dismorfias craneofaciales que incluyen frente alta, fontanela anterior muy amplia, hipoplasia de puentes supraorbitales, epicanto y deformidad de los lóbulos de la oreja, así como manifestaciones de daño cerebral profundo (18,91). Los pacientes muestran un severo retraso psicomotor, hipotonía profunda, crisis convulsivas durante el período neonatal, glaucoma, degeneración retineana, sordera en diferentes grados, así como crecimiento del hígado y anomalías en su funcionamiento. Algunos de estos pacientes generalmente presentan calcificaciones en forma de puntillero en las epífisis óseas y pequeños quistes a nivel renal. Las anomalías cerebrales en estos pacientes incluyen displasias corticales, defectos en la migración neuronal y desmielinización. La mayor parte de estos pacientes fallecen durante el primer año de vida aunque algunos pacientes pueden vivir un poco más y alcanzar a desarrollar algunas habilidades. La presencia de malformaciones congénitas apuntan a procesos anormales durante la gestación.

Adenoleucodistrofia neonatal (NALD) y enfermedad de Refsum infantil (IRD). Estas enfermedades se ubican en el extremo menos severo del espectro Zellweger. El dato más importante al nacimiento es la hipotonía muscular severa sin respuesta a los estímulos, lo que puede ser confundido con otras condiciones patológicas como desórdenes neuromusculares congénitos, alteraciones del sistema nervioso central y del autónomo, o con síndromes caracterizados por múltiples malformaciones. La aparición clínica de la NALD aparece fundamentalmente como desmielinización cerebral, con dismorfias craneofaciales mínimas o ausentes. Aún cuando los pacientes con IRD comparten algunas de las manifestaciones clínicas con SZ, tienen como dato característico una edad de inicio más avanzada, así como menor severidad y mayor sobrevida. Estos pacientes tienen mínimas dismorfias faciales y generalmente comienzan su desarrollo neuromuscular en forma normal para posteriormente desarrollar datos neurológicos entre el año y los 3 años de vida. Este inicio, normalmente está seguido de un detenimiento total del desarrollo neurológico, comportamiento autista asociado a retinopatía y sordera sensorineural (100).

Condrodisplasia rizomélica puntata (RCDP). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se caracterizan por la presencia de antebrazos cortos (rizomelia), dismorfias faciales, cataratas, retraso psicomotor, fisuras coronales en los cuerpos vertebrales y calcificaciones en forma punteada en las epífisis óseas durante los primeros años del crecimiento, mismas que pueden desaparecer hacia el segundo año de vida (18,98). La condrodisplasia puntata suele ser más extensa que en pacientes con SZ y puede incluir tejidos extraesqueléticos. Algunos pacientes presentan ictiosis. Esta enfermedad tiene una gran heterogeneidad en su presentación clínica, es por ello que debe hacerse un cuidadoso diagnóstico diferencial con otras enfermedades como el Síndrome de Conrady-Hünemann y las formas dominantes ligada al X y recesiva de la condrodisplasia puntata. Los pacientes con RCDP o alguna de sus variantes son candidatos a determinación de plasmalógenos en membranas eritrocíticas, dado que todos los pacientes estudiados hasta ahora, han demostrado tener una deficiencia en plasmalógenos eritrocitarios. El diagnóstico diferencial entre las RCDP tipos 1, 2 o 3 se hace con base en estudios enzimáticos en fibroblastos seguidos por análisis molecular de los genes que codifican para PEX7 (*PEX7*), dihidroxiacetonafofato aciltransferasa (*GNPAT*) o sintasa de alquil-dihidroxiacetonafofato (*AGPS*), respectivamente.

b) Deficiencias de una sola enzima

Actualmente se conocen cuatro defectos en la β -oxidación peroxisomal que producen manifestaciones clínicas: (a) deficiencia de la acil-CoA oxidasa; (b) deficiencia de la proteína D-bifuncional; (c) deficiencia de tiolasa peroxisomal; y (d) deficiencia de 2-metilacil-CoA racemasa. Las manifestaciones clínicas de las primeras tres enfermedades es similar a los defectos en la biogénesis de los peroxisomas descrita anteriormente. Esta similitud es especialmente clara en la deficiencia de la proteína D-bifuncional, dado que prácticamente todos los pacientes identificados hasta el momento muestran manifestaciones clínicas severas que incluyen hipotonía, dismorfias craneofaciales, crisis convulsivas en el período perinatal, hepatomegalia y retraso en el desarrollo. Muchos de los pacientes con deficiencia de esta proteína fallecen durante el primer mes de vida.

Deficiencia de 2-metil-acil-CoA racemasa. La deficiencia de esta enzima causa un defecto en la oxidación de ácidos grasos 2-metil-ramificados, ácido pristánico y ácidos di- y tri-

hidroxicolestanoico. A diferencia de pacientes con deficiencia de acil-CoA oxidasa o cualquier otro defecto de la β -oxidación, estos pacientes no presentan manifestaciones a edades tempranas sino que desarrollan neuropatía de inicio tardío.

El diagnóstico de los defectos de la β -oxidación se basan en las manifestaciones clínicas en combinación con una serie de exámenes de laboratorio que evalúan las funciones peroxisomales. El tamizaje inicial se basa en la determinación de ácidos grasos de cadena muy larga en plasma. En caso de encontrarse elevados, deben realizarse estudios adicionales en plasma, tales como la determinación de ácidos di-, tri-hidroxicolestanoico, fitánico y pristánico, así como de plasmalógenos en membranas eritrocíticas. El estudio de un paciente con sospecha de enfermedad peroxisomal debe incluir estudios detallados en fibroblastos, incluyendo las determinaciones enzimáticas apropiadas, estudios de complementación genética y análisis molecular. El diagnóstico prenatal de varias de estas enfermedades puede hacerse en forma confiable dado que los métodos actuales pueden llevar a cabo estas determinaciones directamente en muestras de vellocidades coriales, lo que evita el riesgo asociado con el cultivo de este tejido.

Defectos en la biosíntesis de éter-fosfolípidos. Existen dos enfermedades causadas por defectos en la biosíntesis de los éter-fosfolípidos: una por deficiencia de dihidroxiacetonafofato aciltransferasa y otra por deficiencia de sintasa de alquil-dehidroxiacetonafofato. Las manifestaciones clínicas de estos pacientes son similares a la condrodismatía rizomélica puntata (RCDP) en prácticamente todos los aspectos, incluyendo el acortamiento rizomélico de las extremidades superiores, la facies típica, contracturas congénitas, cataratas, talla corta y retraso mental severo con espasticidad.

Defectos en la biosíntesis de isoprenoides. La deficiencia de mevalonato cinasa es la única enfermedad conocida que afecta el componente peroxisomal de la síntesis de isoprenoides. A diferencia de la deficiencia clásica de la mevalonato cinasa, que se asocia a un profundo retraso en el desarrollo, dismordias faciales y cataratas (101), esta deficiencia se ha observado también asociada a hiperinmunoglobulinemia D y síndrome de fiebre periódica (102,103).

Adrenoleucodistrofia ligada al X (X-ALD). Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen *ABCD1* (104) ubicado en el cromosoma X, es progresiva y afecta el sistema nervioso, la corteza suprarrenal y los testículos, y tiene una incidencia de 1:17,000. *ABCD1* codifica para la proteína ALDP, miembro de la familia de los transportadores ABC⁸. Las mutaciones identificadas hasta ahora se encuentran compiladas en www.x-ald.nl. Su forma de herencia, como su nombre lo indica, es recesiva ligada al X, es decir lo padecen los varones que portan la mutación y lo transmiten las mujeres. Los datos bioquímicos más característicos son la elevación de ácidos grasos de cadena muy larga en el plasma de los pacientes (105), aunque las manifestaciones clínicas de esta enfermedad varían enormemente, por ejemplo, en el grado de pigmentación periungueal que desarrollan (Figura 6). Las Tablas 2 y 3 resumen los diferentes fenotipos identificados hasta el momento, así como su frecuencia relativa. Las manifestaciones neurológicas pueden subdividirse en dos categorías principales, que ocurren con una frecuencia aproximadamente igual a la forma cerebral y a la forma adrenomieloneuropatía (AMN). Las formas cerebrales se asocian a un proceso de desmielinización inflamatoria (106), en el que

⁸ ABC, del inglés: ATP Binding Cassette.

parece participar un proceso autoinmune (107) y se caracteriza por presentar imágenes de resonancia magnética nuclear (MRI) que afectan con mayor frecuencia las regiones parietooccipitales como se observa en la Figura 7. Las formas cerebrales progresan rápidamente y manifiestan mayores alteraciones conductuales y de aprendizaje en niños entre 4 y 8 años de edad, aunque también se puede manifestar en la adolescencia y en la edad adulta (108). La AMN afecta tractos largos de la médula espinal y causa paraparesis progresiva en adultos jóvenes. Aproximadamente 50% de las mujeres que son heterocigotas (portadoras) para X-ALD, desarrollan un síndrome similar a AMN (AMN-like) a edades jóvenes o maduras (109). La única forma de tratamiento que ha probado ofrecer beneficios en pacientes afectados, es el trasplante de médula ósea. Actualmente se encuentran en estudio diferentes protocolos de investigación que estudian otras alternativas de tratamiento efectivo (110).

Tabla 2. Fenotipos de adrenoleucodistrofia ligada al X en varones (110).

Fenotipo	Descripción	Frecuencia relativa estimada
Cerebral infantil	Inicio entre 3 y 10 años de edad. Comportamiento progresivo, deficiencia cognitiva y neurológica, generalmente da lugar a discapacidad durante los 3 primeros años de evolución. Desmielinización inflamatoria cerebral.	31-35%
Adolescente	Similar a la forma cerebral infantil. Edad de inicio 11-21 años. Progresión mas lenta que la forma infantil.	4-7%
Adrenomieloneuropatía (AMN)	Inicio a los 28±9 años, progresivo durante décadas. Afecta principalmente la médula espinal, axonopatía inflamatoria con respuesta débil o ausente. Aproximadamente el 40% tienen o desarrollan afección cerebral con diferentes grados de reacción inflamatoria y progresión más rápida.	40-46%
Cerebral del adulto	Demencia, alteraciones conductuales. Algunas veces deficiencias focales sin adrenomieloneuropatía previa. Reacción inflamatoria de la sustancia blanca. La progresión es similar a la forma cerebral infantil.	2-5%
Olivo-ponto-cerebelar	Principalmente afección cerebelar y del tallo cerebral en adolescentes y edad adulta.	1-2%
Solo addison	Insuficiencia suprarrenal primaria sin afección neurológica aparente. Edad común de inicio antes de los 7.5 años. La mayoría desarrollan eventualmente AMN.	Varía con la edad. Hasta 50% en la infancia.
Asintomática	Anormalidades bioquímicas y presencia de la mutación responsable sin alteraciones neurológicas o adrenales. Estudios detallados subsecuentes generalmente muestran hipofunción adrenal o datos sutiles de AMN.	Disminuye con la edad. Común en <4 años. Muy rara > 40 años

Tabla 3. Fenotipos de adrenoleucodistrofia ligada al X en mujeres portadoras (110).

Fenotipo	Descripción	Frecuencia relativa estimada
Asintomático	Sin evidencia de afección adrenal o neurológica.	Disminuye con la edad. La mayor parte de las mujeres < 30 años neurológicamente no afectadas.
Mielopatía leve	Aumento de los reflejos tendinosos profundos y cambios sensoriales distales en las extremidades inferiores con mínima discapacidad o sin ella.	Aumenta con la edad. Aproximadamente 50% en > 40 años.
Mieloneuropatía moderada a severa.	Los datos clínicos y patológicos son similares a AMN, pero con inicio menos severo y más tardío.	Aumenta con la edad. Aproximadamente 15% en >40 años.
Afección cerebral	Se observa rara vez durante la infancia y discretamente más común en edades adultas jóvenes y maduros.	Aproximadamente 2%.
Insuficiencia adrenal evidente clínicamente	Rara a cualquier edad.	Aproximadamente 1%.



Figura 6. Hiperpigmentación de la región periungueal en un paciente con adrenoleucodistrofia ligada al X, en su forma cerebral infantil. Esta manifestación puede observarse especialmente en pacientes con datos de insuficiencia adrenal. Compárese con la misma región en los dedos de la madre del paciente (abajo)

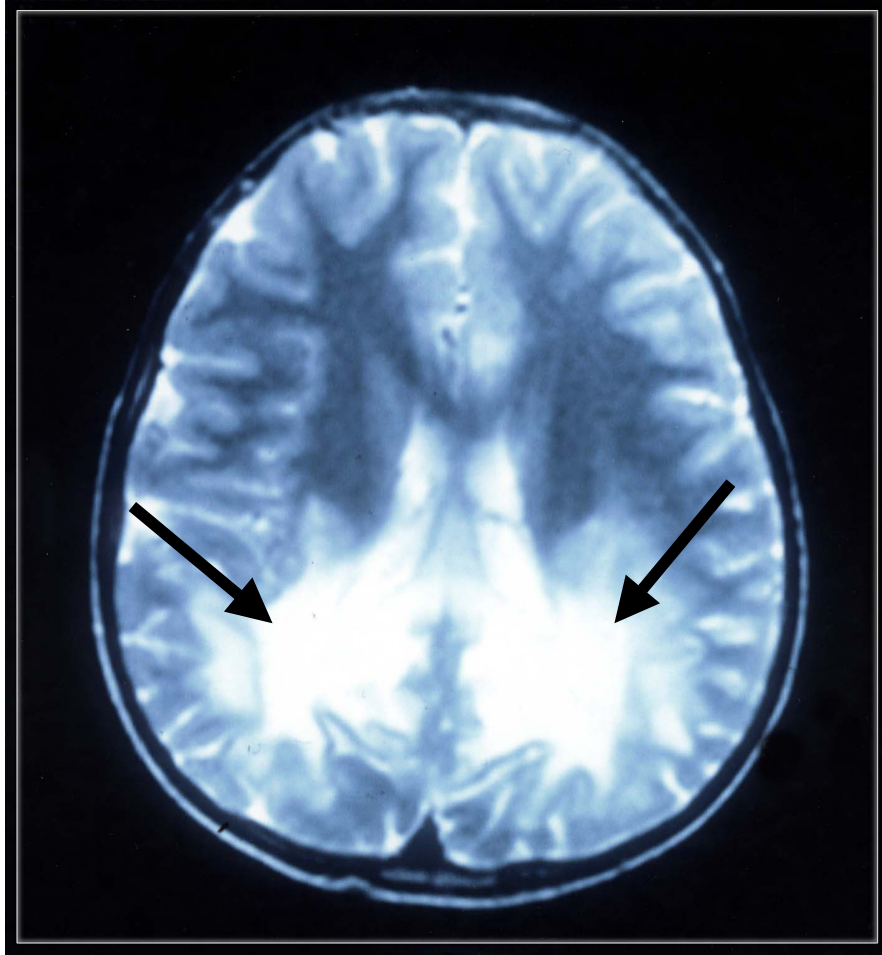


Figura 7. Imagen de resonancia magnética nuclear cerebral, en la que se observan áreas importantes de desmielinización occipital en un paciente con adrenoleucodistrofia ligada al X.

Referencias

1. Chang, C.C. et al. Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1579-90 (1999).
2. Espeel, M. et al. Biogenesis of peroxisomes in fetal liver. *Microsc Res Tech* 39, 453-66 (1997).
3. Fahimi, H.D. & Baumgart, E. Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review. *J Histochem Cytochem* 47, 1219-32 (1999).
4. de Duve, C. The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 173, 71-83 (1969).
5. de Duve, C. Microbodies in the living cell. *Sci Am* 248, 74-84 (1983).
6. Dansen, T.B., Wirtz, K.W., Wanders, R.J. & Pap, E.H. Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. *Nat Cell Biol* 2, 51-3 (2000).
7. Singh, I., Moser, A.E., Goldfischer, S. & Moser, H.W. Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4203-7 (1984).

8. Nagan, N. & Zoeller, R.A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40, 199-229 (2001).
9. Wanders, R.J. & Romeijn, G.J. Differential deficiency of mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase in patients with distinct defects in peroxisome biogenesis: evidence for a major role of peroxisomes in cholesterol biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 663-7 (1998).
10. Gould, S.J. & Valle, D. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet* 16, 340-5 (2000).
11. Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A. The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* 23, 231-3 (1998).
12. Tabak, H.F., Braakman, I. & Distel, B. Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol* 9, 447-53 (1999).
13. South, S.T. & Gould, S.J. Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol* 144, 255-66 (1999).
14. Lazarow, P.B. & Fujiki, Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530 (1985).
15. Sacksteder, K.A. et al. PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* 148, 931-44 (2000).
16. Matsuzono, Y. et al. Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2116-21 (1999).
17. South, S.T., Sacksteder, K.A., Li, X., Liu, Y. & Gould, S.J. Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* 149, 1345-60 (2000).
18. Gould, S.J., Raymond, G. & Valle, D. The peroxisome biogenesis disorders. in *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Vol. II (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 3181 (McGraw Hill, New York, 2001).
19. Eckert, J.H. & Erdmann, R. Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (2003).
20. Hettema, E.H., Distel, B. & Tabak, H.F. Import of proteins into peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 1451, 17-34 (1999).
21. Shimozawa, N. et al. Genetic basis of peroxisome-assembly mutants of humans, Chinese hamster ovary cells, and yeast: identification of a new complementation group of peroxisome-biogenesis disorders apparently lacking peroxisomal-membrane ghosts. *Am J Hum Genet* 63, 1898-903 (1998).
22. Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108, 1657-64 (1989).
23. Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A. & Subramani, S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Embo J* 10, 3255-62 (1991).
24. van der Klei, I. & Veenhuis, M. Peroxisomes: flexible and dynamic organelles. *Curr Opin Cell Biol* 14, 500-5 (2002).
25. Hajra, A.K. & Bishop, J.E. Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway. *Ann N Y Acad Sci* 386, 170-82 (1982).
26. Pedersen, J.I. Peroxisomal oxidation of the steroid side chain in bile acid formation. *Biochimie* 75, 159-65 (1993).
27. Lazarow, P.B. & De Duve, C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2043-6 (1976).
28. Suzuki, H., Yamada, J., Watanabe, T. & Suga, T. Compartmentation of dicarboxylic acid beta-oxidation in rat liver: importance of peroxisomes in the metabolism of dicarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta* 990, 25-30 (1989).
29. Verhoeven, N.M. et al. Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 39, 66-74 (1998).
30. Wanders, R.J., Jansen, G.A. & Lloyd, M.D. Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim Biophys Acta* 1631, 119-35 (2003).
31. Yamada, J., Ogawa, S., Horie, S., Watanabe, T. & Suga, T. Participation of peroxisomes in the metabolism of xenobiotic acyl compounds: comparison between peroxisomal and mitochondrial beta-oxidation of omega-phenyl fatty acids in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 921, 292-301 (1987).
32. Schepers, L. et al. Beta-oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E2 in rat liver peroxisomes and mitochondria. *J Biol Chem* 263, 2724-31 (1988).
33. Fauler, J., Tsikas, D., Mayatepek, E., Keppler, D. & Frolich, J.C. Impaired degradation of prostaglandins and thromboxane in Zellweger syndrome. *Pediatr Res* 36, 449-55 (1994).
34. Mannaerts, G.P., Van Veldhoven, P., Van Broekhoven, A., Vandebroek, G. & Debeer, L.J. Evidence that peroxisomal acyl-CoA synthetase is located at the cytoplasmic side of the peroxisomal membrane. *Biochem J* 204, 17-23 (1982).

35. Shindo, Y. & Hashimoto, T. Acyl-Coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes. *J Biochem (Tokyo)* 84, 1177-81 (1978).
36. Singh, H. & Poulos, A. Distinct long chain and very long chain fatty acyl CoA synthetases in rat liver peroxisomes and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 266, 486-95 (1988).
37. Steinberg, S.J., Morgenthaler, J., Heinzer, A.K., Smith, K.D. & Watkins, P.A. Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 275, 35162-9 (2000).
38. Singh, I. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol Cell Biochem* 167, 1-29 (1997).
39. Osumi, T., Hashimoto, T. & Ui, N. Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 87, 1735-46 (1980).
40. Van Veldhoven, P.P. et al. Identification and purification of a peroxisomal branched chain fatty acyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 266, 24676-83 (1991).
41. Van Veldhoven, P.P., Van Rompuy, P., Fransen, M., De Bethune, B. & Mannaerts, G.P. Large-scale purification and further characterization of rat pristanoyl-CoA oxidase. *Eur J Biochem* 222, 795-801 (1994).
42. Van Veldhoven, P.P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H.J. & Mannaerts, G.P. Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 267, 20065-74 (1992).
43. Schepers, L., Van Veldhoven, P.P., Casteels, M., Eyssen, H.J. & Mannaerts, G.P. Presence of three acyl-CoA oxidases in rat liver peroxisomes. An inducible fatty acyl-CoA oxidase, a noninducible fatty acyl-CoA oxidase, and a noninducible trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 265, 5242-6 (1990).
44. Vanhove, G.F. et al. The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* 268, 10335-44 (1993).
45. Furuta, S., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T. & Ui, N. Properties of mitochondria and peroxisomal enoyl-CoA hydratases from rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 88, 1059-70 (1980).
46. Palosaari, P.M. & Hiltunen, J.K. Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase activities. *J Biol Chem* 265, 2446-9 (1990).
47. Osumi, T. & Hashimoto, T. Peroxisomal beta oxidation system of rat liver. Copurification of enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 89, 580-4 (1979).
48. Jiang, L.L., Miyazawa, S., Souri, M. & Hashimoto, T. Structure of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *J Biochem (Tokyo)* 121, 364-9 (1997).
49. Jiang, L.L., Miyazawa, S. & Hashimoto, T. Purification and properties of rat D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase: D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *J Biochem (Tokyo)* 120, 633-41 (1996).
50. Wanders, R.J., van Grunsven, E.G. & Jansen, G.A. Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem Soc Trans* 28, 141-9 (2000).
51. Miyazawa, S., Furuta, S., Osumi, T., Hashimoto, T. & Ui, N. Properties of peroxisomal 3-ketoacyl-coA thiolase from rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 90, 511-9 (1981).
52. Seedorf, U., Brysch, P., Engel, T., Schrage, K. & Assmann, G. Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thiolase with intrinsic sterol carrier and lipid transfer activity. *J Biol Chem* 269, 21277-83 (1994).
53. Wanders, R.J. et al. Identification of the newly discovered 58 kDa peroxisomal thiolase SCPx as the main thiolase involved in both pristanic acid and trihydroxycholestanic acid oxidation: implications for peroxisomal beta-oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis* 21, 302-5 (1998).
54. Seedorf, U. et al. Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev* 12, 1189-201 (1998).
55. Bun-ya, M. et al. Thiolase involved in bile acid formation. *J Biochem (Tokyo)* 123, 347-52 (1998).
56. Lazarow, P.B. Rat liver peroxisomes catalyze the beta oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* 253, 1522-8 (1978).
57. McGarry, J.D. & Brown, N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244, 1-14 (1997).
58. Hettema, E.H. et al. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 3813-22 (1996).

59. Tanaka, A.R. et al. ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J Biol Chem* 277, 40142-7 (2002).
60. Kitareewan, S. et al. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol Biol Cell* 7, 1153-66 (1996).
61. Steinberg, D. et al. Effects of dietary phytol and phytanic acid in animals. *J Lipid Res* 7, 684-91 (1966).
62. Ratnayake, W.M., Olsson, B. & Ackman, R.G. Novel branched-chain fatty acids in certain fish oils. *Lipids* 24, 630-7 (1989).
63. Zomer, A.W. et al. Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Lipid Res* 41, 1801-7 (2000).
64. Heim, M. et al. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *Faseb J* 16, 718-20 (2002).
65. Lee, C.H., Olson, P. & Evans, R.M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144, 2201-7 (2003).
66. Herndon, J.H., Jr., Steinberg, D. & Uhlendorf, B.W. Refsum's disease: defective oxidation of phytanic acid in tissue cultures derived from homozygotes and heterozygotes. *N Engl J Med* 281, 1034-8 (1969).
67. Poulos, A., Sharp, P. & Whiting, M. Infantile Refsum's disease (phytanic acid storage disease): a variant of Zellweger's syndrome? *Clin Genet* 26, 579-86 (1984).
68. Watkins, P.A., Howard, A.E., Gould, S.J., Avigan, J. & Mihalik, S.J. Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J Lipid Res* 37, 2288-95 (1996).
69. Steinberg, S.J., Wang, S.J., Kim, D.G., Mihalik, S.J. & Watkins, P.A. Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 615-21 (1999).
70. Van Veldhoven, P.P., Casteels, M., Mannaerts, G.P. & Baes, M. Further insights into peroxisomal lipid breakdown via alpha- and beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* 29, 292-8 (2001).
71. Mihalik, S.J., Rainville, A.M. & Watkins, P.A. Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver peroxisomes. Production of alpha-hydroxyphytanoyl-CoA and formate is enhanced by dioxygenase cofactors. *Eur J Biochem* 232, 545-51 (1995).
72. Croes, K., Casteels, M., De Hoffmann, E., Mannaerts, G.P. & Van Veldhoven, P.P. alpha-Oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids in rat liver. Production of formic acid instead of CO₂, cofactor requirements, subcellular localization and formation of a 2-hydroxy-3-methylacyl-CoA intermediate. *Eur J Biochem* 240, 674-83 (1996).
73. Foulon, V. et al. Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during alpha-oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10039-44 (1999).
74. Wanders, R.J. & Tager, J.M. Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol Aspects Med* 19, 69-154 (1998).
75. Hajra, A.K. Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1348, 27-34 (1997).
76. Nagan, N. et al. A fibroblast cell line defective in alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase: a novel defect in plasmalogen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4475-80 (1997).
77. de Vet, E.C. & van den Bosch, H. Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase. *Cell Biochem Biophys* 32 Spring, 117-21 (2000).
78. Olivier, L.M. & Krisans, S.K. Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1529, 89-102 (2000).
79. Hogenboom, S. et al. Absence of functional peroxisomes does not lead to deficiency of enzymes involved in cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 43, 90-8 (2002).
80. Gallegos, A.M. et al. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res* 40, 498-563 (2001).
81. Murphy, E.J., Stiles, T. & Schroeder, F. Sterol carrier protein-2 expression alters phospholipid content and fatty acyl composition in L-cell fibroblasts. *J Lipid Res* 41, 788-96 (2000).
82. L, I.J., de Kromme, I., Oostheim, W. & Wanders, R.J. Molecular cloning and expression of human L-pipecolate oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 1101-5 (2000).
83. Tranchant, C. et al. A new peroxisomal disease with impaired phytanic and pipecolic acid oxidation. *Neurology* 43, 2044-8 (1993).
84. Liu, L., Trimarchi, J.R., Navarro, P., Blasco, M.A. & Keefe, D.L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability and apoptosis. *J Biol Chem* (2003).
85. Epe, B. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383, 467-75 (2002).

86. Agarwal, A., Saleh, R.A. & Bedaiwy, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79, 829-43 (2003).
87. Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B. & Drexler, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91, 7A-11A (2003).
88. Rojkind, M., Dominguez-Rosales, J.A., Nieto, N. & Greenwel, P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 59, 1872-91 (2002).
89. Anantharaju, A., Feller, A. & Chedid, A. Aging Liver. A review. *Gerontology* 48, 343-53 (2002).
90. Singh, I. Peroxisomal fatty acid oxidation and cellular redox. *Methods Enzymol* 352, 361-72 (2002).
91. Wanders, R.J.A., Barth, P.G. & Heymanns, H.S. Single peroxisomal enzyme deficiencies. in *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 3219-3256 (McGraw-Hill, New York, 2001).
92. Bowen, P., Lee, C.S.N., Zellweger, H. & Lindenberg, R. A familial syndrome of multiple congenital anomalies. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 114, 402 (1964).
93. Danks, D.M., Tippett, P., Adams, C. & Campbell, P. Cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger. A report of eight cases with comments upon the incidence, the liver lesion, and a fault in pipecolic acid metabolism. *J Pediatr* 86, 382-7 (1975).
94. Lazarow, P.B. & Moser, H.W. Disorders of peroxisome biogenesis. in *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) (McGraw Hill, New York, 1995).
95. Goldfischer, S. et al. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 182, 62-4 (1973).
96. Ulrich, J., Herschkowitz, N., Heitz, P., Sigrist, T. & Baerlocher, P. Adrenoleukodystrophy. Preliminary report of a connatal case. Light- and electron microscopical, immunohistochemical and biochemical findings. *Acta Neuropathol (Berl)* 43, 77-83 (1978).
97. Scotto, J.M. et al. Infantile phytanic acid storage disease, a possible variant of Refsum's disease: three cases, including ultrastructural studies of the liver. *J Inherit Metab Dis* 5, 83-90 (1982).
98. Heymans, H.S., Oorthuys, J.W., Nelck, G., Wanders, R.J. & Schutgens, R.B. Rhizomelic chondrodysplasia punctata: another peroxisomal disorder. *N Engl J Med* 313, 187-8 (1985).
99. Hoefler, G. et al. Biochemical abnormalities in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Pediatr* 112, 726-33 (1988).
100. Baumgartner, M.R. et al. Clinical approach to inherited peroxisomal disorders: a series of 27 patients. *Ann Neurol* 44, 720-30 (1998).
101. Hoffmann, G.F. et al. Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics* 91, 915-21 (1993).
102. Houten, S.M. et al. Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 22, 175-7 (1999).
103. Drenth, J.P. et al. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nat Genet* 22, 178-81 (1999).
104. Mosser, J. et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters [see comments]. *Nature* 361, 726-30 (1993).
105. Igarashi, M. et al. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* 26, 851-60 (1976).
106. Schaumburg, H.H., Powers, J.M., Raine, C.S., Suzuki, K. & Richardson, E.P., Jr. Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol* 32, 577-91 (1975).
107. Ito, M. et al. Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adrenoleukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 1004-19 (2001).
108. van Geel, B.M., Bezman, L., Loes, D.J., Moser, H.W. & Raymond, G.V. Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 49, 186-94 (2001).
109. Fatemi, A. et al. MRI and proton MRSI in women heterozygous for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 60, 1301-1307 (2003).
110. Moser, H.W. et al. Design of a Therapeutic Trial for Diseases: The Adrenoleukodystrophy Model. in *Hereditary Leukodystrophy and Neuropathies in Childhood* (John Libby Eurotext, Milano, Italy, 2003).

Semblanza del Dr. Gerardo Jiménez-Sánchez.



El Dr. Gerardo Jiménez-Sánchez es originario de la Ciudad de México. Médico Cirujano egresado de la UNAM. Realizó su residencia en el Instituto Nacional de Pediatría. Obtuvo su doctorado en Genética Humana y Biología Molecular en la Universidad Johns Hopkins en EUA. Actualmente es investigador en el Instituto de Medicina Genética de la Universidad Johns Hopkins en Baltimore, EUA. y director del Consorcio Promotor del Instituto de Medicina Genómica de México. Además se desempeña como Investigador Residente de la Fundación Mexicana para la Salud y es miembro de la Comisión Nacional para el Genoma Humano. El Dr. Jiménez-Sánchez es profesor titular de los cursos “Introducción a la medicina genómica”, “Pediatría genómica” y “Aplicaciones genómicas a la medicina interna”, en la Facultad de Medicina de la UNAM. Su trabajo actual se centra en el diagnóstico y tratamiento de niños con enfermedades metabólicas hereditarias, la producción de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas, el análisis médico del genoma humano y el desarrollo de la medicina genómica, particularmente en los esfuerzos que se realizan en México para el establecimiento del Instituto Nacional de Medicina Genómica. El Dr. Jiménez-Sánchez es pediatra certificado por el Consejo Mexicano de Pediatría, miembro de la Academia Mexicana de Pediatría, de la Sociedad Mexicana de Pediatría, la Asociación Mexicana de Genética Humana y de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, de las Sociedades Norteamericanas de Genética Humana, de Enfermedades Metabólicas Hereditarias, y de Terapia Génica, así como de la Sociedad Europea de Enfermedades Metabólicas Hereditarias y la Organización Mundial del Genoma Humano (HUGO). En 1997, ingresó por invitación, a la Academia de Ciencias de Nueva York. El trabajo del Dr. Jiménez-Sánchez ha dado lugar a la publicación de artículos y capítulos en revistas y libros especializados. En 1999 obtuvo el premio a la mejor investigación en pediatría por la Society for Pediatric Research de los Estados Unidos. En el año 2001 elaboró el primer análisis médico sobre el Genoma Humano, que se publicó con los resultados del Proyecto del Genoma Humano en la revista Nature. En Abril del 2001 recibió el Premio “Dr. Miguel Otero” al mérito en investigación clínica del Consejo de Salubridad General de México. En 2003 fue electo Presidente Fundador de la Sociedad Mexicana de Medicina Genómica.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

VIRTUDES Y PECADOS DE UNA ENZIMA: LA F_0F_1 ATP SINTASA

Lenin Domínguez-Ramírez, y Marietta Tuena de Gómez-Puyou

Departamento de Genética Molecular. Laboratorio 105-Oriente, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México.

jdoming@ifc.unam.mx

Introducción

El ATP es la molécula de alta energía más común en la naturaleza. En bacterias, hongos, plantas y animales, esta base nitrogenada y fosforilada es utilizada para proveer la energía a una gran variedad de reacciones químicas. Además actúa como molécula reguladora de varias actividades enzimáticas y es sustrato para la síntesis del ADN (1). Existen muchas enzimas que hidrolizan ATP, pero el 95% del ATP sintetizado por nuestras células en condiciones aerobias, es generado por la F_0F_1 ATP sintasa.

La F_0F_1 ATP sintasa es un complejo enzimático ampliamente distribuido en la naturaleza, localizado en la membrana plasmática de bacterias, la membrana tilacoidal del cloroplasto y la membrana interna mitocondrial. Mientras que en bacterias su principal función es generar un potencial electroquímico al hidrolizar ATP, en eucariontes el potencial electroquímico generado por la cadena respiratoria ó fotosintética se aprovecha para sintetizar ATP (2). La

estructura primaria de este complejo está altamente conservada, con una identidad de 71.8% entre las subunidades catalíticas de los complejos de bovino y de *Escherichia coli* (3).

Desde que Peter Mitchell en 1961 propuso la Hipótesis Quimiosmótica (2), se ha postulado que el complejo F_0F_1 cataliza al menos dos reacciones acopladas: el transporte vectorial de protones y la síntesis de ATP. En mitocondrias, el transporte vectorial significaría la entrada de protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial. La reacción de síntesis del ATP, que es la unión de un fosfato (Pi) a un ADP mediante un enlace fosfodiéster, procede sin la formación de un intermediario fosforilado.

El nombre del complejo, F_0F_1 , refleja la distribución de éste en dos ambientes: por una parte el segmento hidrofóbico (F_0), que está embebido en la membrana, y por otra, el segmento hidrofílico (F_1), que sobresale al solvente. En procariontes, el segmento F_0 contiene los sitios de transporte iones, protones o sodio, y está formado básicamente por 3 subunidades: **a**, **b** y **c** (4). El segmento F_1 está compuesto por 5 subunidades: α_3 , β_3 , γ , δ y ϵ , con una estequiometría indicada en los subíndices (5). Asimismo, contiene 6 sitios de unión de nucleótidos, tres de ellos son catalíticos y tres no-catalíticos.¹

La estructura bipartita de la F_0F_1 ATP sintasa se ha observado desde las primeras micrografías electrónicas del complejo en la membrana (6). Con el tiempo, la técnica se ha refinado hasta lograr darnos imágenes más completas (7, 8). Esta técnica, junto con la cristalografía de rayos X, nos han proporcionado la mayor parte de los datos estructurales de alta resolución disponibles actualmente.

A la transformación de la energía del gradiente de H^+ en energía química de enlace del ADP y el Pi se conoce como transducción y la enzima la realiza mediante la acción sucesiva de dos motores: el que transporta los protones, F_0 , que al rotar transmite la energía a los sitios catalíticos del F_1 , el segundo motor. Esta última función, vital para la economía de la célula, así como los cambios conformacionales que ocurren en el seno de la enzima, constituyen sus primordiales *virtudes*, las cuales desglosaremos en las siguientes secciones.

Por otro lado, recientemente se ha descrito la localización ectópica de algunas subunidades de la ATP sintasa, que no realizan la función primordial de sintetizar ATP y a los que hemos clasificado como *pecados*.

¹ Nota del editor: Se recomienda revisar también en esta misma colección, el artículo de Tuena de Gómez-Puyou M (1989). ATP sintasa: Correlaciones entre estructura y mecanismo catalítico. En: Salinas Mejía ME, Vázquez Alcántara MA, Ponce Frausto J, Fernández-Gavarrón F y Díaz Zagoya JC (eds). Mensaje Bioquímico, Vol. XII. pp 41-63.

Tabla 1. Distribución de las subunidades de la ATP sintasa en los segmentos F_1 y F_0 . Equivalencias entre diferentes organismos y sus nomenclaturas.

Segmento	Subunidades			Estequiometría	Localización del gen
	Bovino (P.M. kDa)	Levadura (P.M. kDa)	E. coli (P.M. kDa)		
F_1	α (55)	α (54)	α (55)	3	Nuclear
	β (51)	β (51)	β (50)	3	Nuclear
	γ (30)	γ (30)	γ (32)	1	Nuclear
	δ (15)	δ (14)	ϵ (14)	1	Nuclear
	ϵ (5.6)	ϵ (6.6)		1	Nuclear
	OSCP (20)	OSCP (20)	δ (19)	1	Nuclear
	IF_1 (9.5)	IF_1 (7.3)		1	Nuclear
F_0	a (24)	6 (27)	a (30)	1	Mitocondrial
	b (F_0 -PVP) (24)	4 (23)	b (17)	1-2	Nuclear
	c (7.6)	9 (7.7)	c (8.2)	9-12	Nuclear (bovino) Mitocondrial (levadura)
	A6L (7.9)	8 (5.8)		1	Mitocondrial
	d (18)	d (19)		1	Nuclear
	f (10)	f (10)		n.d. ¹	Nuclear
	F6 (8.9)	h (10)		n.d.	Nuclear
		9 kDa		n.d.	Nuclear
		15 kDa		n.d.	Nuclear
	e (8.1)	e (10)		n.d.	Nuclear
	g (11)	g (12)		n.d.	Nuclear
		i (6.6)		1	Nuclear
	k (7.5)		n.d.	Nuclear	

¹ n.d., no determinada.

VIRTUDES.

1.- BIOGÉNESIS.

La F_0F_1 ATP sintasa de *E. coli* se ha tomado como la enzima modelo en muchos sentidos. Por ejemplo, en dicho organismo, toda la información genética que codifica para el complejo, está en un sólo operón que contiene las 8 subunidades que lo forman (operon *atp* ó *unc*). Consecuentemente, la transcripción de los 8 genes genera un sólo ARN mensajero policistrónico (9). A partir de este mensajero único, procede la traducción². En diferentes procariontes, esta organización del operón se mantiene con pequeñas modificaciones.

En eucariontes, los genes que codifican para las más de 15 subunidades diferentes del complejo, se encuentran localizados tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial (ver

² Se desconoce el mecanismo por el cual de éste policistrón se obtienen las diferentes estequiometrías en las subunidades del complejo F_0F_1 .

Tabla 1), entre ambos genomas existe una interacción muy estrecha en la expresión de las subunidades nucleares y las mitocondriales.

2.- COMPOSICIÓN POLIPEPTÍDICA.

El complejo F_1 de *E. coli*, uno de los más sencillos, está formado por las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , y su F_0 está formado por las subunidades **a**, **b**, **c**. Por ello, estas 8 subunidades son consideradas como indispensables para la catálisis. Por otra parte, los complejos F_0F_1 de eucariontes poseen subunidades accesorias que desempeñan funciones estructurales importantes. Así, las subunidades **d**, **e**, **F6**, **A6L**, **f** y **g** son consideradas como indispensables en la formación del canal de H^+ en F_0 , mientras que la OSCP y la IF_1 aparecen en el F_1 (10). La proteína que confiere sensibilidad a oligomicina, OSCP (del inglés: Olygomycin Sensitive Conferring Protein) es considerada homóloga a la subunidad δ de *E. coli* y ambas (OSCP y δ) poseen una función estructural ya que son parte del conector periférico de F_0 con F_1 . En cambio, la proteína inhibidora (IF_1) parece ser exclusiva de eucariontes, aunque es importante señalar que la subunidad ϵ de *E. coli* también tiene una función inhibidora.

3.- ESTRUCTURA DE LOS COMPLEJOS F_1 Y F_0F_1 .

Históricamente, la imagen estructural del complejo F_0F_1 se ha obtenido mediante la utilización de dos diferentes técnicas: la microscopía electrónica y la cristalografía de proteínas. La criomicroscopía electrónica fue la técnica que dio la primera imagen de alta resolución de todo el complejo. En dicha imagen se observa claramente su estructura bipartita, el sector embebido en la membrana (F_0) y el segmento que sobresale de ésta (F_1).

La primera estructura cristalográfica de alta resolución, que fue publicada en 1994, por Abrahams y cols. (5), muestra un heptámero compuesto por las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma$ con una resolución de 2.8 Å. Una de las características más impactantes de esta estructura es su asimetría. Si bien las subunidades α alternan con las subunidades β formando un cilindro simétrico, es la subunidad γ la que introduce asimetrías en el complejo. La primera asimetría inducida por la subunidad γ se observa en la composición de nucleótidos asociados a los sitios de unión de las subunidades α y β .

En el F_1 existen 6 sitios de fijación de nucleótidos, que están localizados en las subunidades α y β y se encuentran orientados hacia las interfases entre ambas subunidades. Sin embargo, solo tres de ellos son catalíticamente activos y están principalmente en las subunidades β , los restantes sitios son no catalíticos y están localizados en las subunidades α . En la Figura 1, se muestra la estructura tridimensional del complejo F_1 de bovino; en ella los tres sitios no catalíticos están ocupados por AMP-PNP (Adenosina 5'-(β,γ -imido)trifosfato), un análogo no hidrolizable del ATP. Sin embargo, cada uno de los tres sitios catalíticos exhibe una conformación y composición de nucleótidos diferente: uno contiene AMP-PNP, otro ADP y el último está vacío. Se sabe por otra parte, que en ausencia de la subunidad γ , los complejos son simétricos (11).

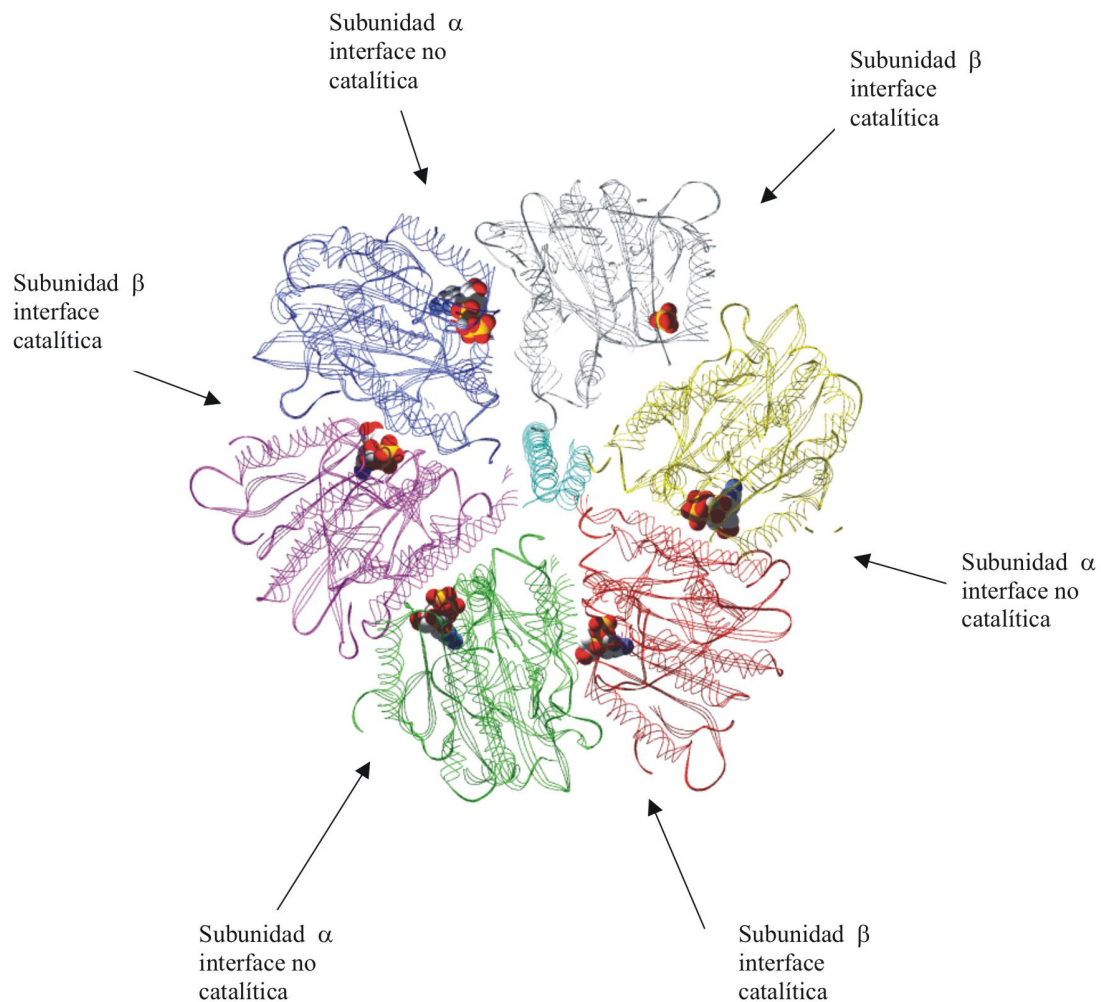


Figura 1. Estructura tridimensional del complejo F_1 de bovino (*Bos taurus*), resuelta por cristalografía de rayos X. En este corte transversal se aprecia en el centro la subunidad γ (azul claro). Las subunidades β , de color violeta, gris y rojo, se muestran con AMP-PNP, sulfato y ADP, correspondientes a las conformaciones de las interfaces catalíticas abierta, vacía y cerrada. Las subunidades α , de color azul, amarillo y verde tienen exclusivamente AMP-PNP en las interfaces no catalíticas.

Desde 1994, año en que se obtuvo la primera estructura tridimensional, a la fecha se han determinado más de 10 estructuras, no solo de varios complejos F_1 , sino también de las subunidades independientes y en diferentes condiciones (ver Tabla 2 y Figuras 1 a 6).

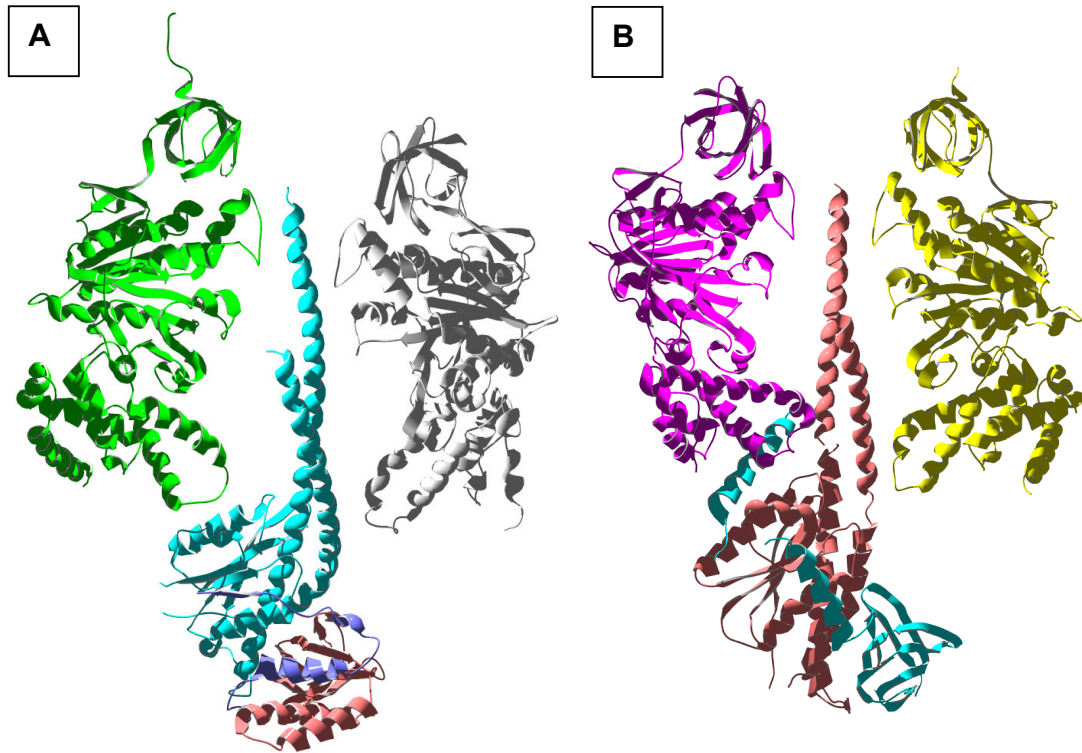


Figura 2.- (A) Complejo F_1 de *Bos taurus* en presencia de DCCD en un corte longitudinal. En esta estructura se observa a las subunidad γ (azul claro) completa, además se ven las subunidades δ (rosa) y ϵ (azul oscuro), en la base de γ . La subunidad α (verde) y la subunidad β (gris) se muestran sin nucleótido. (B) Estructura tridimensional del complejo F_1 de *E. coli* en corte longitudinal. En esta figura se muestran las subunidades α (amarilla), β (violeta), γ (rosa) y ϵ (azul claro). En este complejo procariote, se observa una conformación muy diferente de la subunidad ϵ que la de su equivalente (subunidad δ) del complejo eucarionte (figura 2A).

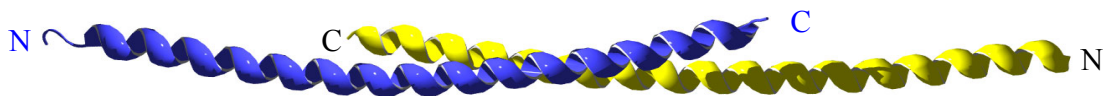


Figura 3. Estructura tridimensional del dímero de IF_1 resuelta por cristalografía de rayos X. Cada subunidad (azul y amarilla) se encuentra enrollada a la otra a través de su extremo carboxilo. Los extremos aminos, que contienen la región inhibitoria, quedan libres. La longitud de éste dímero es de 130 Å.

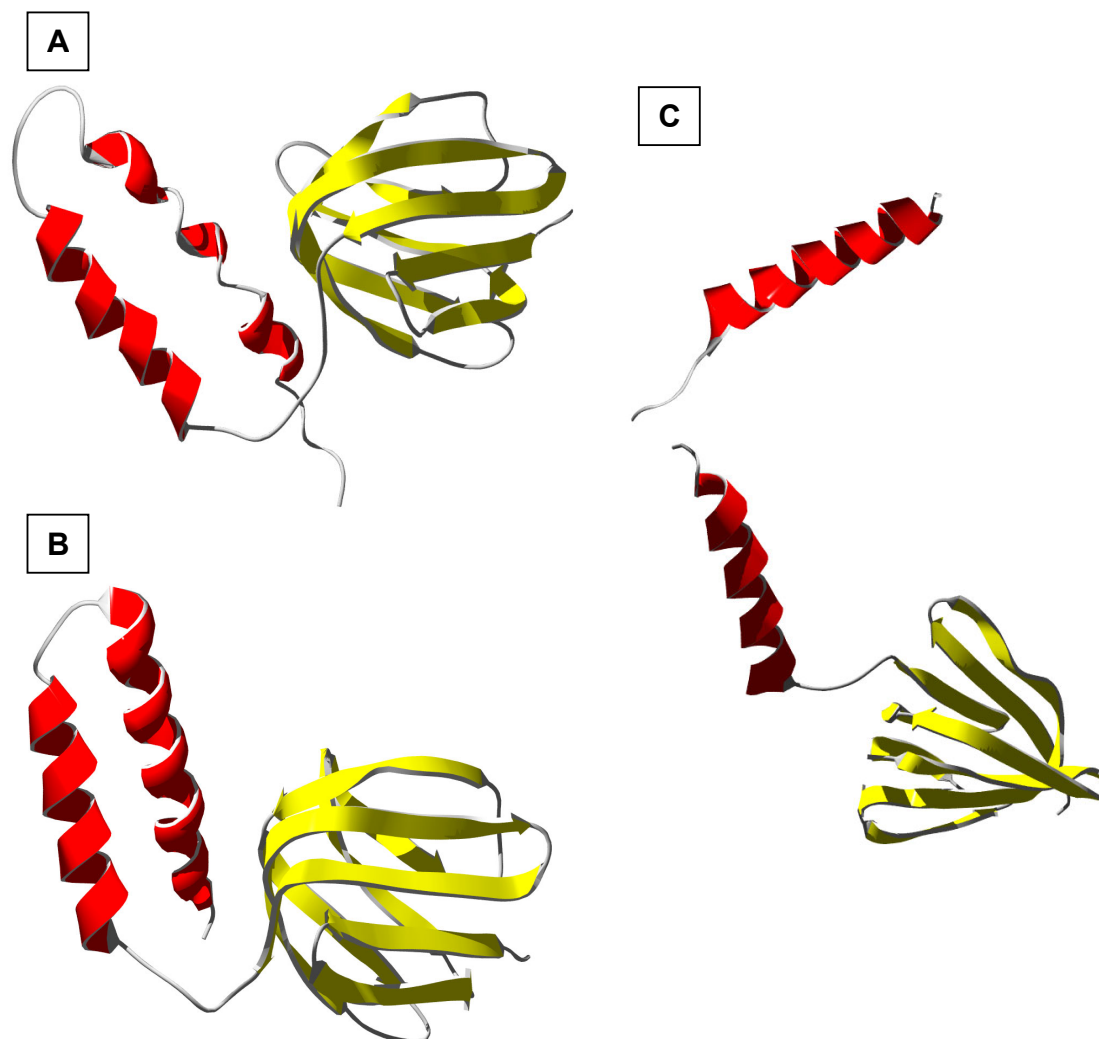


Figura 4.- Homología estructural entre la subunidad ϵ de *E. coli* (A) y la subunidad δ de *B. taurus* (B) en el complejo F_1 . La estructura de la subunidad ϵ de *E. coli* en forma soluble (A) contrasta con la conformación que adquiere en el complejo $\gamma\delta$ (C) en el que tiene una función inhibitoria. La subunidad δ de bovino ha perdido esta función ya que la subunidad ϵ de bovino (exclusiva de eucariotes) restringe su movilidad.

De tal impacto fue la asimetría observada en esta estructura, que ha sido tomada como una prueba más del mecanismo catalítico de fijación de nucleótidos con cambio de afinidad de los sitios activos de la ATP sintasa, descrito por Paul Boyer (12). Dicho mecanismo propone, a grandes rasgos, que cada uno de los tres sitios catalíticos sufre, alternadamente, tres grandes cambios conformacionales acompañados de un cambio de nucleótidos (ADP ó ATP)³. Además,

³ Nota del editor: Se recomienda revisar, de esta misma colección, el artículo de Velásquez I, Guerra G, Martínez F y Pardo JP (1999). Los complejos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa. En: Martínez-

durante cada ciclo cada sitio se encuentra siempre en un estado diferente de los otros dos. Este mecanismo supone la acción de un catalizador rotatorio, en donde el hexámero $\alpha_3\beta_3$ permanece fijo respecto a una subunidad γ rotatoria. Es esta subunidad asimétrica la que induce el cambio conformacional a cada interfase catalítica $\alpha\beta$. Recientemente, las estructuras cristalográficas resueltas para el complejo de *Bos taurus* (bovino) en presencia de varios inhibidores específicos, tanto covalentes como no covalentes (13, 14), han ayudado a elucidar los componentes estructurales clave para la catálisis (Figuras 1 y 2). En todas estas estructuras se preserva la misma asimetría del heptámero de $\alpha_3\beta_3\gamma$, en los sitios catalíticos, que fue descrita desde la primera estructura (5).

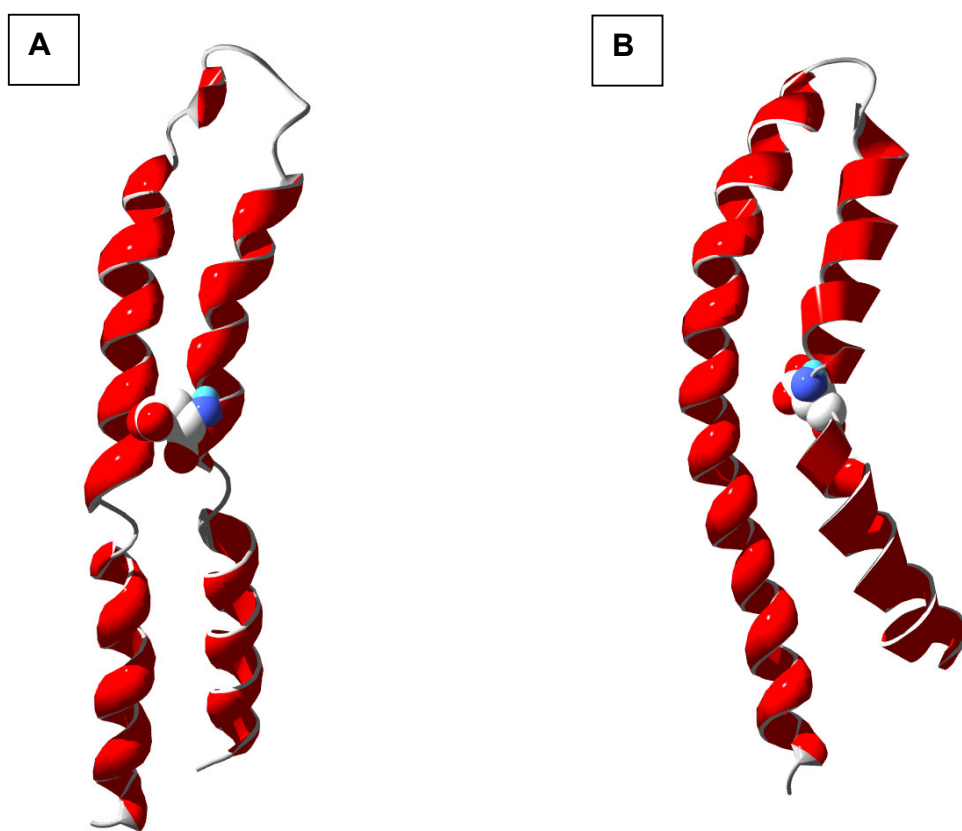


Figura 5. Los datos estructurales de las subunidades de membrana de la F_0F_1 son escasos. Por resonancia magnética nuclear (RMN), se han resuelto los monómeros de c a diferentes condiciones de pH. La subunidad c a pH 5.0 (A) muestra una conformación extendida, en donde se oculta el Asp61. Este aminoácido es indispensable para el transporte de H^+ . A pH 8.0 (B), por el contrario, muestra una conformación diferente con el Asp61 expuesto.

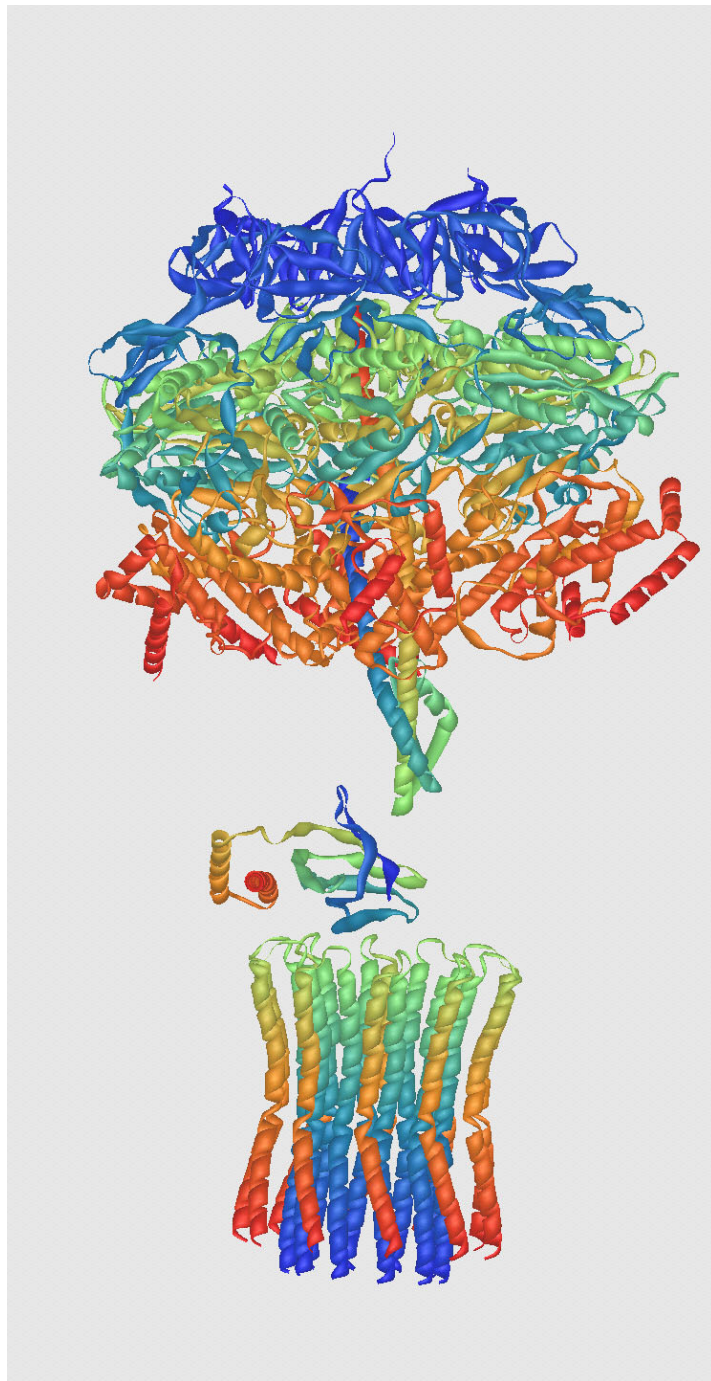


Figura 6. Estructura tridimensional de baja resolución del complejo F_1F_0 de levadura. Se observan las subunidades α , β , γ , δ y el oligómero de 10 subunidades c . Es la única estructura tridimensional donde se aprecia la región hidrofóbica del complejo.

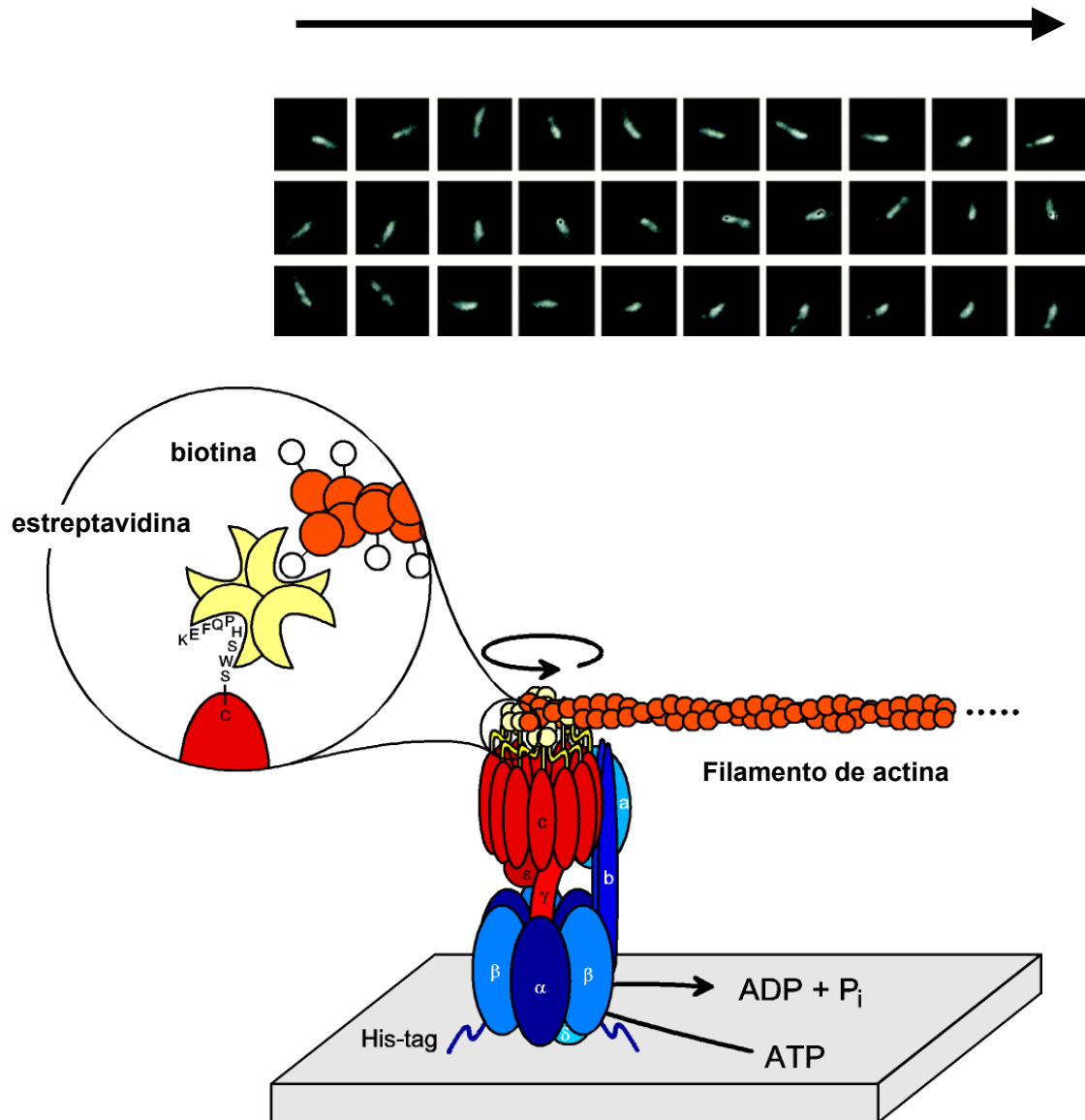


Figura 7. Esquema del complejo F_0F_1 ATP sintasa con el sistema en el que se observó la rotación. Inserto inferior: Detalles del acoplamiento entre las subunidades F_0 -c y el filamento de actina *vía* los complejos estreptavidina-biotina. En este sistema se fijó el estator, formado por las subunidades $\alpha_3\beta_3ab_2$ (en azul) mediante colas de histidina a un porta objetos cubierto de níquel, mientras que al rotor $\gamma\delta c_{10}$ (en rojo) se unió un filamento de actina. El complejo F_0F_1 es demasiado pequeño para ser observado por microscopía óptica, sin embargo, el filamento de actina de 1 a 2 μm es fácilmente observable por su fluorescencia. Inserto superior, fotos de la secuencia de la rotación al adicionarse ATP al sistema, la flecha indica la dirección de la rotación en el tiempo.

Basados en estas estructuras cristalográficas, así como en las observaciones cinéticas, se realizó el experimento que demostró la rotación del complejo F_1 durante la catálisis. Hiroyuki

Noji y cols.(38) fijaron las tres subunidades β del hexámero, mediante colas de histidinas, a un portaobjetos cubierto de níquel y al eje formado por la subunidad γ se le unió un filamento de actina que es autofluorescente y de un tamaño 10 veces mayor que el complejo de la ATP sintasa (Figura 7). Este filamento permitió observar el efecto rotatorio producido por la adición de ATP al complejo F_1 (15 y 38), el cual está formado por dos componentes mecánicos, un estator ($\alpha_3\beta_3\delta$) y un rotor ($\gamma\varepsilon$).

Cinéticamente, el complejo F_1 -ATPasa exhibe ciertas particularidades; por ejemplo, a concentraciones nanomolares de sustrato, solo uno de los sitios catalíticos opera; mientras que a concentraciones micromolares de sustrato los tres sitios catalíticos operan simultáneamente. A estas dos formas de catálisis se les conoce como catálisis unisitio y multisitio, respectivamente. La catálisis multisitio exhibe dos diferentes cooperatividades cinéticas: a) cooperatividad negativa para la unión del sustrato y b) cooperatividad positiva para la catálisis. La cooperatividad negativa significa que por cada sitio catalítico que sea ocupado, los sitios restantes tendrán menor afinidad por el sustrato que el anterior. En cambio, la cooperatividad positiva significa que mientras más sitios catalíticos estén llenos, más rápido procederá la catálisis. Las observaciones estructurales de rotación dependiente de hidrólisis de ATP aportaron datos claves para entender el mecanismo de la catálisis unisitio y multisitio. Entre éstas, destacan las siguientes:

- 1.- El mecanismo de transmisión de los cambios conformacionales a las subunidades $\alpha\beta$, es debido a la rotación de la subunidad γ .
- 2.- A muy bajas concentraciones de ATP, la rotación disminuye drásticamente, lo cual implica que la catálisis multisitio depende de la rotación y que por el contrario, la unisitio no.
- 3.- Dos inhibidores específicos de la ATPasa, la efraptina y la aurovertina, no alteran la asimetría del complejo. Ambos inhiben la catálisis multisitio y no afectan la unisitio. En consecuencia, posiblemente ambos actúan previniendo la rotación.

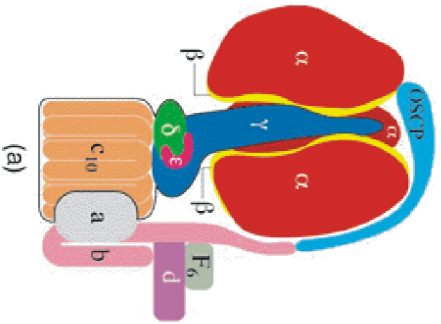
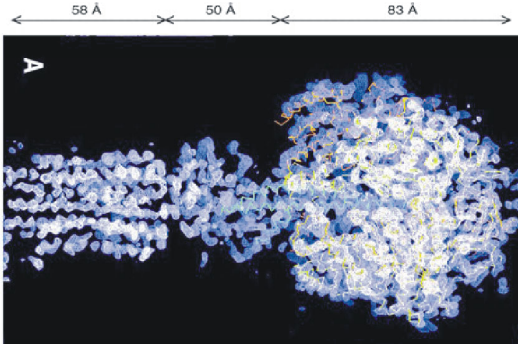
Recientemente, Peter Dimroth (16) utilizando el complejo F_0F_1 , realizó experimentos que permitieron comprobar que tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP, proceden acompañadas de la rotación del eje formado por las subunidades $\gamma\delta\varepsilon$ de F_1 y c de F_0 , y que la rotación en el complejo F_0F_1 requiere del transporte vectorial de H^+ o Na^+ .

4. REGULACIÓN.

Igual que todos los procesos metabólicos, la síntesis de ATP por la F_0F_1 ATP sintasa está sujeta a una regulación estricta. Un primer nivel general de regulación está determinado por: a) la disponibilidad de sustratos (ADP, Pi), y b) por el potencial electroquímico. Debido a que tanto el ADP como el Pi deben atravesar la membrana interna mitocondrial para alcanzar a la ATP sintasa, cada uno de ellos es transportado por su acarreador específico. En el caso del ADP, el mismo acarreador se encarga de desplazar el ATP sintetizado en la matriz mitocondrial hacia el exterior de ésta. El potencial electroquímico es proporcionado por la actividad de la cadena respiratoria en mitocondria, o la cadena fotosintética en cloroplasto. La velocidad de síntesis del ATP en la mitocondria, el cloroplasto y las bacterias, depende principalmente de éstos dos factores.

Tabla 2. Estructuras tridimensionales resueltas por cristalografía de rayos X ó RMN y su relevancia en la función del complejo.

Sub-unidades	Organismo	Notas:	Referencia
$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon C_{10}$	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Estructura más completa de la F_0F_1 ATP sintasa.	21
$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$	<i>Bos taurus</i>	Estructura más completa del segmento F_1 , este complejo está inhibido con DCCD. Tanto la forma inhibida como la no inhibida, muestran un complejo asimétrico.	12
$\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$	<i>Escherichia coli</i>	Estructura del complejo F_1 de <i>E. coli</i> , muestra las diferentes conformaciones que puede asumir la subunidad ϵ .	22
$\alpha\beta$	<i>Spinacea oleracea</i>	Subunidades $\alpha\beta$ de cloroplasto en complejo con el inhibidor tentoxina, específico de plantas.	13
$\alpha\beta\gamma$	<i>Rattus norvegicus</i>	Complejo F_1 cristalizado en una forma simétrica.	23
$\alpha\beta$	<i>Bacillus</i> sp. PS3	En ausencia de la subunidad γ , este complejo es simétrico.	11
IF_1	<i>Bos taurus</i>	Proteína inhibidora, la forma activa es un dímero.	18
δ	<i>Escherichia coli</i>	Amino terminal (de los residuos 1-134) de la subunidad bacteriana.	24
ϵ	<i>Escherichia coli</i>	Subunidad bacteriana, resuelta por cristalografía y Resonancia Magnética Nuclear.	25, 26
b	<i>Escherichia coli</i>	Cuello externo del F_0F_1 , cristalizada como monómero y modelada como dímero a partir de datos de SAX. Forma funcional en bacteria, dímero.	27
c	<i>Escherichia coli</i>	Subunidad que forma el poro de protones del complejo, resuelta por RMN. Forma funcional, oligómero.	28



importantes que aún no han sido resueltos debido a lo sorprendente de estas observaciones ya que para asegurar la localización en la membrana plasmática del complejo F_0F_1 ATP sintasa o de algunas de sus subunidades ha sido necesario tener un control estricto de la integridad de las membranas y utilizar sustratos, productos e inhibidores impermeables a la membrana plasmática.

Por otro lado, la presencia de proteínas mitocondriales fuera de ellas plantea la existencia de posibles mecanismos para su localización ectópica tales como, la codificación genética de las subunidades con un péptido señal no mitocondrial, su localización sin la exigencia de un péptido señal, la existencia de otro gene *ex profeso* para su inserción en otra membrana, o una localización al azar.⁵

La detección de nucleótidos y nucleósidos de adenina en el espacio extracelular, implica que su síntesis se lleva a cabo en la matriz mitocondrial o bien en el citoplasma. Así mismo, su salida a través de la membrana plasmática podría ocurrir por algún poro o acarreador específico desconocido, o por la fusión de vesículas cargadas de ATP, como se ha descrito en células de epitelio secretor de las glándulas salivales, o de los ductos secretores del páncreas (39), aunque aún existe la remota posibilidad de que éste sea sintetizado *in situ* en otras membranas. Por ejemplo, el ATP es liberado al plasma sanguíneo durante la agregación de las plaquetas, o en el espacio intersináptico durante la neurotransmisión. El ATP en el espacio extracelular tiene diversas funciones ya que se fija a receptores específicos asociados a proteínas "G" actuando como molécula de señalización en la comunicación intercelular o regulando canales iónicos, con consecuencias fisiológicas tan variadas como la respuesta inflamatoria, la necrosis, la apoptosis o el transporte en los epitelios. Todas estas posibilidades aún no han sido abordadas con todo detalle, debido a lo novedoso de los hallazgos.

1. LOCALIZACIONES ECTÓPICAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES.

La mayor parte de las localizaciones ectópicas de los complejos de la ATP sintasa o de sus subunidades se ha observado en células endoteliales. Estas células que recubren los vasos sanguíneos, están sometidas a cambios hemodinámicos que generan fuerzas que contraen o dilatan los capilares y que regulan muchas de sus funciones. Entre los ejemplos descritos hasta ahora, podemos mencionar los siguientes:

RECEPTOR DE ANGIOSTATINA.

Las subunidades de la F_0F_1 ATP sintasa mitocondrial se han localizado en la membrana plasmática de las células endoteliales como el sitio de fijación de la angiotatina (29), un péptido derivado del plasminógeno cuya función es inhibir la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis.

La hidrólisis de ATP por la ATPasa ectópica se inhibe por angiotatina. Posee también una actividad muy marginal de síntesis de ATP inhibible por angiotatina que sugiere la presencia de los segmentos de F_0 , pero estos aún no han sido detectados.

⁵ Nota del editor: Se sugiere revisar el trabajo de Diego González-Halphen *La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales*, en este mismo volumen.

Como no existe cadena de transporte de electrones en la superficie de las células endoteliales, se ha planteado que el bajo O_2 en que se encuentran las células endoteliales en el interior de los capilares de la microvasculatura acidifica el interior de éstas y podría ser la fuente del gradiente de H^+ para la síntesis del ATP⁶.

RECEPTOR DE CITOCINA p43.

La subunidad α de la F_1 -ATPasa de mitocondria (F_1 - α) se ha localizado en la membrana plasmática de las células endoteliales actuando como receptor de la citocina p43, que induce la acción de otras citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), y cuya acción es la de inhibir la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis (30).

VASOCONSTRICTOR.

Como una respuesta al estrés hemodinámico, las células endoteliales secretan a la luz de los capilares, la subunidad 6 (F_6) del segmento F_0 de la ATP sintasa (31), produciendo una vasoconstricción. Hasta la fecha, la subunidad 6 parece ser el único vasoconstrictor endógeno descrito que coincide con la observación de que en animales hipertensos, los niveles de F_6 en la circulación aumentan.

2. LOCALIZACIONES ECTÓPICAS EN OTRAS ESTIRPES CELULARES.

CHAPERONA.

En células animales y de plantas, la subunidad F_1 - α mitocondrial y las chaperonas mitocondriales comparten secuencias similares que plantean una relación evolutiva entre ellas. En congruencia con esta idea, se ha observado que la subunidad F_1 - β de la ATPasa de cloroplasto requiere de la subunidad F_1 - α para conservar su estructura nativa actuando ésta última como una chaperonina. Por otro lado, la chaperonina mitocondrial hsp60 se asocia a la subunidad F_1 - α recientemente sintetizada (32).

RECEPTOR DE APOLIPOPROTEÍNA A1.

En la membrana plasmática de hepatocitos se ha detectado inmunológicamente, la presencia de las subunidades F_1 - α y F_1 - β de la ATPasa mitocondrial, que actúan como receptores de la apolipoproteína A1 e inducen la endocitosis de las lipoproteínas de alta densidad más el colesterol. Se ha medido hidrólisis de ATP en la membrana del hepatocito que es inhibida por la proteína inhibidora de la ATPasa mitocondrial, lo que demuestra la localización ectópica de un complejo F_1 -ATPasa funcional. La presencia de la lipoproteína estimula la hidrólisis de ATP con la consecuente producción de ADP que se requiere para la endocitosis (33).

FUSIÓN DE MEMBRANAS.

La subunidad c de la ATPasa vacuolar (V_0 -c) se originó por una duplicación y fusión génica de la subunidad c ancestral presente en la F_0F_1 ATP sintasa mitocondrial. Por ello mantiene un 80% de identidad con las dos asas catalíticas de la subunidad c mitocondrial actual. La V_0 -C se ha identificado en la membrana del sinaptosoma de células neuronales y parece

⁶ Para la F_0F_1 ATP sintasa de eubacterias y cloroplasto ha sido mostrado que, cinéticamente, es más importante el $\Delta\Psi$ que el ΔpH para la síntesis de ATP:

tomar parte en la fusión de la membrana sinaptosomal con la membrana plasmática induciendo la liberación de la acetilcolina (34) a través de la formación de poros.

3. LOCALIZACIONES ECTÓPICAS EN CONDICIONES PATOLÓGICAS.

REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES.

La subunidad $F_1\text{-}\beta$ de la $F_1\text{-ATPasa}$ mitocondrial ha sido identificada en la membrana plasmática de las células tumorales. Su presencia induce la adhesión de los linfocitos citotóxicos, en un proceso independiente del complejo de histocompatibilidad, regulando la citotoxicidad y la lisis celular (35). Por otra parte, la subunidad $F_1\text{-}\alpha$ mitocondrial se ha localizado en la membrana plasmática de las células tumorales como receptor de la citocina p43, lo que ocasiona una inhibición de la proliferación de las células tumorales (30).

COMPONENTE DE LOS AMILOIDES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Se ha encontrado que la subunidad $F_1\text{-}\alpha$ de la $F_1\text{-ATPasa}$ mitocondrial es un componente importante en el complejo de neurofibrillas amiloides que se forman en las neuronas de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (36).⁷

FORMACIÓN DE POROS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La subunidad $F_0\text{-}c$ de la ATP sintasa localizada ectópicamente en la membrana plasmática de células excitables (como las del miocardio, las neuronas cerebrales y las de la retina), forma poros de 10 componentes de $F_0\text{-}c$ por los cuales se induce un transporte de Na^+ o Ca^{2+} . Este proceso es uno de los factores que producen la enfermedad de Batten o lipofusinosis ceroides neuronal, una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la proliferación de cuerpos de inclusión en el cerebro. Se ha atribuido al aumento de los canales, y al cambio drástico de la composición de iones que éstos producen en las células afectadas, las alteraciones observadas en los procesos de regulación y muerte que acompañan a esta enfermedad (37).

PERSPECTIVAS.

Es indudable que una vez comprobada la existencia de estas localizaciones ectópicas de la ATPasa ó la ATP sintasa ó algunas de sus subunidades, y una vez repuestos de la sorpresa, es claro que estos hallazgos abren un campo inmenso y excitante que deberá tratar de explicar desde el origen de estas enzimas y su función, hasta la posible cura de muchas enfermedades de etiología hasta ahora desconocidas. En la tabla 3 se resumen todos los *pecados* de este versátil complejo.

⁷ Nota del editor: Se recomienda revisar, de esta misma colección, el artículo de 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: del Arrenal Mena IP, Cea Bonilla A, Riveros-Rosas H, Vázquez-Contreras E. (eds). Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. pp 73-97.

Tabla 3. Localización ectópica de subunidades de la ATP sintasa mitocondrial en condiciones normales y patológicas.

Normales				
Segmento	Tipo celular	Localización	Interacción	Función
F ₁ -αβ	Células endoteliales	Membrana plasmática.	Receptor de angiotatina.	Regulación de angiogénesis.
F ₁ -α	Hepatocitos.	Membrana plasmática.	Receptor de apolipoproteína A1.	Transporte de lípidos y colesterol.
F ₁ -α	Células animales y de plantas.	Citoplasma.	Con F ₁ -β y otras proteínas.	Chaperonina.
F ₁ -α	Células endoteliales.	Membrana plasmática.	Fijación de citocina p43	Inhibición de la proliferación de células endoteliales.
F ₀ -F ₆	Células endoteliales.	Membrana plasmática y torrente sanguíneo.	Células de capilares	Vasoconstricción.
V ₀ -c	Neuronas cerebrales.	Membrana del sinaptosoma. Membrana plasmática	Fusión de membrana sinaptosomal y citoplásmica.	Liberación de acetilcolina.
Patológicas				
Segmento	Tipo celular	Localización	Interacción	Función
F ₁ -α	Neuronas cerebrales.	Citoplasma.		Neurofibrillas en la enfermedad de Alzheimer.
F ₁ -β	Células tumorales y endoteliales.	Membrana plasmática.	Diferenciación de linfocitos citotóxicos.	Inhibición de proliferación de células endoteliales y regulación de lisis de células tumorales.
F ₀ -c	Cardiocitos. Neuronas Retinocitos	Membrana plasmática.	Formación de canales de Na ⁺ y Ca ²⁺ .	Lipofucinosis ceroida ó enfermedad neurodegenerativa de Batten.

Referencias

1. Yoshida M, Muneyuki E y Hisabori T (2001). ATP synthase – A marvelous rotatory engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.* 2: 669-677.
2. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature* 191: 144-148.
3. Kanazawa, H., Kayano, T., Mabuchi, K., y Futai, M. (1981) Nucleotide sequence of the gene coding for α-, β- and γ-subunits of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 604-612.
4. Greie JC, Deckers-Hebestreit G, Altendorf K. (2000) Subunit organization of the stator part of the F₀ complex from *Escherichia coli* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr.* 32: 357-64.
5. Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* 370: 621-8.

6. Gogol EP. (1994) Electron microscopy of the F₁F₀ ATP synthase: from structure to function. *Microsc Res Tech.* 27: 294-306.
7. Karrasch S, Walker JE. (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol.* 290: 379-8.
8. Wilkens S, Capaldi RA. (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the Escherichia coli ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1365: 93-7.
9. Gay NJ, Walker JE. (1981) The atp operon: nucleotide sequence of the region encoding the alpha-subunit of Escherichia coli ATP-synthase. *Nucleic Acids Res.* 9: 2187-94.
10. Papa S, Zanotti F, Gaballo A. (2000) The Structural and Functional Connection between the Catalytic and Proton Translocating Sectors of the Mitochondrial F₁F₀-ATP Synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32: 401-411.
11. Y. Shirakihara, A.G. Leslie, J.P. Abrahams, J.E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kambara, K. Saika, Y. Kagawa, M. Yoshida (1995) The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F₁-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer. *Structure* 5: 567
12. Boyer PD. (2002) Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* 512: 29-32.
13. C. Gibbons, M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker (2000) The Structure of the Central Stalk in Bovine Mitochondrial F₁-ATPase at 2.4 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7: 1055
14. G. Groth (2002) Structure of Spinach Chloroplast F₁-ATPase Complexed with the Phytopathogenic Inhibitor Tentoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 3464.
15. Noji H, Hasler K, Junge W, Kinoshita K Jr, Yoshida M, Engelbrecht S. (1999) Rotation of Escherichia coli F₁(1)-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun.* 260: 597-599.
16. Kaim G, Prummer M, Sick B, Zumofen G, Renn A, Wild UP, Dimroth P. (2002) Coupled rotation within single F₀F₁ enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis. *FEBS Lett.* 525: 156-163.
17. Cabezon E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein, IF₁, by pH. *J Biol Chem.* 275: 25460-25464.
18. Cabezon E, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. (2001) The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J.* 20: 6990-6996.
19. Dominguez-Ramirez L, Mendoza-Hernandez G, Carabez-Trejo A, Gomez-Puyou A, Tuena de Gomez-Puyou M. (2001) Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F₁-inhibitor protein complexes. *FEBS Lett.* 507: 191-194.
20. Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J. (2001) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21: 221-230.
21. D. Stock, A.G.W. Leslie, J.E. Walker (1999) Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science* 286: 1700.
22. A.C. Hausrath, R.A. Capaldi, B.W. Matthews (2001) The Conformation of the Epsilon- and Gamma-Subunits within the Escherichia Coli F₁ ATPase. *J. Biol. Chem.* 276: 47227.
23. M.A. Bianchet, J. Hüllihen, P.L. Pedersen, L.M. Amzel (1998) The 2.8-Å structure of rat liver F₁-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11065.
24. S. Wilkens, S.D. Dunn, J. Chandler, F.W. Dahlquist, R.A. Capaldi. (1997) Solution structure of the N-terminal domain of the delta subunit of the E. coli ATP synthase. *Nat Struct Biol* 4: 198.
25. U. Uhlin, G.B. Cox, J.M. Guss (1997) Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from Escherichia coli. *Structure* 5: 1219.
26. S. Wilkens, R.A. Capaldi (1998) Solution structure of the epsilon subunit of the F₁-ATPase from Escherichia coli and interactions of this subunit with beta subunits in the complex. *J. Biol. Chem.* 273: 26645.
27. Del Rizzo PA, Bi Y, Dunn SD, Shilton BH. (2002) The "second stalk" of Escherichia coli ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain. *Biochemistry.* 41: 6875-84.
28. M.E. Girvin, V.K. Rastogi, F. Abildgaard, J.L. Markley, R.H. Fillingame (1998) Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry* 37: 8817

29. Moser,L.T., Kenan,J.D., Ashley,A.T., Roy,A.J., Goodman.D.M., Misra,K.U. Cheek,D.J., and Pizzo,V.S. (2001) Endothelial cell surface F_1F_0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. PNAS 98: 66656-66661.
30. Chang.S.Y., Park,G.S., Kim,S., and Kang,Ch.Y. (2002) Interaction of the c-terminal domain of p43 and the alpha subunit of ATP synthase. J. Biol.Chem. 277: 8388-8394.
31. Osanai,T., Tanaka,M., Kamada,T., Nakano,T., Takahashi,K., Okada,S., Sirato,K., Mogota,K., Kodama,S. and Okomura,K. (2001) Mitochondrial coupling factor 6 as a potent endogenous vasoconstrictor. J. of Clin.Invest. 108: 1023-1030.
32. Avni,A.,Avital,S., and Gromeeet-Elhanan,Z. (1991) Reactivation of the chloroplast CF_1 ATPase beta subunit by trace amounts of the CF_1 alpha subunit suggests a chaperonin like activity for CF_1 alpha. J. Biol.Chem. 266: 7317-7320.
33. Martinez,O.L., Jacquet,S., Esteve,J.P., Rolland,C., Cabezon,E., Champagne,E., Pineau,T., Georgeaud,V., Walker,J.E., Terce,F., Collet,X., Perret,B. and Barbaras R. (2003) Ectopic beta chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-1 receptor in hepatic HDL endocytosis. Nature 421: 76-79.
34. Morel,N.,Dunant,Y. and Israel,M. (2001) Neurotransmitter release through the V_0 sector of the V-ATPase. J of Neurochem. 79: 485-488
35. Das B, Mondragon,H., Sadeghian,M., Hatcher V.B. and Norin,J.A. (1994) A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity expression of the beta subunit of the H transporting ATP synthase on the surphase of tumor cell lines. J.Exp.Med. 180: 273-281.
36. Sergeant,N., Wattez,A., Galvan-Valenciaa,M., Ghestem,A., David,J.P., Lemoine,J., Sautiere,P.E., Dachary,J., Mazat,J.P., Michalsky,J.C., Velours,J., Mena-Lopez,R. and Delacourte,A. (2003) Association of ATP synthase alpha chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer disease. Neuroscience 117: 293-303.
37. McGeoch,J.E.M., and Palmer, D.N. (1999) Ion pores made of Mitochondrial ATP synthase c subunit in the neuronal plasma membrane and Batten disease. Molecular Genetics and Metabolism 66: 387-392.
38. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. Nature 386: 299-302.
39. Novak, I. (2003) ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. News Physiol Sci 18:12-17.

Semblanza de la Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou.



Estudio la carrera de médico cirujano en la Facultad de Medicina de la UNAM, y posteriormente realizó sus estudios de doctorado en Bioquímica, en la Facultad de Química de la misma Universidad. Ha laborado como profesor e investigador de tiempo completo en la Facultad de Medicina, el Instituto de Biología y actualmente, en el Instituto de Fisiología de la UNAM. Ha recibido diversos reconocimientos, entre los que destacan, el premio Universidad Nacional en investigación en ciencias naturales en 1989, y la distinción como investigador emérito por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en 1996. Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores como investigador emérito. Su principal línea de investigación versa sobre el mecanismo de síntesis de ATP por la enzima ATP sintasa. Se ha desempeñado como profesor visitante en diversas Universidades, entre las que sobresalen, la John Hopkins University en Baltimore, la Universidad de Estocolmo, el Instituto Federal Suizo de Tecnología (Eidgenössische Technische Hochschule), en Zurich; el Instituto Nencki de Biología Experimental en Varsovia, y las universidades: Estatal de Campinas y la Federal de Rio de Janeiro, en Brasil.

Ha publicado más de 130 trabajos de investigación en revistas internacionales, e impartido seminarios en más de una decena de países distribuidos en cuatro continentes.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

SISTEMAS DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS: BIOGÉNESIS FLAGELAR Y TRANSLOCACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

Bertha González-Pedrajo¹ y Georges Dreyfus²

¹Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, 266 Whitney Avenue, New Haven, CT., 06520-8114, USA

²Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-243, México, D.F., 04510

bertha.gonzalez-pedrajo@yale.edu

bpedrajo@ifc.unam.mx

Introducción

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia.

La secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en las últimas dos décadas (para revisiones recientes ver referencias 1,

ABREVIATURAS: SSTI, SSTII, SSTIII, SSTIV (sistema de secreción tipo I, II, III y IV respectivamente); MI (membrana interna); ME (membrana externa)

2 y 3). La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en las bacterias Gram-negativas, en las que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna (MI), y la membrana externa (ME) que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (3). Por su parte, en las bacterias Gram-positivas la secreción de proteínas hacia el exterior celular requiere del transporte a través de una sola membrana, por lo que algunos géneros como *Bacillus*, se utilizan industrialmente para la producción comercial de ciertas proteínas extracelulares que se logran obtener con muy altos rendimientos; sin embargo, dicho proceso ha sido poco estudiado en estos microorganismos. Recientemente, con la secuenciación de los genomas de diferentes bacterias Gram-positivas, se ha encontrado que muchos de los genes que participan en el proceso de secreción y que originalmente fueron identificados en la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, también están presentes en estos organismos. De hecho, los componentes centrales de la maquinaria principal de translocación (denominada sistema Sec) en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas muestran un alto grado de similitud, lo que sugiere que el mecanismo funcional puede ser el mismo (4).

A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas (proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, etc.), éstas son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos. Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (3). Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías **Sec-dependientes**, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las **Sec-independientes** en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (1, 2).

En el presente trabajo se describirán brevemente los diferentes sistemas de secreción en las bacterias Gram-negativas, poniendo un énfasis especial en el sistema de secreción tipo III (SSTIII) y su importancia en la patogénesis microbiana. Posteriormente se darán dos ejemplos del SSTIII; por una parte se hablará del proceso de translocación de factores de virulencia a una célula hospedera eucarionte, que se lleva a cabo por diferentes bacterias patógenas y finalmente, se describirá la biogénesis flagelar en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I (SSTI)

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas. Es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción protéica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular (1). Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, que sin embargo, no es procesada. Esta señal es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza de dicha señal y el mecanismo mediante el que es reconocida (2,3).

El SSTI está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés *ATP binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión) (2, 5) (Fig. 1A). Los sistemas de transporte ABC pertenecen a una superfamilia de transportadores que son también utilizados por bacterias Gram-positivas y que existen en eucariontes, desde la levadura hasta el humano, siendo los responsables del transporte de un gran número de iones y moléculas pequeñas (6).

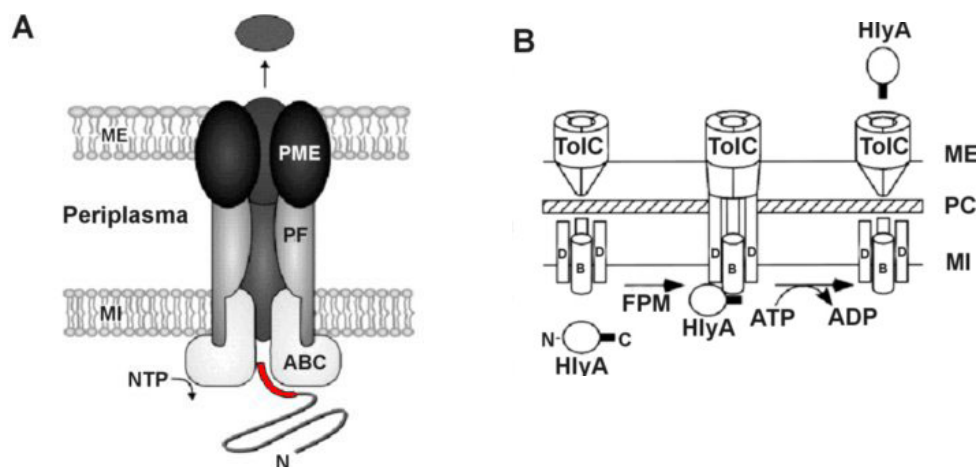


Figura 1. Componentes del SSTI. A) El sustrato se reconoce a través de una secuencia señal en el extremo carboxilo terminal (marcado en rojo). En este modelo de secreción, la proteína periplásmica de fusión PF interactúa con el transportador ABC en la MI y con la proteína PME que forma un canal en la ME (modificada de 2). B) Secreción de hemolisina HlyA en *E. coli*. HlyA interacciona con el transportador ABC HlyB (representado por la letra B) y la proteína de fusión trimérica HlyD (representada por la letra D), en un proceso dependiente de la fuerza motriz (FPM). La translocación de HlyA requiere de la interacción entre HlyD y el transportador trimérico TolC, así como de la hidrólisis de ATP (modificada de 3).

El prototipo para ejemplificar este sistema es la secreción de la toxina α -hemolisina (HlyA) en *E. coli*. Dicha toxina se produce principalmente en cepas de *E. coli* que causan infecciones del tracto urinario (*E. coli* uropatógena), y es un factor de virulencia importante debido a su actividad citolítica y citotóxica. La secreción de la hemolisina HlyA requiere al transportador ABC HlyB, a la proteína periplásmica de fusión HlyD y a la proteína TolC que forma un poro en la ME (7) (Fig. 1B). La energía de hidrólisis del ATP es utilizada para la secreción del sustrato. El modelo de translocación a través de este sistema postula que en una etapa inicial existe una interacción entre las proteínas HlyB y HlyD. Posteriormente se une el sustrato a dicho complejo, en particular a la proteína HlyB, lo cual ocurre a través del reconocimiento específico de la señal de secreción en el carboxilo terminal. Cuando se forma el complejo HlyA-HlyB-HlyD, se produce una conexión con el poro de salida TolC en la ME, formándose un canal que atraviesa el periplasma (7, 8) (Fig. 1B). Recientemente se obtuvo la estructura cristalográfica de la proteína multifuncional TolC con la que se pudo sugerir un modelo en cuanto a su papel en este proceso de secreción (9). TolC es una proteína trimérica que forma

un canal con un diámetro interno de 35 D en la ME, y que presenta una arquitectura única de un barril β de 12 hebras. Tres protómeros de TolC se ensamblan formando un conducto continuo de 140 D de largo que atraviesa a la ME y se extiende al espacio periplásmico. A su vez, se forma un trímero de HlyD que pudiera generar un cilindro con un diámetro muy similar al trímero de TolC. El túnel que forma TolC está completamente abierto en la parte extracelular de la ME, pero cerrado en el periplasma, en donde existen una serie de α -hélices enrolladas que pueden utilizarse para abrir el canal, y se propone que esto puede ocurrir a través de un mecanismo alostérico regulado por interacciones proteína-proteína con los componentes de la MI, en particular con HlyD. Este puente que se forma es transitorio y se colapsa al concluir la secreción (5,7,8).

En conclusión, las características particulares del canal TolC, como lo es su excepcional longitud, hacen que se pueda formar un conducto de secreción directo hacia el exterior celular. Las dimensiones del canal sugieren que la hemolisina se debe transportar de forma parcialmente plegada. Las reacciones catalizadas por esta maquinaria están dirigidas en una etapa temprana por el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática de *E. coli*, posiblemente para la formación del complejo, y posteriormente por la hidrólisis de ATP para la secreción (5).

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II (SSTII)

El SSTII es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, como la toxina del cólera. Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas. Primero, la maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente. Dicho péptido es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos. En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o secretón (2,3). A continuación se describen ambas etapas.

1) Transporte a través de la MI.

En *E. coli*, el poro de translocación de la vía Sec está compuesto por tres proteínas denominadas SecY, E y G, que pueden aceptar sustratos de dos diferentes fuentes. Por un lado, la proteína precursora (con el péptido señal), se mantiene en un estado de secreción competente o desplegado gracias a la unión con la proteína chaperona SecB, quien la dirige a la subunidad periférica SecA del complejo de translocación heterotrimérico SecYEG, en la membrana citoplásmica (3, 10). La proteína SecA es una ATPasa cuya actividad de hidrólisis provee de la energía necesaria para la exportación. Por otro lado, un segundo mecanismo involucra una translocación co-traducciona, en donde una proteína nascente con su secuencia señal es reconocida por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y su receptor. Estas rutas convergen en el poro de translocación SecYEG que se encuentra asociado con SecA. La selección de la ruta se determina inmediatamente después de que la secuencia señal nascente sale del ribosoma (11). Una vez que los polipéptidos se translocan, actúa una peptidasa que procesa el péptido líder, para finalmente liberar a la proteína madura en el espacio periplásmico.

En la ruta regulada por la chaperona SecB (Fig. 2), ésta reconoce al dominio naciente de la preproteína. El complejo binario se dirige a SecYEG unido a SecA (paso 2a y 3a, Fig. 2), o bien, primero se asocia con SecA en el citosol a través de una interacción de baja afinidad, hasta que los sitios de translocación en la membrana estén disponibles (paso 2b y 3b, Fig. 2). Para interactuar con la translocasa se requiere de la unión de alta afinidad entre SecB y SecA, lo cual es seguido de la unión de la secuencia señal a SecA (paso 4, Fig. 2), lo que a su vez estabiliza la interacción SecA-SecB. Por último, se transfiere la preproteína de SecB a SecA, se libera SecB de la membrana y se inicia la translocación (paso 4 y 5, Fig. 2), proceso que se encuentra acoplado a la unión de ATP por SecA (11) (Fig. 2). La energía de la hidrólisis de ATP se utiliza para la transferencia de la preproteína de SecA hacia SecYEG. Una vez que esto sucede, la translocación puede ser dirigida por la fuerza protón motriz.

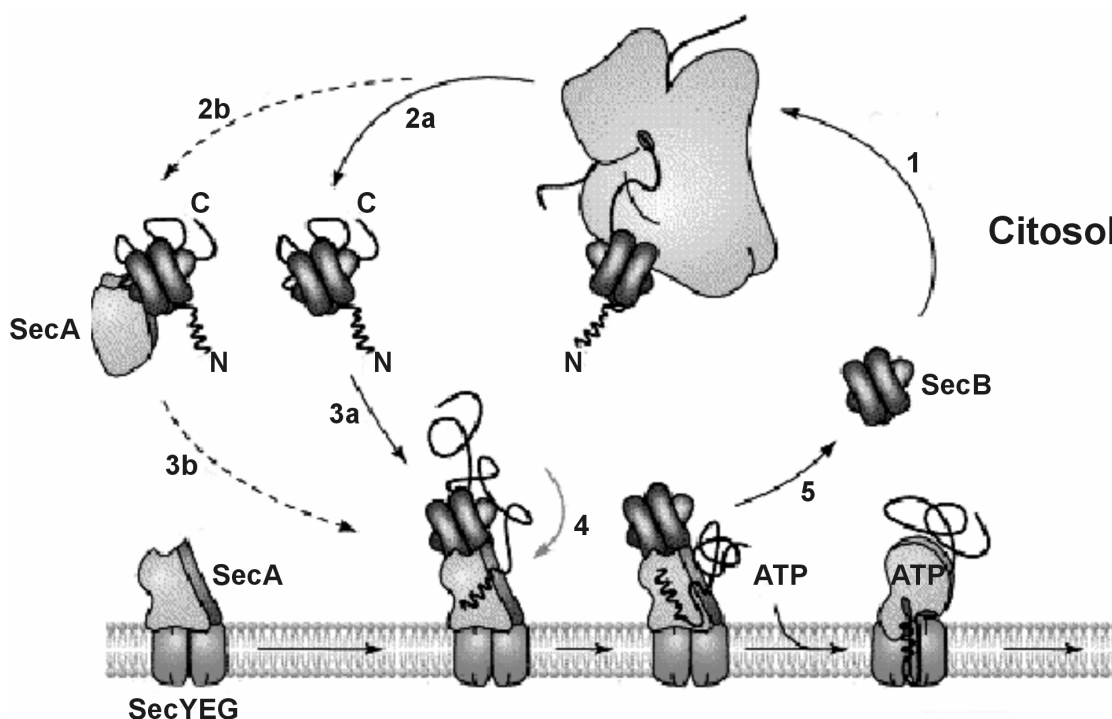


Figura 2. Modelo del mecanismo de translocación a través de la MI por el sistema Sec. En el paso 1) la proteína chaperona SecB se une a una preproteína naciente en el citosol, estabilizando su conformación desplegada (paso 2a). El complejo binario SecB-preproteína es dirigido hacia la translocasa SecYEG unida a SecA (paso 3a), o bien, primero se asocia con SecA (paso 2b) y después se dirige a la MI a reemplazar a SecA unida a SecYEG (paso 3b). En el paso 4 se une la secuencia señal a SecA, lo cual estabiliza la interacción SecB-SecA y la preproteína se transfiere a SecA. La unión de ATP por SecA promueve el inicio de la translocación y la liberación de SecB del complejo ternario (paso 5) (modificada de 10).

2) Transporte a través de la ME.

El SSTII para el transporte a través de la ME está constituido por entre 12 y 16 proteínas accesorias, y la nomenclatura de los componentes incluye las siglas GSP del inglés (*general secretion protein*) (Fig. 3) (2,3). La secreción de la lipoproteína pululanasa (enzima amilolítica

que se secreta y permanece en la superficie celular), denominada PulA (o GspA considerando la nomenclatura general), por *Klebsiella oxytoca*; así como la secreción de la toxina del cólera por *Vibrio cholerae*, representan los ejemplos prototipo de la vía tipo II (12). Ya en el periplasma, las proteínas sufren modificaciones, tales como la formación de puentes disulfuro o la oligomerización, y adquieren su conformación nativa. El SSTII incluye dos componentes en la ME: la proteína GspD y la GspS (representadas por las letras D y S, Fig. 3). La proteína GspD, que pertenece a la familia de las secretinas, se inserta en la ME y por medio de su oligomerización, se forma un anillo dodecamérico con un diámetro interno de entre 76 y 95 D, suficiente para transportar polipéptidos plegados. La secretina (GspD) está conservada entre los diferentes sistemas tipo II, también es un componente del SSTIII y del proceso de polimerización del pili tipo IV, que es una estructura filamentosa de adhesión presente en muchas bacterias patógenas y que también participa en la movilidad independiente de flagelo que se da sobre superficies sólidas. Por su parte, la proteína GspS es una lipoproteína de la ME que actúa como chaperona de GspD para su correcto plegamiento y actividad (3). Sin embargo, la mayoría de las proteínas de este sistema (GspBCFGHIJKLMNO) se localizan en la MI (o en el periplasma asociadas a la MI), mientras que la ATPasa GspE, que energiza el proceso, se localiza en la región citosólica e interactúa con el componente GspL de la MI (ver Fig. 3) (13). La representación esquemática de esta vía se ejemplifica con la secreción de la toxina del cólera en *Vibrio cholerae* (Fig. 3).

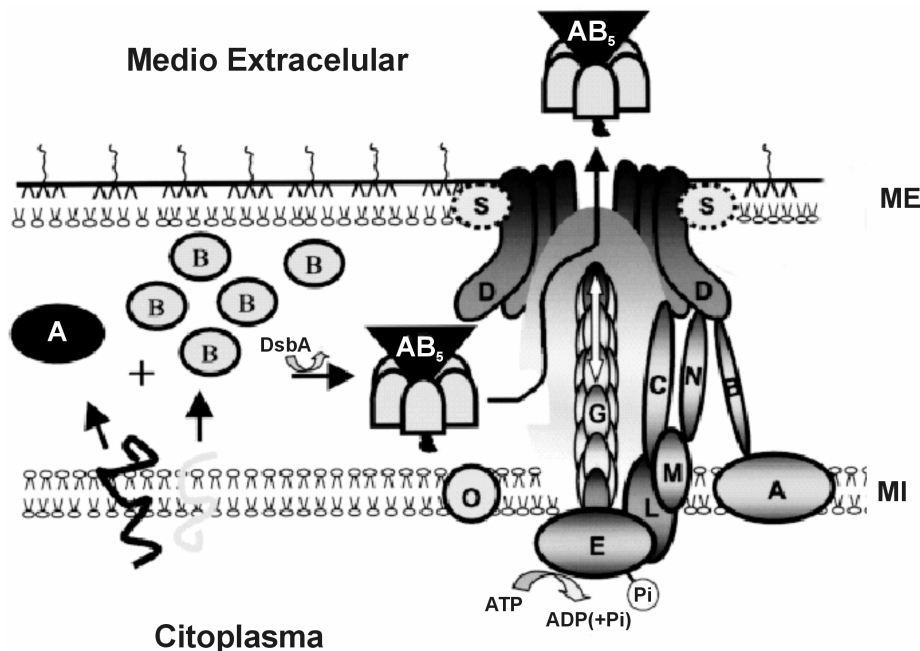


Figura 3. Modelo de secreción de la toxina del cólera por el SSTII. En la primera etapa, las subunidades A y B de la toxina se translocan a través de la MI como precursores monoméricos utilizando la vía Sec. Posteriormente, en una segunda etapa, éstas se pliegan y ensamblan en el periplasma en un complejo AB₅. El complejo es dirigido al poro de la ME para su translocación. Las proteínas GspE, L y M regulan la secreción extracelular comunicando la información de fosforilación o hidrólisis de ATP entre la MI y el poro en la ME, posiblemente a través de la proteína GspC. Las proteínas GspG, H, I, J y K son procesadas por la proteína GspO y forman una estructura en forma de pilus cuyo componente mayoritario es la proteína GspG. Se postula que el pilus puede actuar empujando a la toxina a través del poro, por repetidas extensiones y retracciones como lo representa la flecha blanca (modificada de 13).

Cinco de los componentes del SSTII (GspGHIJK, representados por la letra G en la Fig. 3) son similares a las subunidades estructurales del pili tipo IV llamadas pilina, por lo que se han denominado pseudopilinas (3, 13); y se exportan con una secuencia señal de prepilina que es procesada por GspO. Se ha propuesto que estas proteínas se ensamblan en una estructura tipo pili que atraviesa el periplasma y que pudiera ayudar de forma directa o indirecta en el proceso de secreción. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína GspG, genera el ensamblaje de largos pseudopilis (14). Debido a esto, se propuso que un pilus en el SSTII podría actuar como un pistón que empujara a las proteínas a secretarse a través del poro en la ME (ver Fig. 3); sin embargo, aún no existe evidencia concluyente sobre la formación de dicha estructura. En este modelo, la ATPasa GspE puede proveer la energía necesaria para la translocación o para el ensamblaje del pseudopili a través de ciclos repetitivos de unión e hidrólisis de ATP. Estas observaciones sugieren que los dos sistemas (SSTII y biogénesis del pili tipo IV) están evolutivamente relacionados (13).

Existen todavía muchas preguntas a contestar en cuanto a la función específica de los componentes de este sistema. Una de las características únicas de esta vía es su capacidad de transportar proteínas plegadas, lo que nos lleva a una de las más grandes incógnitas: ¿Cuál es la señal que permite a la maquinaria tipo II reconocer a los diferentes sustratos? La comparación de la secuencia primaria de las proteínas secretadas no muestra similitudes, además, algunas de las proteínas se transportan de forma monomérica (como la elastasa) y otras de forma oligomérica (como la toxina de cólera). Por otro lado, el análisis de la estructura tridimensional de diferentes proteínas muestra como única similitud un alto contenido de hojas β , sin embargo, la estructura o dominio consenso aún no se ha identificado (3, 13).

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV

El SSTIV es una vía recientemente identificada, homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de DNA (2). Este sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas. La exportación de la toxina pertussis (agente causante de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos como *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* y *Brucella suis*, entre otros (15).

El sistema modelo o prototipo para ejemplificar esta maquinaria de secreción es el del transporte de DNA oncogénico o T-DNA (DNA tumoral) y proteínas efectoras (es decir, nucleoproteínas), hacia el núcleo de células de planta, por el fitopatógeno *A. tumefaciens*. Este sistema consiste de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4 (Fig. 4A), que transfieren el complejo proteína-DNA en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucarionte a través del pilus-T. La noción general aceptada para esta vía es que no requiere de intermediarios periplásmicos, por lo que la secreción es Sec-independiente. Sin embargo, en este sentido, la secreción de la toxina pertussis es considerada una excepción ya que las subunidades se exportan al periplasma a través de la maquinaria Sec y su asociación en dicho compartimento celular se requiere para una secreción eficiente (16, 17). Además de esta excepción, se han reportado otras observaciones que no favorecen dicha noción general. Un ejemplo de dichas observaciones es el de la localización en el espacio periplásmico de algunos factores de virulencia en ausencia de la planta hospedera y de los componentes VirB, lo que sugiere la posibilidad de que exista una ruta periplásmica (18).

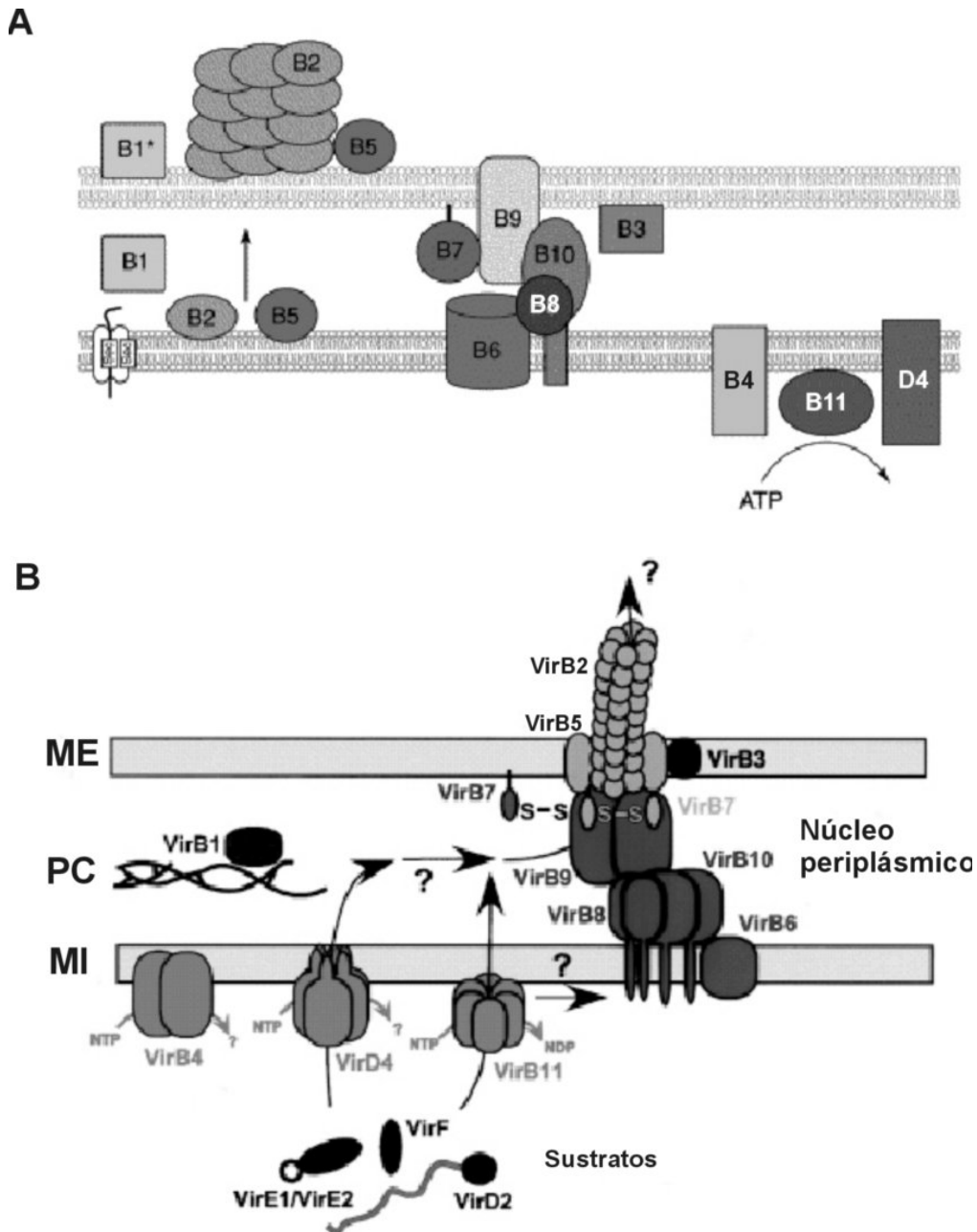


Figura 4. Componentes del SSTIV. A) Localización de los componentes del sistema VirB de transferencia de T-DNA en *A. tumefaciens*. Se muestran 3 grupos funcionales: las proteínas de localización extracelular que forman el pilus u otras estructuras adhesivas (B1, B2 y B5), los componentes del núcleo periplásmico que forman el canal de translocación (B3, B6, B7, B8, B9 y B10) y las ATPasas asociadas a la MI (B4, B11 y D4) (modificada de 15). B) Modelo de secreción a través del SSTIV. Se postula que se lleva a cabo una asociación entre los componentes generadores de energía en la MI y la maquinaria de secreción (núcleo periplásmico). Las estructuras en la superficie celular pueden iniciar el contacto con la célula hospedera, sin embargo, la vía de translocación del sustrato es aún desconocida. La proteína VirB1 se encarga de lisar la capa de mureína facilitando así el ensamblaje del complejo que forma el núcleo periplásmico (modificada de 16).

Dentro del sistema VirB, existen componentes asociados a la MI (VirB4, VirB11 y VirD4) que son ATPasas que pudieran formar canales para la translocación del sustrato o proveer energía para el ensamblaje de la maquinaria (Fig. 4A). La estructura cristalográfica de una versión truncada de la proteína TrwB del sistema de transferencia de plásmidos, que es homóloga a VirD4, indica que es un hexámero con un canal central que puede conectar el citoplasma con el periplasma (19). De esta forma, los cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis del ATP podrían transducir la información del citoplasma hacia las subunidades extracitoplásmicas (17). Otros componentes como VirB8, VirB9 y VirB10 forman un núcleo periplásmico que puede también constituir un canal de translocación. VirB6 atraviesa la MI por lo que se sugiere que este componente forma, en asociación con las ATPasas, el canal citoplásmico. Por otro lado están los componentes del pilus VirB2 (que es la principal proteína estructural), VirB5 y VirB7 que están asociados a dicha estructura (Fig. 4B). Por su parte, la proteína VirB1 tiene un motivo que está presente en las transglicosilasas líticas, por lo que se propone que puede lisar la capa de peptidoglicano durante el ensamblaje del transportador (15). Los estudios realizados en los últimos años en este sistema se han enfocado a la identificación de las interacciones entre los componentes descritos, con la finalidad de poder definir los pasos en los que ocurre el proceso. La señal de reconocimiento no ha sido identificada y la base molecular del reconocimiento dual entre proteínas y complejos nucleoprotéicos en el SSTIV, aún no se conoce.

AUTOTRANSPORTADORES

A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Los autotransportadores representan una vía Sec-dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la MI; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la ME (1,2).

El prototipo de esta familia de transportadores es la secreción de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae*. Esta bacteria infecta al humano y puede permanecer por periodos prolongados en los tejidos. Para escapar de la respuesta inmune del hospedero, en particular de los anticuerpos IgA de las mucosas oral e urinaria, *N. gonorrhoeae* secreta la proteasa IgA que proteoliza dichos anticuerpos (3). El mecanismo fundamental de translocación a través de este sistema fue descrito por primera vez por Pohlner y col (20). La proteína a secretarse presenta tres diferentes regiones funcionales: una secuencia señal en el amino terminal para atravesar la MI, seguida de un dominio " también llamado pasajero, que dará origen a la proteína expuesta a la superficie celular y el dominio \$ en el carboxilo terminal, que permite la secreción a través de la ME formando una estructura de barril-\$ con 10-18 hebras antiparalelas (21) (Fig. 5).

Después de atravesar la MI, la secuencia señal se procesa dando lugar a un intermediario periplásmico, el cual se protege de degradación probablemente a través de chaperonas. Posteriormente, el dominio \$ se inserta espontáneamente en la ME en una configuración de barril-\$, en un plegamiento similar al que adquieren otras proteínas de la ME, como TolC. La primera y la última de las hebras \$ anfipáticas forman puentes de hidrógeno que cierran la conformación de anillo, a través del cual se transporta el dominio pasajero (Fig. 5). Para este proceso no se requiere un acoplador energético (21, 22). Una vez que la proteína se localiza en la superficie celular, el destino del dominio pasajero es diferente en los distintos

organismos, puede permanecer asociado o ser liberado por proteólisis. En el caso de la proteasa IgA, el dominio amino terminal expuesto a la superficie bacteriana se libera al medio extracelular a través de un evento autoproteolítico.

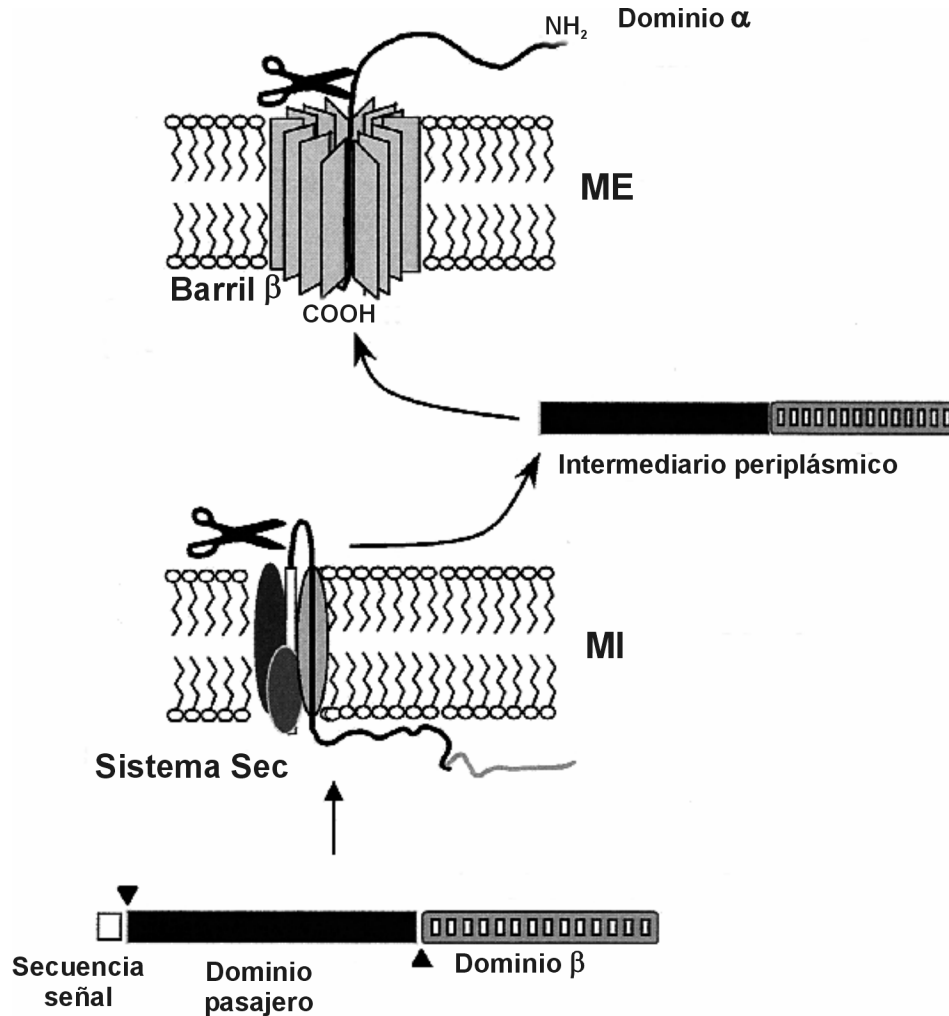


Figura 5. Mecanismo de secreción de un autotransportador. La proteína a secretarse tiene tres dominios: la secuencia señal, el dominio pasajero y el dominio β en el carboxilo terminal. El péptido líder dirige la secreción vía el sistema Sec y se procesa en la cara periplásmica de la MI. El dominio β del intermediario periplásmico adquiere la conformación de barril-β y se inserta en la ME para formar el poro. Por último se transloca el dominio pasajero a la superficie celular en donde puede permanecer unido o bien procesarse (modificada de 22).

El modelo descrito predice que el barril-β de un dominio carboxilo terminal monomérico contiene un canal hidrofílico a través del que el amino terminal desplegado puede translocarse. Sin embargo, en un trabajo reciente se demuestra que el carboxilo terminal se ensambla como un complejo oligomérico con un poro central hidrofílico de 20 D de diámetro, que es el que se utiliza para la secreción de la secuencia del amino terminal (23).

Cabe mencionar que los autotransportadores han sido considerados en algunos reportes como un SSTIV, sin embargo, recientemente se publicó una opinión consenso para evitar confusión en cuanto a la terminología de la clasificación. Se concluyó que el nombre de autotransportador es el que mejor describe al sistema, pero también puede ser considerado como un sistema de secreción tipo V.

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (SSTIII)

El SSTIII constituye un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en los últimos años. Es una vía Sec-independiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular, que desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas (24).

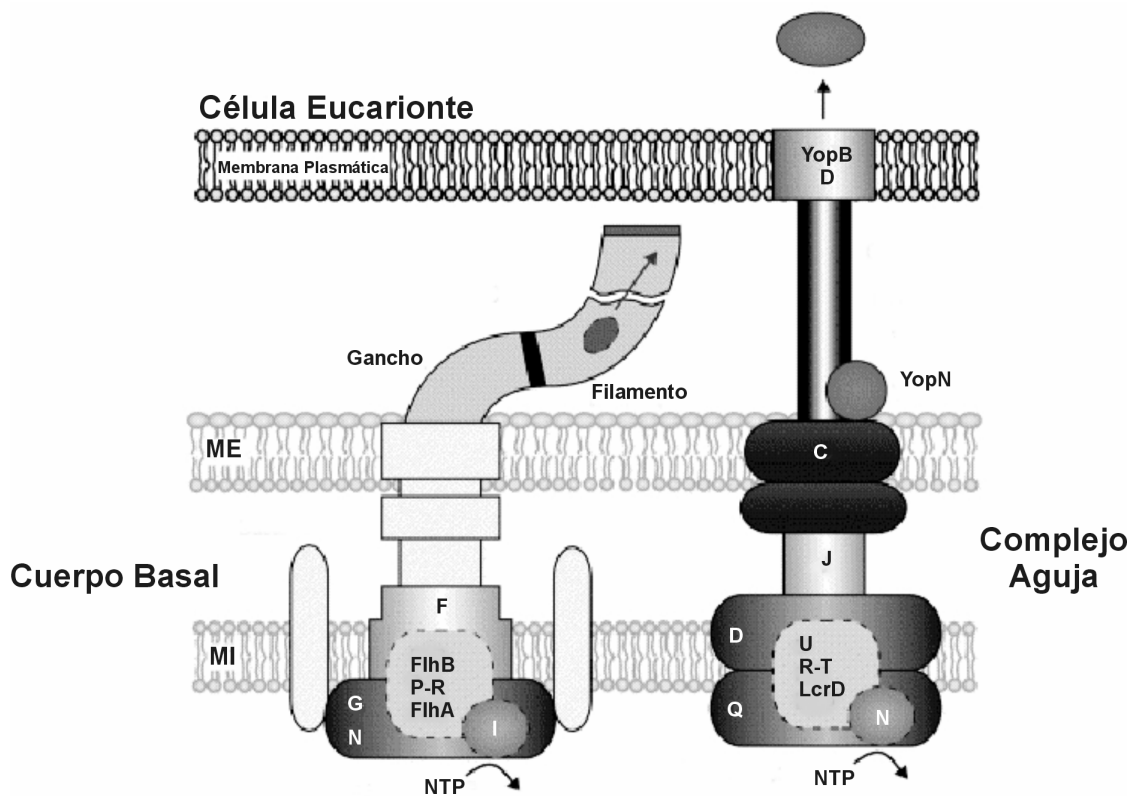
El SSTIII ha sido identificado en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. Mediante este sistema los factores de virulencia se pueden translocar hasta el citosol de la célula eucarionte (para revisiones recientes ver 25, 26, 27). La maquinaria está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo las proteínas secretadas difieren completamente, por lo que el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades (24). Además de su papel en la patogénesis, el SSTIII se requiere para la biogénesis flagelar (28), y es también esencial para el establecimiento de la relación simbiótica entre *Rhizobium* y plantas leguminosas (29). A continuación se describirá la translocación de factores de virulencia y la biogénesis flagelar, como ejemplos del SSTIII.

TRANSLOCACION DE FACTORES DE VIRULENCIA

Tanto el flagelo, como el translocón de secreción de moléculas efectoras, son sistemas complejos que requieren de más de 20 proteínas que se ensamblan en largas estructuras macromoleculares que atraviesan ambas membranas bacterianas, y en los sistemas de virulencia, también la membrana plasmática eucarionte. Es a través de dichos complejos macromoleculares que ocurre el proceso de secreción (Fig. 6). El ejemplo prototipo del SSTIII de translocación de factores de virulencia está representado por la secreción de proteínas efectoras denominadas Yops, en la familia de patógenos *Yersinia*.

La nomenclatura utilizada para los componentes de la maquinaria de secreción incluye las siglas ysc (del inglés *Yersinia secretion*). De entre estas, existen 11 proteínas que están conservadas en los diferentes SSTIII (YscC, YscD, YscJ, YscL, YscN, YscQ, YscR, YscS, YscT, YscU y YscV), de las cuales 10 comparten a su vez similitud con el aparato de exportación flagelar (27). La mayoría de las proteínas se localizan en la MI y están relacionadas con los componentes del cuerpo basal del flagelo (Fig. 6); sólo los miembros de las familias YscN, YscQ y YscL son citosólicos o periféricos a la membrana (2, 24). YscN pertenece a una familia de ATPasas altamente conservadas en los diferentes SSTIII, que tienen los motivos consenso de unión a ATP (cajas de Walker A y B) y que están relacionadas con las subunidades catalíticas de las ATPasas bacterianas F_0F_1 . Dicha enzima desempeña un papel muy importante en el proceso

de secreción, de forma que mutaciones puntuales en los residuos catalíticos del homólogo de YscN en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium InvC, generan bacterias incapaces de penetrar células epiteliales en cultivo (30). En cuanto a las proteínas integrales de la MI, la topología de YscR, YscU y YscV predice que poseen grandes dominios citoplásmicos que pueden interactuar con los componentes citosólicos o periféricos descritos anteriormente. YscJ es una lipoproteína que tiene una secuencia señal para el sistema Sec, lo que implica que a pesar de que el SSTIII es una vía de translocación Sec-independiente, la morfogénesis del complejo macromolecular involucra etapas que requieren al sistema Sec (24); el mismo caso se presenta en el ensamblaje flagelar como se verá más adelante. Por su parte, la proteína YscC pertenece a la superfamilia de secretinas de la que se habló en el SSTII (GspD), y se encarga de formar un canal en la ME.



Biogénesis Flagelar Translocación de Factores de Virulencia

Figura 6. Modelos de secreción tipo III ejemplificados por la biogénesis flagelar (lado izquierdo) y la translocación de factores de virulencia en *Yersinia* (lado derecho). Se muestran los componentes del cuerpo basal del flagelo bacteriano que son homólogos a los del complejo aguja del sistema de translocación de factores de virulencia. Ambos sistemas presentan una serie de anillos en la MI y ME, conectados a través de un canal que cruza el periplasma. Las proteínas se translocan desde el citoplasma hasta el exterior celular por el interior de dichas estructuras. Para la secreción se requiere la energía de la hidrólisis del ATP (modificada de 2).

Los complejos secretores de los factores de virulencia han sido aislados y observados por microscopía electrónica en *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, y recientemente en *E.coli* enteropatógena (31,32,33). La similitud entre los componentes estructurales de estas maquinarias con el cuerpo basal del flagelo es notable, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo común de reconocimiento de sustrato y de exportación (Fig. 7). Se ha propuesto que el aparato de exportación flagelar es el precursor evolutivo del sistema de secreción de virulencia (24, 28).

COMPLEJO DE CUERPO BASAL

COMPLEJO AGUJA

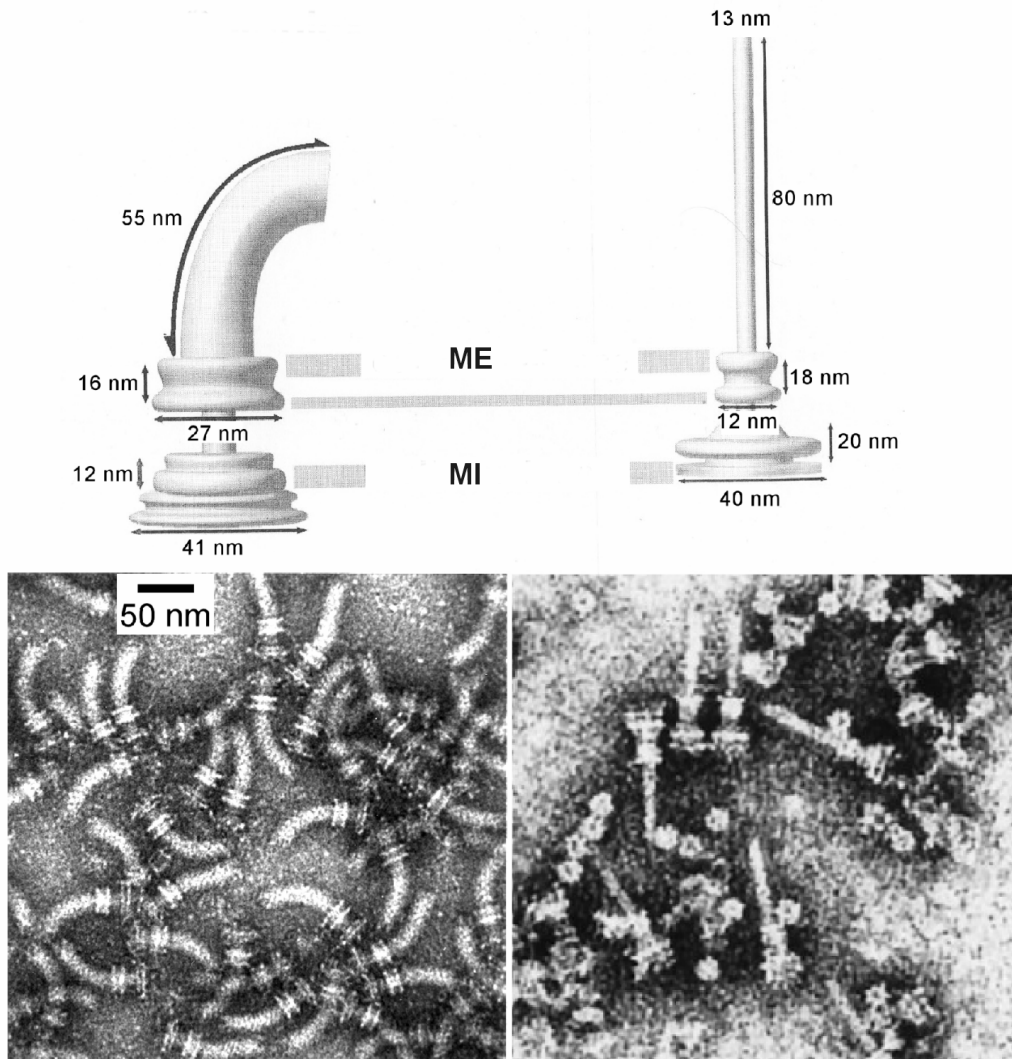


Figura 7. Comparación entre las estructuras macromoleculares que forman el cuerpo basal del flagelo y el complejo aguja del translocón de factores de virulencia. En la parte inferior se muestran fotografías al microscopio electrónico de los complejos aislados, en las que se pueden observar las estructuras anulares del cuerpo basal y el complejo aguja (43).

BIOGÉNESIS FLAGELAR

El tipo más común de movilidad bacteriana se da a través del flagelo, un largo filamento helicoidal o propela, que es impulsado por un motor rotatorio embebido en la superficie celular (34). El flagelo procarionte se puede dividir en tres estructuras principales, el filamento que es el componente propulsor, el gancho que es una estructura de acoplamiento entre el filamento y la superficie celular, y el cuerpo basal que es un complejo multiprotéico que contiene el motor flagelar (ver Figuras 6 y 7).

En el proceso de morfogénesis, la gran mayoría de las proteínas estructurales a ser exportadas carecen de secuencia señal, por lo que se secretan a través de un canal central existente en la estructura misma. El aparato de exportación flagelar en *S. enterica* es el encargado de reconocer las proteínas a ser exportadas. Está constituido por 6 proteínas membranales (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR) y varios componentes solubles (FliI, FliH, la chaperona general FliJ y las chaperonas específicas FlgN, FlgS y FlgT) (35). La proteína FliI es la ATPasa que proporciona la energía para la exportación de los sustratos (36, 37) y funciona en conjunto con la proteína FliH, la cual regula negativamente la actividad hidrolítica de FliI, por lo que se ha propuesto que FliH mantiene disminuída dicha actividad hasta que ésta pueda ser acoplada a la translocación del sustrato (38,39). En el SSTIII de *Y. pestis* se forma un complejo homólogo al FliH-FliI, constituido por las proteínas YscL-YscN, lo que sugiere que el mecanismo regulatorio de la actividad de ATPasa está conservado en ambos sistemas (40). La existencia de interacciones entre los componentes solubles y los de la MI del aparato de exportación, se ha demostrado utilizando diversas metodologías (41).

La vía de síntesis del flagelo se logró elucidar con la generación de una gran cantidad de bacterias mutantes y el aislamiento de las estructuras intermedias que éstas forman (42). El ensamblaje procede en una secuencia lineal del extremo proximal al distal y se lleva a cabo por adición de monómeros y no de estructuras preformadas (Fig. 8) (43).

El anillo MS es la estructura estable más temprana, se inserta en la MI y forma el núcleo sobre el que se acoplarán todos los demás componentes. Posteriormente se forma el anillo C que se localiza en el citoplasma y está formado por las proteínas FliG, FliM y FliN, que participan en el cambio de dirección de la rotación flagelar y generación de la torca (o fuerza de rotación). Es en esta etapa temprana en la que se incorpora el aparato de exportación responsable de secretar a los componentes que no presentan un péptido señal y que por lo tanto, se exportan a través de la vía específica tipo III. De esta forma, las subunidades del eje, del gancho y la flagelina (que forma el filamento), viajan por el interior de la estructura, a través de un canal central de 30 D. Las subunidades que forman los anillos P y L son las únicas proteínas del sistema que presentan secuencia señal y utilizan la vía Sec (43). A continuación se exportan las subunidades del gancho, el cual se alarga hasta una longitud determinada. Este es un punto de regulación en el proceso: cuando el gancho adquiere su tamaño final, se exporta el factor antisigma FlgM, liberando de esta forma en el citosol al factor sigma FliA, que es el responsable de la transcripción de los genes que formarán las estructuras tardías, como el de la flagelina (44). De esta forma, la expresión génica se encuentra estrechamente acoplada con el proceso de morfogénesis flagelar. Por último, se exportan las llamadas proteínas tardías HAP1 y HAP3 (que forman una zona de amortiguamiento entre el gancho y el filamento), la proteína HAP2 (que acompaña la formación del filamento ayudando a que las subunidades se ensamblen correctamente), y la flagelina.

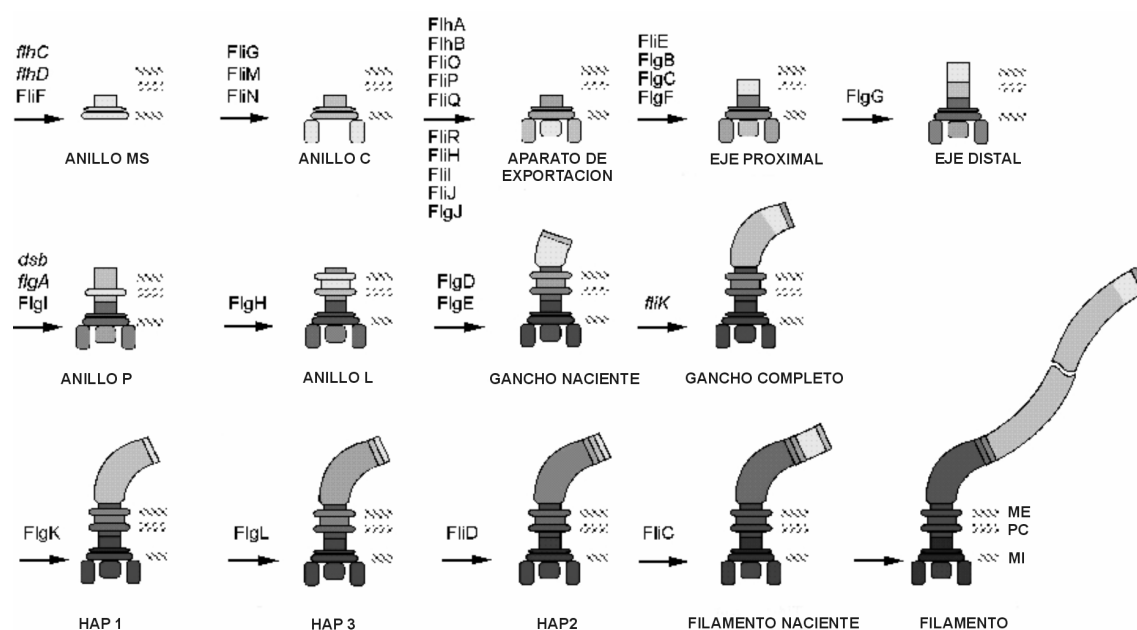


Figura 8. Vía morfogenética de ensamblaje flagelar. El proceso inicia con la formación del anillo MS en la MI y concluye con la adición de subunidades de flagelina (*FliC*) para formar el filamento. Se señalan las proteínas que se requieren en cada una de las diferentes etapas (43).

El conocimiento que se ha generado con el estudio del aparato de exportación y la biosíntesis del flagelo, ha sido de gran importancia para el entendimiento de la biogénesis, regulación y mecanismos de secreción de los sistemas de virulencia.

LA SEÑAL DE SECRECIÓN PARA EL SSTIII

Los sustratos a translocarse por el SSTIII carecen de una señal de secreción definida, sin embargo, para algunas proteínas tanto del sistema flagelar, como del de virulencia, se ha demostrado que la señal se localiza en el dominio amino terminal (24). A pesar de esto, no ha sido posible identificar secuencias conservadas en esta región y algunos datos sugieren que es más bien una propiedad fisicoquímica, como la anfipaticidad, la que es crítica para la secreción (45). La hipótesis de la señal de secreción en el amino terminal ha sido cuestionada y se ha propuesto que se localiza en la región 5' codificante del RNA mensajero (46). Sin embargo, no existe evidencia directa de interacción entre el RNA mensajero y los componentes del sistema de secreción.

Por otro lado, en todos los SSTIII estudiados existen proteínas chaperonas que comparten características comunes como el tamaño pequeño, pl ácido y una alta predicción de estructura "hélice". La exportación de algunos sustratos es facilitada por dichas chaperonas, las que se propone mantienen a las proteínas en una conformación adecuada para la secreción, previniendo además la agregación prematura en el citosol (47, 48). Sin embargo, el papel directo

de las chaperonas como posible señal de reconocimiento en la secreción, así como su papel en la organización de la jerarquía de translocación de los efectores, aún no ha sido demostrado.

COMENTARIOS FINALES

Como se describió a lo largo del trabajo, un sistema de secreción de proteínas es mucho de lo que una bacteria necesita para ser un "buen patógeno". Cada una de las estrategias de secreción tiene sus propias ventajas y limitaciones respecto al número, tamaño, estado de plegamiento y destino de los sustratos a secretarse. Sin embargo, todos los sistemas descritos son muy eficientes en cuanto a la especificidad en la selección de los sustratos, el ensamblaje de la maquinaria de secreción y el movimiento coordinado de macromoléculas a través de hasta tres bicapas lipídicas.

Por otro lado, el hecho de que algunas vías de secreción estén relacionadas evolutiva y funcionalmente con los sistemas de ensamblaje de estructuras macromoleculares de la superficie celular, como el pili tipo IV o el flagelo, ha contribuido significativamente al entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la secreción. Sin embargo, son muchas las preguntas que quedan aún por contestar. A largo plazo se espera que con el estudio de los mecanismos en los que se basa la secreción, se puedan desarrollar novedosos agentes terapéuticos para la prevención de diversas enfermedades infecciosas.

Finalmente, uno no puede más que maravillarse de los diferentes mecanismos mediante los cuales las bacterias interactúan con su entorno.

Agradecimientos:

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Juan Carlos Salazar por la lectura crítica del manuscrito y al Dr. Robert M. Macnab por las múltiples discusiones y las facilidades otorgadas para la elaboración del presente trabajo.

Referencias

1. Koster M, Bitter W, y Tommassen J (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290:325-331.
2. Thanassi DG, y Hultgren SJ (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 12:420-430.
3. Lee VT, y Schneewind O (2001). Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes and Develop* 15:1725-1752.
4. van Wely KHM, Swaving J, Freudl, R, y Driessen, AJM (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:437-454.
5. Buchanan SK (2001). Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel. *Trends Biochem Sci* 26:3-6.
6. Binet R, Létoffé S, Ghigo JM, Delepelaire P, y Wandersman C (1997). Proteina secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters – a review. *Gene* 192:7-11
7. Goebel W, Dietrich, G, Gentshev, I (2002) The *E. coli* " -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 10:39-45.

8. Andersen C, Hughes C, y Koronakis V (2000) Channel vision- Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Reports* 1:313-318.
9. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, y Hughes C (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405:914-919.
10. Driessen AJM (2001) SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* 9:193-196.
11. Driessen AJ, Manting EH, y van der Does C (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* 8:492-498.
12. Pugsley AP, Francetic O, Possot OM, Sauvonet N, y Hardie, KR (1997) Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria - a review. *Gene* 192:13-19.
13. Sandkvist M (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40:271-283.
14. Sauvonet N, Vignon G, Pugsley, AP, y Gounon, P (2000) Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J* 19:2221-2228.
15. Christie PJ, y Vogel JP (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 8:354-360.
16. Baron C, O'Callaghan D, y Lanka E (2002) Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Mol Microbiol* 43:1359-1365.
17. Christie PJ (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* 40:294-305.
18. Chen L, Li MC, y Nester EW (2000) Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of *virB*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7545-7550.
19. Gomis-Rüth FX, Moncalian G, Perez-Luque R, Gonzalez A, Cabezón E, de la Cruz F, y Coll M (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* 409:637-641.
20. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, y Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458-462.
21. Henderson IR, Navarro-García F, y Nataro, JP (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6:370-378.
22. Henderson IR, y Nataro JP (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69:1231-1243.
23. Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V, y Fernández LA (2002) Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J* 21:2122-2131.
24. Hueck CJ (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433.
25. Galán JE, y Collmer A (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322-1328.
26. Cheng LW, y Schneewind O (2000) Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* 8:214-220
27. Plano GV, Day JB, y Ferracci F (2001) Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* 40:284-293.
28. Macnab RM (1999) The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol* 181:7149-7153.
29. Viprey V, Del Greco A, Golinowski, W, Broughton WJ, y Perret X (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol* 8:123-131.
30. Eichelberg K, Ginocchio CC, y Galán J (1994) Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the F₀F₁ ATPase family of proteins. *J Bacteriol* 176:4501-4510.
31. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, y Aizawa SI (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280:602-605.
32. Tamano K, Aizawa SI, Katayama E, Nonaka T, Imajoh-Ohmi S, Kuwae A, Nagai S, y Sasakawa C (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* 19:3876-3887.

33. Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, y Abe A (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci USA 98: 11638-11643.
34. Macnab RM (1996) Flagella and motility. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Neidhardt FC y col American Society for Microbiology, Washington, DC pp.123-145.
35. Minamino T, y Macnab RM (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. J Bacteriol 181:1388-1394.
36. Dreyfus G, Williams AW, Kawagishi I, y Macnab RM (1993) Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of F₀F₁ ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. J Bacteriol 175:3131-3138.
37. Fan F, y Macnab RM (1996) Enzymatic characterization of FliI: an ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem 271:31981-31988.
38. Minamino T, y Macnab RM (2000) FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. Mol Microbiol 37:1494-1503.
39. González-Pedrajo B, Fraser GM, Minamino T, y Macnab RM (2002) Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. Mol Microbiol 45:967-982.
40. Jackson MW, y Plano GV (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. FEMS Microbiol Lett 186:85-90.
41. Zhu K, González-Pedrajo B, y Macnab RM (2002) Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. Biochemistry 41:9516-9524.
42. Aizawa SI (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol 19:1-5.
43. Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. Annu Rev Microbiol 57:77-100
44. Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, y Karlinsey, JE (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. Science 262:1277-1280.
45. Lloyd SA, Sjöström M, Andersson S, y Wolf-Watz H (2002) Molecular characterization of the type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. Mol Microbiol 43:51-59.
46. Anderson DM, y Schneewind O (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science 278:1140-1143.
47. Bennett JCQ, y Hughes C (2000) From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. Trends in Microbiol 8:202-204.
48. Page A-L, y Parsot C (2002) Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. Mol Microbiol: 46:1-11.

Semblanza de la Dra. Bertha González-Pedrajo.



Bertha González-Pedrajo es Licenciada en Biología así como Maestra y Doctora en Investigación Biomédica Básica por la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante su preparación profesional ha contado con becas otorgadas por la UNAM y el CONACyT, así como por la asociación Fulbright. La Dra. González-Pedrajo ha publicado más de una decena de artículos de investigación original y participado en múltiples congresos nacionales e internacionales. Impartió la asignatura de Bioquímica y Biología Molecular en la Licenciatura para Médico Cirujano de la Facultad de Medicina de la UNAM (1993-1999), y pertenece al Sistema Nacional de Investigadores desde 1998. Actualmente realiza una estancia posdoctoral en el departamento de Biofísica y Bioquímica Molecular de la Universidad de Yale, en EUA; estudiando el sistema de exportación de proteínas flagelares en *Salmonella enterica*. Su principal interés en investigación se centra en conocer los mecanismos moleculares mediante los que ocurre la secreción de factores de virulencia en *Escherichia coli* enteropatógena. Próximamente se incorporará como investigadora al departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde desarrollará dicha línea de investigación.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

José Federico del Río Portilla

Depto. Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

México D.F., 04510.

jfrp@servidor.unam.mx

Introducción

Una de las diferencias entre otros animales y el hombre es que este último ha tenido siempre la inquietud de intentar comprender los diferentes fenómenos que acontecen a su alrededor. El hombre ha tratado de comprender la vida dándole múltiples explicaciones. En la actualidad se sabe que todos los seres vivos poseen el mismo tipo de moléculas, las cuales gobiernan cada una de sus funciones. En tiempos modernos, la química ha tratado de correlacionar estas funciones que realizan las moléculas bioquímicas con su estructura; al conocer la estructura de las moléculas se pretende comprender su funcionamiento. A la fecha, solo dos son las técnicas analíticas modernas que pueden determinar la estructura de biomoléculas, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la difracción de rayos X de monocristales. Estas técnicas han tenido una gran trascendencia para la Química; a tal grado que en 1962 se otorgó el premio Nobel de Química a Max Perutz y John Kendrew por haber obtenido la primera estructura de mioglobina por rayos X de cristal único. Pero, no fue sino hasta 2002 que se otorgó el premio Nobel de Química a Kurt Wütrich por ser un visionario al agrupar a varios investigadores que hicieron posible la determinación de estructuras de proteínas por RMN

(1). En este trabajo se presentarán los fundamentos de la RMN y su aplicación a la determinación estructural de proteínas. Ya que la RMN es una técnica muy especializada, requiere de un vocabulario distinto a lo empleado en otras áreas del conocimiento, como la bioquímica. Para facilitar la lectura del presente trabajo se ha incluido un apéndice que trata sobre la clasificación de los experimentos de RMN más empleados. Así, se pretende romper la barrera psicológica que imponen los términos de RMN. También se incluye un glosario explicando el acrónimo y una breve explicación de las secuencias de pulsos más empleados tanto en este trabajo como en la literatura relacionada con el tema.

Resonancia magnética nuclear

La mayoría de los núcleos atómicos poseen espín, la cual es una propiedad de las partículas que componen a los átomos (2). Al momento de introducir átomos con espín nuclear a un campo magnético externo, el núcleo se comporta como un pequeño imán y tiende a orientarse, preferentemente, a favor del campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia. A este fenómeno de excitación de los espines nucleares se le conoce como resonancia magnética nuclear. Esta energía aplicada, ΔE , corresponde a radiación electromagnética de la región de las radiofrecuencias, la cual se rige por la relación:

$$\Delta E = h \gamma B_o / 2\pi \quad (1)$$

donde h es la constante de Planck, γ es la constante giromagnética dependiente de cada núcleo y B_o es el campo magnético aplicado. La γ es independiente del campo magnético externo aplicado, la cual puede ser calculada a partir de la ecuación 1 empleando los datos de la Tabla 1. Con esta relación es posible intercambiar los términos de energía requerida para la excitación, ΔE , campo magnético aplicado, B_o , y frecuencia de la energía aplicada, ν , ya que se conserva la relación de Einstein dado por $\Delta E = h\nu$, siempre y cuando se defina el núcleo con el cual se está trabajando. Para el caso del protón, si B_o es 11.75 Teslas, la frecuencia de la radiación de excitación tendrá que ser 500 MHz. Hay que enfatizar que para el mismo campo magnético, pero diferente núcleo, la frecuencia de la radiación cambia. Al campo magnético anterior ^{13}C absorbe a 125.73 MHz y ^{15}N a 50.66 MHz. Véase la Tabla 1. A mayor frecuencia de observación, mayor será la separación de los niveles de energía, lo cual incrementa la distribución de Boltzman entre los niveles y en consecuencia la sensibilidad del núcleo observado también se incrementa. Así, considerando los datos de la Tabla 1, el ^1H es el núcleo más sensible y el ^{15}N es el núcleo menos sensible.

Tabla 1. Núcleos activos en RMN comúnmente usados en el estudio de proteínas.

Núcleo	Espín nuclear	Frecuencia de observación (MHz) a 14.1 Teslas	Abundancia Natural (%)	Región normal (ppm)
^1H	$\frac{1}{2}$	600.0	99.99	10 : 0
^{13}C	$\frac{1}{2}$	150.86	1.1	220 : 0
^{15}N	$-\frac{1}{2}$	60.82	0.37	130 : 0
^{19}F	$\frac{1}{2}$	564.52	100.0	0 : -250
^{31}P	$\frac{1}{2}$	242.86	100.0	100 : -100

En la Figura 1 se muestra un equipo de RMN con B_o de 11.75 Teslas, el cual es el mínimo requerido para determinar estructuras de proteínas. Si bien, se espera que todos los ^1H absorban a esta frecuencia, existen pequeñas variaciones (del orden de las centenas o millares de Hz) en las posiciones exactas de excitación para cada núcleo de la misma especie química. Estas variaciones son provocadas por los campos magnéticos locales y específicos generados por la densidad electrónica local que rodea a cada núcleo, también conocido como entorno químico. A la posición en donde se observa la excitación de cada núcleo se le conoce como desplazamiento químico, el cual es empleado para identificar cada tipo de núcleo en una molécula. Las unidades del desplazamiento químico son en partes por millón, el cual se determina con la relación:

$$\text{ppm} = (\nu_o - \nu_{\text{ref}}) * 10^6 / \nu_{\text{ref}} \quad (2)$$

en donde ν_o es la frecuencia del núcleo a observar y ν_{ref} es la frecuencia de referencia del núcleo. El desplazamiento químico de núcleos como los mencionados anteriormente varía en cientos o miles de Hz; por tanto, todos los núcleos de un elemento en específico se observan en una región relativamente pequeña. Por regla general, núcleos equivalentes tienen desplazamientos químicos iguales; núcleos no equivalentes poseen desplazamientos químicos distintos. Aunque no debe sorprendernos que en moléculas complejas puedan existir núcleos completamente distintos que absorban energía en la misma posición.

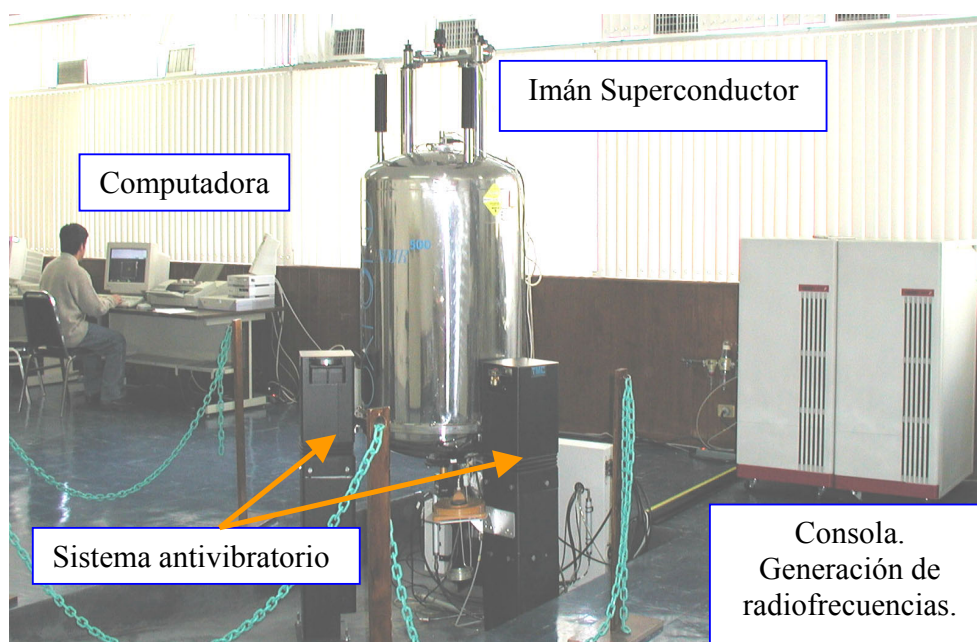


Figura 1. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 11.75 Teslas. En este equipo se observa protón a 500 MHz.

Consideremos una molécula sencilla, la alanina, cuya estructura se muestra en la Figura 2. En ella se observa que existen tres grupos de señales: una con desplazamiento químico en 5.77 ppm, la cual corresponde al protón del ácido y del NH₂; la señal en 4.15 ppm corresponde al protón α del CH; y la señal que corresponde al metilo que se encuentra en 1.55 ppm. Si la molécula es muy pequeña, la determinación del desplazamiento químico puede ser suficiente para la determinación estructural de la molécula. A medida que se incrementa el número de núcleos, la sobreposición de señales aumenta; por ejemplo, en una proteína de 60 aminoácidos se tiene en promedio 500 núcleos de ¹H, de los cuales cada tipo de ellos darían una señal de RMN, provocando que varias señales se traslapen e impidan una interpretación rápida de los espectros.

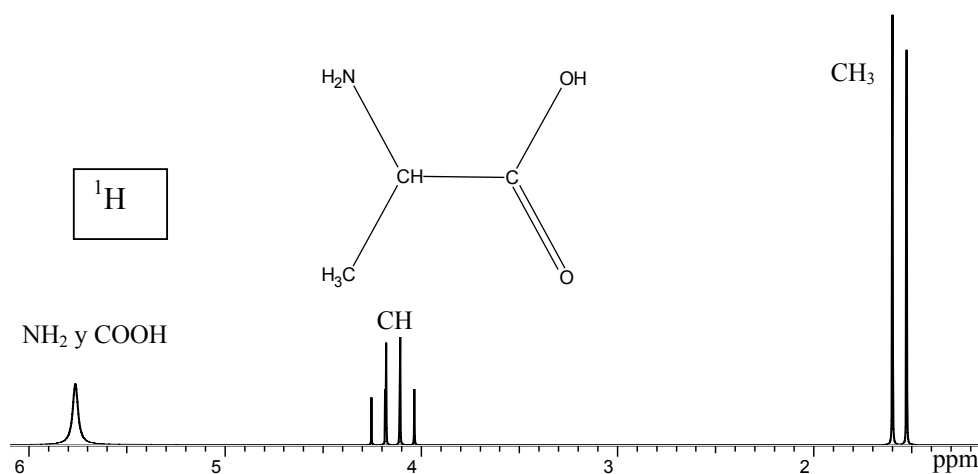


Figura 2. Espectro de RMN de protón en una dimensión de la alanina. Las señales de los metilos muestran el acoplamiento con el protón del metino, por tanto se observa como un doblete; el cual, a su vez muestra el acoplamiento con los tres protones del metilo, observándose un cuarteto. Los protones del COOH y NH₂ se encuentran en el mismo desplazamiento químico sin acoplamiento escalar.

Acoplamiento escalar y dipolar

Si bien, el desplazamiento químico es un parámetro espectroscópico fundamental para la determinación estructural, existe el acoplamiento escalar y el acoplamiento bipolar (2), que son propiedades espectroscópicas fundamentales en la interpretación de espectros complejos de RMN.

El acoplamiento escalar se representa como la influencia que ejerce un núcleo activo en RMN sobre otro activo. En este trabajo sólo trataremos núcleos con espín $\frac{1}{2}$, ya que si el número de espín cambia, los efectos aquí mencionados cambiarán. Al tener dos núcleos acoplados, uno de ellos siente a través de los enlaces químicos un incremento o decremento del campo magnético debido al espín a favor o en contra del núcleo vecino. Este fenómeno produce que las señales de RMN sean más complejas de lo que aparentemente se esperarían, véase el espectro de la alanina en la Figura 2. Por ejemplo, si un núcleo A se acopla con un segundo núcleo con espín $\frac{1}{2}$, la señal de A se vería como dos señales con intensidades 1:1, véase la señal del metilo de la Figura 2. La distancia entre estas dos señales de intensidad 1:1 se conoce como la

constante de acoplamiento definida por la letra J . Otro ejemplo, si un núcleo B se acopla con dos núcleos equivalentes con espín $\frac{1}{2}$, la señal se mostraría como un triplete con intensidades 1:2:1, la distancia entre las señales con intensidad 1 y 2 es la constante de acoplamiento, la distancia total entre las señales con intensidad 1:1 es dos veces la constante de acoplamiento. El acoplamiento escalar se observa generalmente de 1 a 3 enlaces de distancia y no se manifiesta entre núcleos equivalentes. Este tipo de acoplamiento indica la presencia del número de núcleos vecinos. Este hecho es muy importante, es como si se estuviera viendo una fotografía de la molécula, pero vista con los ojos de la RMN. Adicionalmente, Karplus (3) determinó que la constante de acoplamiento a tres enlaces de distancia (3J) entre cualquier tipo de núcleos depende del ángulo diedro formado entre estos átomos, ϕ . La relación que encontró para los núcleos M y X es:

$${}^3J_{MX} = D + E \cos(\phi) + F \cos^2(\phi) \quad (3)$$

donde D , E y F son constantes a determinar del sistema bajo estudio.

El acoplamiento que se presenta a través del espacio se le llama dipolar, esto es, sólo se requiere de su proximidad espacial y depende de la orientación con respecto a B_0 . En disolución este acoplamiento no se observa, dado que el promedio de los diferentes acoplamientos en moléculas que se encuentran en movimiento aleatorio con respecto a B_0 se promedian obteniendo un valor de cero. Pese a ello, este acoplamiento se manifiesta a través del efecto nuclear Overhauser (NOE por sus siglas en inglés). La intensidad de las señales debido al NOE guarda una relación con la distancia entre los núcleos interactuantes, dada por:

$$I_{(NOE)} = k / (r_{AB})^6 \quad (4)$$

donde k es una constante de proporcionalidad y r_{AB} es la distancia entre el núcleo A y el núcleo B .

Recientemente, Bax (4) demostró que cuando la molécula se fija a una determinada malla (fijar a la molécula implica que no existe un movimiento aleatorio de la molécula, por ello el acoplamiento dipolar se manifiesta), la constante de acoplamiento dipolar residual en un sistema tipo cristal líquido diluido, como en micelas, era función del ángulo θ entre dos núcleos, A y B , y de la distancia entre ellos, dado que se cumple la expresión:

$$D_{AB}(\theta) = K [G_A (\cos^2 \theta - 1) + 3/2 G_B \sin^2 \theta \cos 2\theta] r_{AB}^3 \quad (5)$$

donde K es una constante de proporcionalidad, los parámetros G_A y G_B son parámetros que dependen de la forma de la proteína y de las micelas y r_{AB} es la distancia entre los núcleos involucrados. Este hecho es importante en la determinación de estructuras de proteínas, ya que si la proteína está adherida a una matriz, tal que no se permite el movimiento isotrópico, se puede determinar el acoplamiento dipolar residual y, por ende, el ángulo entre estos núcleos, siempre y cuando se tenga una estimación de la distancia entre los núcleos, la cual puede estar dado por los NOE's.

Resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (5)

Cuando se obtiene un espectro de RMN de una proteína, las señales se ensanchan debido al movimiento lento de estas moléculas en el medio acuoso. Mientras más rápido sea el movimiento molecular en el disolvente, las señales son más finas. Este ensanchamiento de las señales junto con el traslape entre ellas provocan que los espectros monodimensionales de una proteína sean imposibles de interpretar. Para lograr la interpretación de los espectros de RMN es requisito indispensable la obtención de espectros multidimensionales. La conceptualización matemática necesaria para comprender los experimentos multidimensionales de RMN está fuera de los objetivos de este trabajo (6). Con estos experimentos es posible determinar qué núcleos dentro de una molécula se encuentran acoplados entre sí. Este conocimiento nos permite determinar el número y tipo de protones que se encuentran a dos o a tres enlaces de distancia. La representación gráfica de un espectro monodimensional es una representación en dos dimensiones, como se muestra en la Figura 2. Un espectro en dos dimensiones debería ser una representación en tres; sin embargo, los espectros en dos dimensiones se grafican como diagramas de contornos para que la representación sea de dos dimensiones solamente y se facilite su interpretación, como se muestra en la Figura 3. Los experimentos en dos dimensiones se pueden clasificar en homonucleares y heteronucleares, ver el apéndice y glosario. La interpretación de este tipo de espectros es muy sencilla. Consideremos nuevamente la molécula de la alanina; en la Figura 3 se muestra una representación del espectro COSY, ver apéndice y glosario. El experimento COSY determina las correlaciones escalares a dos y a tres enlaces de distancia entre los núcleos que se acoplan escalarmente. Los experimentos homonucleares, como el COSY, muestran una serie de señales con las coordenadas iguales, a estas se le llama señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro monodimensional. Las señales que se localizan fuera de la diagonal son las importantes. Las coordenadas de ellas son los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalarmente a dos y a tres enlaces de distancia. Con esta información es posible asignar cada una de las señales de los protones en la molécula. Para ello, es necesario utilizar el desplazamiento químico de las señales que están correlacionando.

La determinación de todos los núcleos que se acoplan entre ellos mismos es una función muy importante en la determinación de estructuras proteicas. Al conjunto de estos núcleos se le llama un sistema de espín. En una proteína, al menos hay tantos sistemas de espín como número de aminoácidos. El número de sistemas de espín es mayor, ya que en los aminoácidos aromáticos los protones de los anillos no se acoplan escalarmente a los protones alifáticos. El experimento COSY es fundamental para realizar estas determinaciones. Existe otro experimento en dos dimensiones llamado TOCSY, ver apéndice y glosario. En él se encuentran las correlaciones de todos los núcleos del sistema de espín. Considérese la molécula de la alanina, en el experimento TOCSY deberían aparecer todas las señales que aparecen en el experimento COSY más las correlaciones del NH_2 y del CH_3 , véase la Figura 4.

La interpretación de los experimentos en dos dimensiones es similar para todos ellos. Se requiere conocer las coordenadas de una señal fuera de la diagonal para conocer a los núcleos que están mostrando una correlación particular. Esta correlación particular la determina el tipo de experimento en dos dimensiones, ver apéndice y glosario. Por ejemplo, un experimento COSY mostrará la correlación escalar a dos y tres enlaces entre protones; el experimento NOESY genera señales fuera de la diagonal cuando los núcleos se encuentran próximos, a no más de 5 Ångstroms de distancia. El experimento NOESY es de gran utilidad ya que la integral de la señal

en tres dimensiones es proporcional a la distancia entre los núcleos. Así, se logra determinar protones que se encuentran alejados en la secuencia de los aminoácidos, pero cercanos debido a la estructura tridimensional que presenta la proteína. Este experimento también permite asignar a los protones de aminoácidos que se encuentran contiguos, llamada la asignación secuencial y la determinación de NOE's a larga distancia que definirán la estructura terciaria o cuaternaria. Más adelante se tratará con mayor detalle este tema.

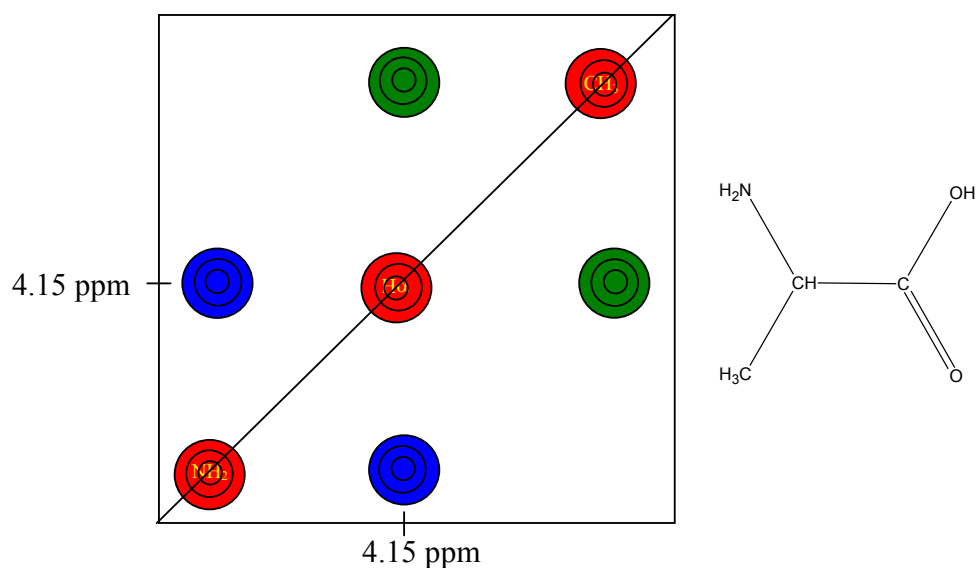


Figura 3. Representación del espectro COSY (ver apéndice y glosario) de la alanina. En este ejemplo se muestra el acoplamiento entre los protones a tres enlaces de distancia. Los círculos rojos representan las señales en la diagonal del espectro. Las señales azules muestran que existe una constante de acoplamiento entre los protones del NH₂ y del H_α. A este efecto se le llama correlación entre los núcleos. Los círculos verdes muestran la correlación entre los protones del CH₃ y el H_α. Con lo cual se dice que los dos protones del NH₂, el H_α y los tres protones del CH₃ forman un sistema de espín, ya que existe acoplamiento escalar entre ellos. Nótese que no existe correlación entre el protón del ácido y el H_α, debido a que se encuentran a más de 3 enlaces de distancia del H_α.

Los experimentos en dos dimensiones ayudan a interpretar muchas señales que se encuentran traslapadas; sin embargo, ello es posible sólo cuando la molécula no es muy grande. Muestras de proteínas constituidas por 50 aminoácidos son factibles de determinar sus estructuras con experimentos en dos dimensiones. Cuando la proteína es mayor, resulta muy complicada y compleja la interpretación de los espectros de RMN. Para solucionar este problema se emplean experimentos heteronucleares en dos y en tres dimensiones.

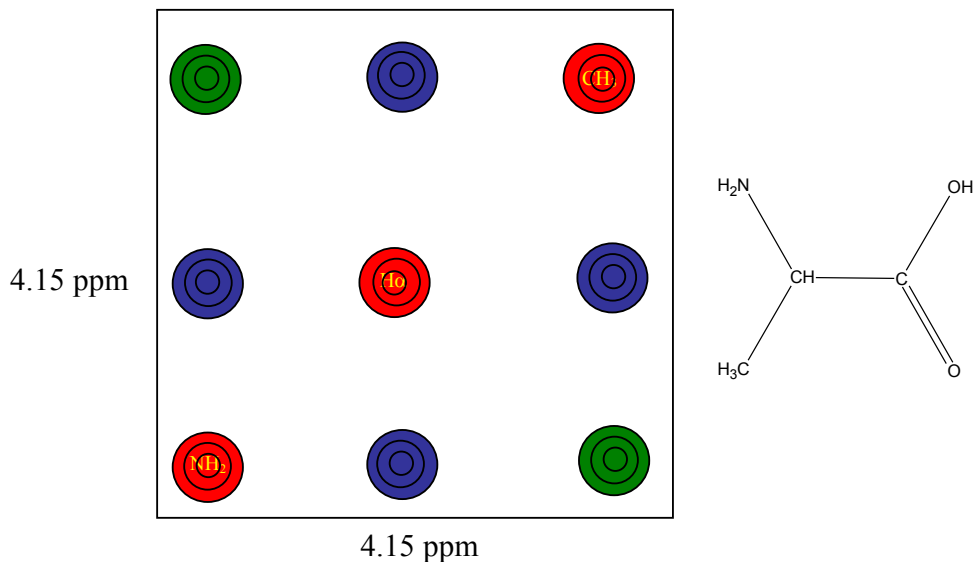


Figura 4. Simulación del experimento TOCSY de la alanina. En rojo se muestran las señales de la diagonal, en azul se muestran las correlaciones que se encuentran también en un experimento COSY y en verde se muestran las correlaciones que sólo aparecen en un experimento TOCSY. Este experimento muestra claramente el sistema de espín.

Explicaremos brevemente en que consisten los experimentos heteronucleares (ver glosario). Estos experimentos muestran las correlaciones entre núcleos distintos. Frecuentemente los núcleos que se correlacionan en una muestra proteica son los ^1H con los ^{15}N y/o con los ^{13}C . Cuando la correlación es a un enlace de distancia, los experimentos se llaman HSQC o HMQC (ver glosario), si son a dos o más enlaces de distancia el experimento se llama HMBC. Este tipo de espectros ayudarán a identificar cada una de las señales de protón. Sin embargo, la abundancia natural de estos dos últimos núcleos impide que se puedan realizar los experimentos empleando muestra con abundancia natural. Por ello, la RMN requiere del apoyo de la biología molecular para poder obtener muestras proteicas enriquecidas con ^{15}N y/o con ^{13}C . Al tener este tipo de muestras es factible también obtener experimentos en tres y hasta en cuatro dimensiones. Sólo se mencionará que los experimentos en tres dimensiones separan señales que aún en los experimentos en dos dimensiones se sobreponen. Para la interpretación de estos experimentos se requiere conocer qué tipo de experimento se realiza y separar los datos de la misma forma como se trabaja con los experimentos en dos dimensiones. Este tema se dejará para trabajos subsecuentes.

Hasta aquí se han mencionado los fundamentos y las herramientas con las que cuenta la RMN, pero ¿cuál es el problema a resolver? El problema a resolver es cómo determinar la

estructura de una proteína con esta técnica espectroscópica. Para explicarlo se requiere conocer un poco sobre la estructura de proteínas.

Estructura de proteínas (7)

Las proteínas son polímeros cuyas bases monoméricas son α -aminoácidos. Principalmente, se han encontrado 20 estructuras de estos α -aminoácidos. Existen cuatro niveles estructurales en las proteínas. La primera es la secuencia de los aminoácidos en la proteína; a la fecha es prácticamente imposible determinar la estructura tridimensional de una proteína contando sólo con la secuencia. El segundo nivel estructural se estabiliza por los puentes de hidrógeno que forman los grupos carbonilo con los grupos amino; generando arreglos locales de la cadena principal llamado hebras β o hélices α , ver Figura 5. El agrupamiento de conformaciones secundarias debidas a atracciones electrostáticas o fuerzas de van der Waals definen a la estructura terciaria. Y por último, la agrupación de varias proteínas para constituir un agregado molecular que realice las funciones naturales, se le conoce como estructura cuaternaria.

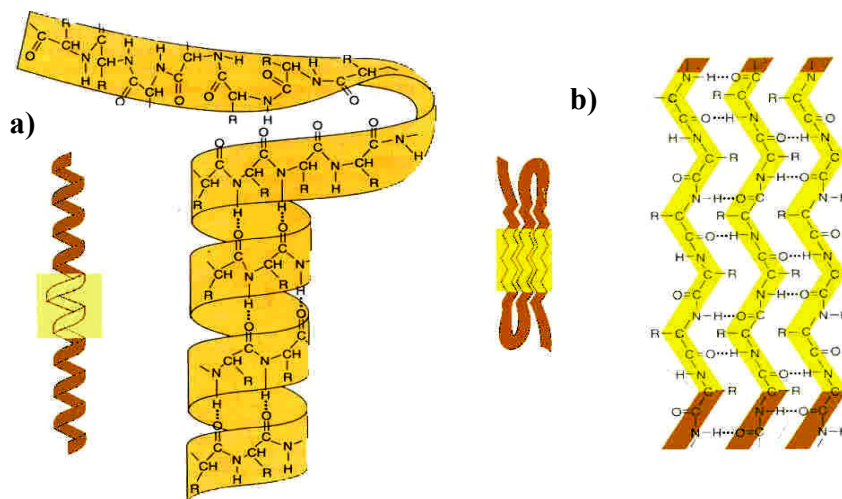


Figura 5. Estructuras secundarias regulares comúnmente encontradas en las proteínas. a) Hélices α . b) Hojas β .

Con los datos de la RMN (8) es posible determinar tanto la estructura secundaria como la terciaria. Sin embargo, es un requisito fundamental contar con la estructura primaria con antelación para facilitar el análisis de los espectros de RMN. Es factible determinar la estructura cuaternaria, pero es una tarea muy compleja. Para estos casos sólo se mencionará que es requisito indispensable que la proteína se enriquezca isotópicamente con el átomo de hidrógeno pesado (el deuterio o ^2H), además de con ^{13}C y ^{15}N .

Para la determinación de la estructura de una proteína se requiere asignar la totalidad de las señales de los espectros en dos dimensiones COSY. En esta forma se determina qué señales corresponden a un aminoácido en particular. Cuando el traslape en regiones específicas es grande, el experimento TOCSY facilita las asignaciones. Conociendo qué tipo de aminoácido

corresponde a que grupo de señales y con la ayuda del experimento NOESY se asigna cada uno de los aminoácidos en la secuencia de la proteína, ver Figura 6. A través del experimento NOESY es posible estimar las distancias de los protones que se encuentran a menos de 5 Ångstroms de distancia.

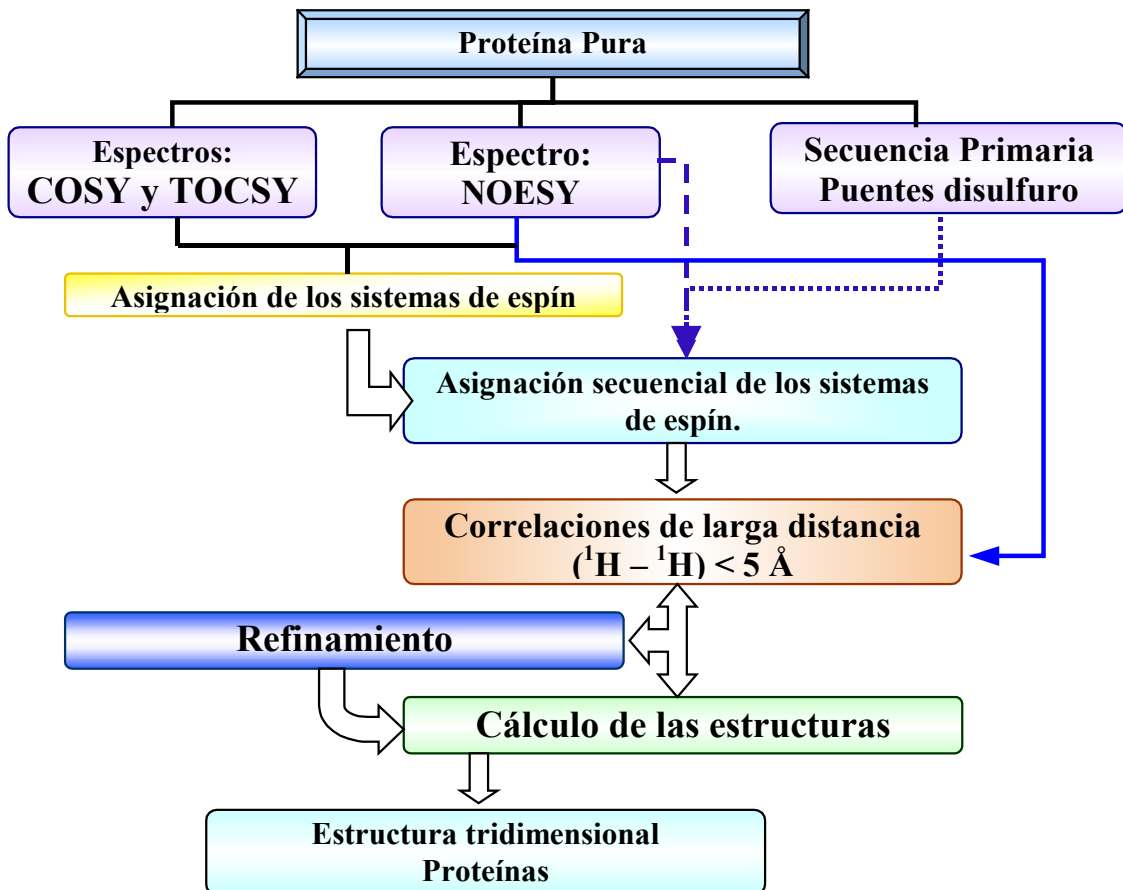


Figura 6. Sinopsis del procedimiento para la determinación de estructura de proteínas.

En la Figura 7 se representa un fragmento de una hoja β en donde los carbonos unidos a los nitrógenos se les denomina C_{α} y a los protones unidos directamente a estos carbonos son los H_{α} . Los protones de los H_{α} se encuentran muy próximos a los HN del aminoácido consecutivo, dado que normalmente están a 2.2 Ångstroms en este tipo de estructuras. Esta distancia se representa con flechas verdes en la Figura 7. Mediante este tipo de correlaciones encontradas en los experimentos NOESY es posible asignar consecutivamente cada sistema de espín determinados con los experimentos COSY y TOCSY, ver Figura 6. Adicionalmente, en este tipo de estructuras secundarias existen varios protones que se encuentran muy próximos, pese a no encontrarse localizados en aminoácidos consecutivos en la secuencia, en el ejemplo de la Figura 7 son los protones $H_{\alpha 3}$ con $H_{\alpha 9}$ y $H_{\alpha 5}$ con $H_{\alpha 7}$. La

distancia entre estos protones es del orden de 2.3 Ångstroms, la cual está ejemplificada por la flecha de color guinda. Además, es posible determinar una serie de correlaciones a larga distancia entre los protones de la hebra azul con los protones de la hebra magenta. Encontrar este tipo de correlaciones en los experimentos NOESY es lo que permite definir la estructura secundaria y la terciaria. También es posible determinar las constantes de acoplamiento entre los protones H_α y NH intrarresiduo, con lo cual se estima el ángulo diedro entre ellos.

A todos estos datos se les llama restricciones, que deben ser del orden de 10 parámetros por cada aminoácido, se incluyen en cálculos de dinámica molecular para estimar todas las posibles estructuras que satisfagan las condiciones de los resultados de la RMN (9). Una vez que todas las estructuras no varíen mucho, se dice que se tiene la estructura de la proteína. Hay que considerar que este proceso es cíclico, una vez que se tiene un buen número de restricciones, se calcula un número importante de estructuras. Con ellas se rectifica si las asignaciones hechas son correctas y, basándose en las estructuras obtenidas, se vuelven a buscar más NOES y constantes de acoplamiento. Este proceso iterativo se repite consistentemente hasta que la gran mayoría de las señales del experimento NOESY son asignadas y que las estructuras calculadas por los programas de dinámica molecular sean muy similares. Este proceso puede llevar varios meses. Sin embargo, dado que los experimentos de RMN se llevan a cabo en disolución, es factible simular el medio fisiológico de la proteína, modificando el pH, la fuerza iónica, la temperatura y qué posibles solutos se acomplejen con la proteína. Estos estudios de complejación son los que han permitido vislumbrar la modelación de fármacos. Por todo lo anterior, es redituable invertir tanto tiempo en la determinación de estructuras por RMN.

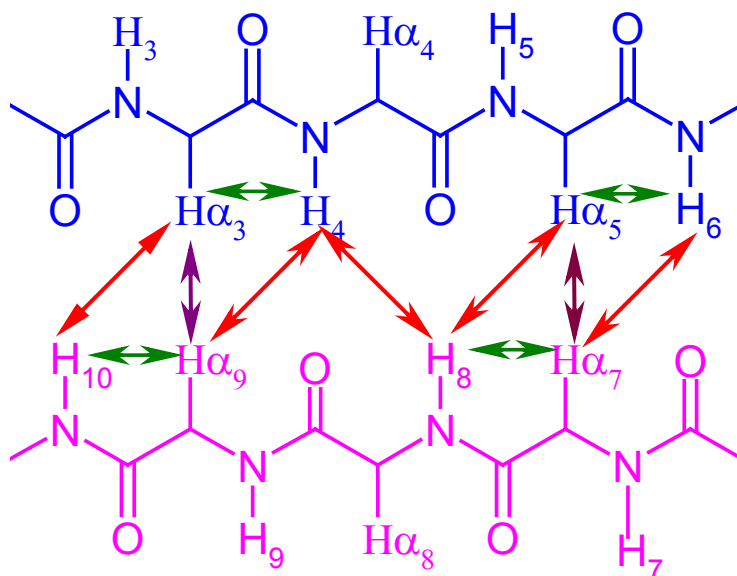


Figura 7. Esquema de las correlaciones encontradas en los experimentos NOESY. Se muestran las correlaciones de los protones de la hebra azul con los protones de la hebra magenta mediante flechas. Las flechas de color verde representan correlaciones intrarresiduo. Las flechas de color guinda representan las correlaciones entre protones H_α a larga distancia; éstas determinan la presencia de hojas β en la estructura. Las flechas rojas muestran correlaciones a larga distancia que deben encontrarse una vez que se determina que existe una hoja β . Nótese que no hay correlaciones entre los protones HN_3 , $H_{\alpha 4}$, HN_5 , HN_7 , $H_{\alpha 8}$ y HN_9 .

El diseño de fármacos es una idea ampliamente acariciada por el hombre. Poder encontrar fármacos más eficaces, que permitan salvar vidas es una tarea que la ciencia de proteínas busca afanosamente. Este proceso puede resumirse de la siguiente forma. Si conocemos la estructura de la proteína y su sitio activo, se puede intuir la forma de la molécula con la cual reacciona. Si además se observan los cambios conformacionales con el soluto con el cual interacciona, se puede estimar y diseñar moléculas que tengan la misma región que reconoce a la proteína y hacer modificaciones en la parte donde no hay una aparente interacción para volver más activo al fármaco. Aún queda mucho por estudiar a este respecto.

Estructura de la proteína h-RPABC14.4

Adicionalmente a este procedimiento para la busca de nuevos fármacos, la obtención de la estructura de una proteína nos permite comprender, analizar y formular nuevas hipótesis sobre resultados experimentales sin explicación aparente. Hace unos años se determinó la estructura de la proteína h-RNPABC14.4 (10). Esta proteína es una subunidad de todos los tipos de RNA polimerasa. Es una proteína muy conservada a través de la evolución, por ejemplo las enzimas de humanos y ratones son idénticas. La región N terminal no está muy conservada, mientras que la C terminal está bastante conservada a través de especies tan diferentes en la cadena evolutiva como bacterias y humanos. En la Figura 8 se muestra la sobreposición de secuencias de diferentes especies en la cual se observa que existe una región que se ha mantenido pese a millones de años de evolución. Existe una región, $\alpha 1$, que en casi todas las especies es idéntica. Pese a su gran identidad, el funcionamiento de esta proteína es aún desconocido.

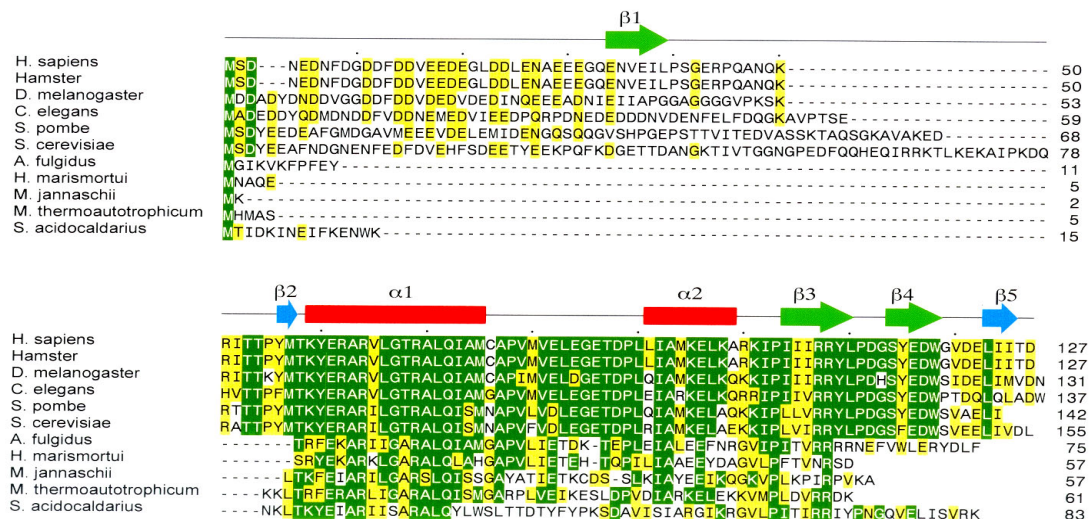


Figura 8. Sobreposición de varias secuencias de proteínas homólogas a la h-RPABC14.4. El color verde indica residuos conservados, el color amarillo indica residuos poco conservados y el color blanco indica residuos no conservados (11). En la parte superior del alineamiento se muestra la estructura secundaria.

La determinación de la estructura de la h-RPABC14.4 (Figura 9), mostró que la región amino terminal carecía de estructura definida, ya que en esa región sólo se encontraron NOE's secuenciales y ningún NOE a larga distancia. A partir del aminoácido 32Gln la proteína muestra una estructura muy definida. Forma dos hojas β , una constituida de tres hebras antiparalela, β 1, β 3, y β 4; y una segunda, β 2 y β 5, por hebras paralelas; y dos hélices α sobrepuestas.

La determinación de la estructura de la proteína humana permitió plantear varias hipótesis de trabajo dados los resultados de estudios aleatorios mutacionales sobre la proteínas homóloga de bacterias. Con base en la estructura, se puede mencionar que la mayoría de las mutaciones aleatorias fueron sobre residuos en regiones poco estructuradas, modificando poco su función. Estos resultados indicaban que mutaciones de los aminoácidos 61Glu y 67Gly eran letales, más no así en otros residuos como el 58Tyr o 108Arg (Figura 10). La estructura obtenida por RMN se muestra en la Figura 9. En ella se aprecia que el aminoácido 61Glu se encuentra al inició de una hélice α y que forma un puente salino con el residuo 108Lys. La mutación sobre este residuo debe modificar sustancialmente la estructura terciaria por la pérdida de estabilidad en el puente salino y la consecuente modificación del plegamiento. El residuo 67Gly se encuentra en medio de una hélice α muy bien definida, la mutación de este aminoácido por ácido aspártico resulta ser letal. Se sabe que el ácido aspártico conserva muy bien las hélices α . Por tanto, una mutación de Gly por Asp no explica un cambio en la estructura secundaria. Sin embargo, 67Gly queda expuesta al medio. Intercambiar un aminoácido no polar por uno con carga negativa indica que existe una interacción de tipo hidrofóbica de la proteína RNPABC14.4 con otra subunidad de la RNA polimerasa que es impedida al intercambiar estos aminoácidos, de tal forma que esta unión no se efectúa. Esta interacción debería ser fundamental para la función que realiza la RNA polimerasa.

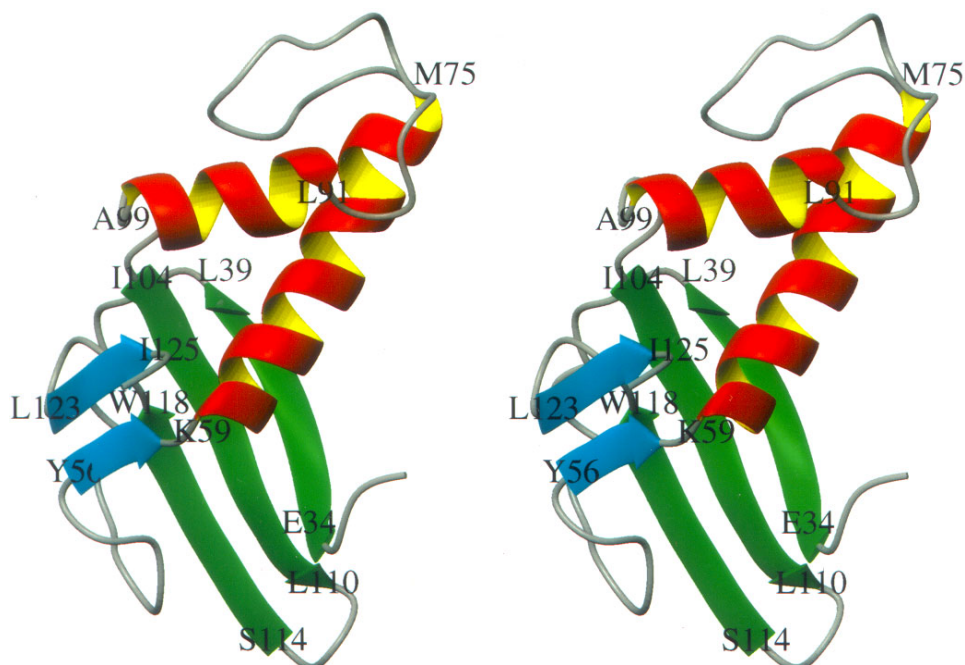


Figura 9. Vista estéreo del diagrama de listones de la proteína h-RPABC14.4. Este diagrama fue obtenido con el programa MOLMOL (12).

Actualmente, se ha implementado la determinación de estructuras proteicas por RMN en estado sólido, lo cual resuelve varios problemas que se tienen cuando la proteína es poco soluble. Sin embargo, las grandes ventajas de la RMN en disolución es la obtención de la estructura de proteínas en el mismo medio en el cual efectúan su función; es posible modificar las condiciones con las cuales se obtiene la estructura al variar el pH, la temperatura y la fuerza iónica; al igual que se pueden determinar cambios conformacionales en presencia de diferentes sustratos. Estos estudios permitirán la mejor comprensión de la relación estructura-función de las proteínas y coadyuvarán al avance de los conocimientos sobre la vida en sí.

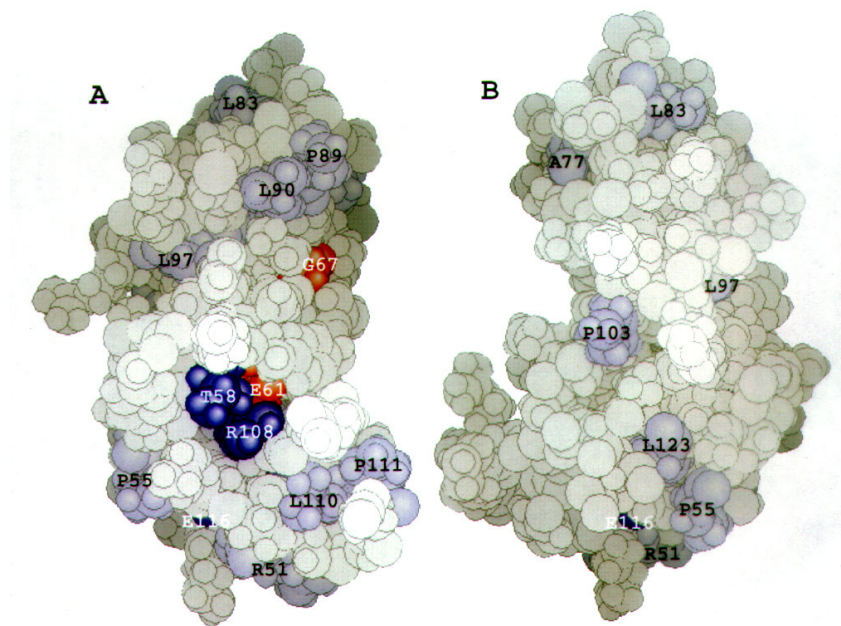


Figura 10. Dos caras diferentes de la superficie de la h-RPABC14.4 donde se resaltan los aminoácidos con mutaciones letales en rojo, mutaciones termo sensibles en azul oscuro y mutaciones en azul claro que no afectan el funcionamiento de la proteína. Este diagrama fue obtenido con el programa MOLMOL (12).

Estudios dinámicos

La determinación estructural de alguna manera implica mantener a las moléculas rígidas, lo cual no es verdad. La RMN observa las estructuras más estables o el promedio de las estructuras. Las moléculas se mueven en disolución en forma conjunta y/o en regiones particulares. Anteriormente explicábamos que las moléculas de proteínas se movían lentamente en comparación con moléculas orgánicas pequeñas. Este efecto provocaba que las señales se ensancharan mucho. ¿Cuál es el fenómeno que está detrás de estos hechos?

Considérese un modelo clásico o vectorial para explicar el fenómeno de la RMN. Este modelo consiste en considerar que cada espín nuclear al introducirse a un campo magnético generan un momento magnético, el cual está definido por:

$$\mu_i = -\gamma m_z \mathbf{B}_o \quad (6)$$

μ_i es el vector de momento magnético individual de cada núcleo que se quiere observar y m_z es la componente en z del espín. Cuando \mathbf{B}_o es perpendicular al eje z , μ_i sólo posee la componente en z , μ_z . La propiedad que se detecta es la suma de todos estos momentos magnéticos individuales y se conoce como magnetización. Estos efectos se visualizan mejor si se plantea la siguiente relación

$$\mathbf{M} = \sum \mu_i \quad (7)$$

donde \mathbf{M} es el vector de magnetización que se detecta en el equipo, al igual que μ_i , \mathbf{M} sólo posee componentes en z en el estado de equilibrio, M_z , ver Figura 11.

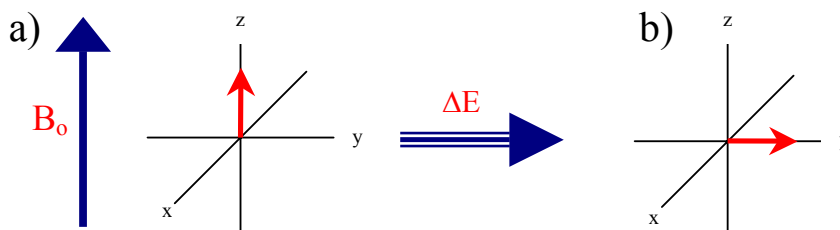


Figura 11. a) Representación de la magnetización en un campo magnético \mathbf{B}_o alineado con el eje z . b) La misma magnetización después de haber aplicado la energía de excitación.

La magnitud de \mathbf{M} se le conoce como M_o . Al aplicar la radiofrecuencia para excitar a los núcleos, la magnetización \mathbf{M} rota hasta uno de los ejes x o y , ver Figura 11. En este momento sólo existe una componente, M_x o M_y que tiene la magnitud de M_o . Si en este momento se suspende la radiofrecuencia, la magnetización \mathbf{M} comienza a rotar, a la frecuencia de excitación (13) para regresar a su estado de equilibrio. A este proceso en donde la magnetización regresa a su estado de equilibrio se conoce como relajación. Este proceso fue estudiado por Bloch (14) desde los años cuarentas del siglo pasado. Bloch encontró experimentalmente que la magnetización regresaba a su estado de equilibrio a dos velocidades diferentes. Esto es, M_z regresaba a su estado de equilibrio a una velocidad y M_x y M_y desaparecían a otra velocidad. Las ecuaciones que explican estos hechos son:

$$\begin{aligned} dM_z / dt &= (M_o - M_z) / T_1 \\ dM_x / dt &= -M_x / T_2 \\ dM_y / dt &= -M_y / T_2 \end{aligned} \quad (7)$$

en donde $1/T_1$ es la velocidad a la cual M_z se regenera y $1/T_2$ es la velocidad a la cual M_x y M_y desaparecen. Por regla general ambas velocidades son muy similares. Sin embargo, T_1 no

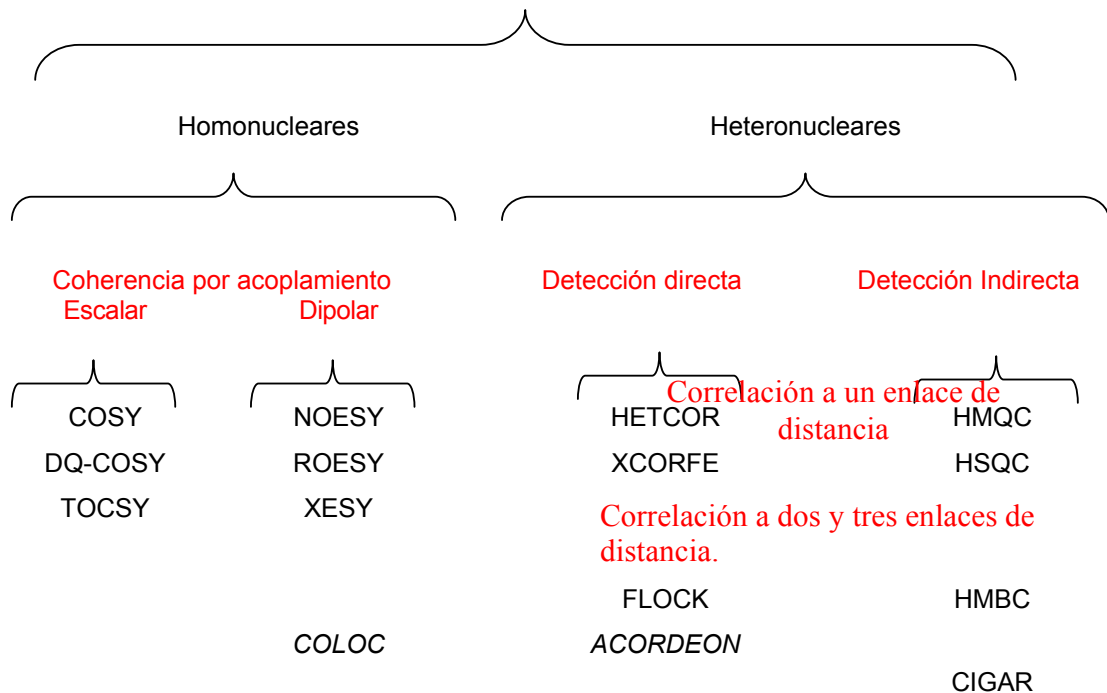
puede ser mayor a T_2 , dado que ello implicaría que M_0 aumentara después de los pulsos de radiofrecuencia, violándose la primera ley de la termodinámica.

Dado que T_1 es una medida de la regeneración de la componente en M_z , la cual es función del intercambio de energía, este proceso depende de como la muestra puede ceder energía al medio. Por ello, es un proceso conservativo. Sin embargo, el proceso con el cual M_x y M_y desaparecen, se debe a procesos no conservativos, esto es, procesos que dependen de la entropía del sistema. Así, moléculas con gran movimiento tiende a relajarse lentamente, debido a la poca interacción con el medio, mientras que moléculas grandes con movimientos lentos, como las proteínas, tienden a relajarse lentamente debido a la gran interacción con el medio.

La determinación de los tiempos T_1 indica la forma en que el núcleo interacciona con el medio cediendo energía. Mientras mayor sea el movimiento de los núcleos en disolución, la interacción con el medio es más deficiente y los valores de T_1 son grandes. En diferentes regiones de la molécula los tiempos T_1 pueden ser diferentes. Ello indica las diferencias en la movilidad de la molécula. Si se conocen estos parámetros es posible estudiar regiones con mayor movilidad dentro de la misma molécula. La determinación de estos parámetros se realiza preferentemente en los ^{15}N , para lo cual se requiere enriquecer a las moléculas con este isótopo de nitrógeno. El ^{15}N permite conocer la flexibilidad general del esqueleto de la proteína (15). En esta forma se determina la dinámica interna de las moléculas dando ideas adicionales sobre la estructura de proteínas y su función.

APÉNDICE

Experimentos en 2D



GLOSARIO

Experimentos homonucleares en 2D

COSY (Correlation Spectroscopy): Experimento que indica la correlación entre dos protones que se encuentran acoplados escalarmente entre ellos. Si la constante de acoplamiento es pequeña la correlación es pequeña. Si la constante de acoplamiento es grande, a pesar de existir más de 4 enlaces de distancia entre los núcleos involucrados, la correlación existe y es intensa.

DQ-COSY (Double Quantum Correlation Spectroscopy) o DQF-COSY (Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy): Experimento muy similar al COSY, solo que es 4 veces menos sensible, pero la intensidad de la señal de la diagonal se reduce en un factor de 8. Ideal para observar correlaciones cerca de la diagonal.

TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) o HOHAHA (Homonuclear Hartman Hanh Experiment): Experimento que muestra la correlación de núcleos que se encuentran formando un sistema de espín.

NOESY (Two dimensional Nuclear Overhauser Spectroscopy): Experimento que muestra el efecto nuclear Overhauser entre dos protones. La intensidad de la señal depende de la masa molecular del compuesto. Este efecto es factible observarlo dado que requiere un tiempo muy largo que permita el intercambio de información sobre la proximidad de los núcleos que se encuentran cerca a través del espacio. A este tiempo se le llama de mezclado.

EXSY (Two dimensional exchange spectroscopy): Experimento similar al NOESY con tiempos de mezclado mayores a los utilizados en este experimento.

ROESY (Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy): Experimento que muestra el efecto en el marco rotante de coordenadas, similar al NOE, solo que este efecto NO depende de la masa molecular del compuesto.

Experimentos heteronucleares en 2D

HETCOR (Heteronuclear Correlation Spectroscopy): Experimento que detecta al núcleo menos sensible y muestra la correlación a un enlace de distancia entre núcleos distintos; esto es, muestra que núcleos están acoplados a un enlace de distancia.

COLOC: Correlated spectroscopy via Long range Coupling. Experimento de detección directa que determina las correlaciones a larga distancia entre protón y un heteronúcleo. No suprime las correlaciones a un enlace de distancia.

LRHETCOR (Long Range HETCOR): Experimento de detección directa que muestra las correlaciones a dos y a tres enlaces de distancia entre núcleos diferentes. Suprime las correlaciones a un enlace de distancia.

FLOCK (Multiple Bird long Range Correlation Spectroscopy): Experimento de detección directa que muestra la correlación a dos o a tres enlaces de distancia entre núcleos diferentes. Suprime las correlaciones a un enlace de distancia.

HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation): Experimento que detecta al núcleo más sensible y muestra la correlación a un enlace de distancia entre núcleos distintos vía coherencia cuántica múltiple.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy): Experimento de detección indirecta que muestra la correlación a un enlace de distancia entre núcleos distintos vía coherencia cuántica sencilla.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation): Experimento que detecta al núcleo más sensible y muestra la correlación a dos o a tres enlaces de distancia entre núcleos distintos vía coherencia cuántica múltiple.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Edgar Vázquez Contreras y al Dr. Enrique García Hernández todos sus comentarios que me hicieron poner los pies en la tierra al pedirme aclarar conceptos que los consideraba "de obvia resolución".

Referencias

1. www.nobel.se/chemistry/laureates/index.html.
2. R. K. Harris "Nuclear Magnetic resonance Spectroscopy. A Physicochemical View" England, Longman Scientific & Technical, 1986.
3. M. Karplus *J. Chem. Phys.* **30** (1959) 11-15; b) M. Karplus *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2870-2871.
4. N. Tjandra and A. Bax *Science* **278** (1997) 1111-1113; b) J. S. Hu, S. Grzesiek and A. Bax *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 1803-1804.
5. H. Friebolin. "Basic One and Two Dimensional NMR Spectroscopy" 2nd Ed. VCH, Germany, 1993.
6. F. J. M. Van de Ven "Multidimensional NMR in Liquids. Basic Principles and Experimental Methods" New York, Wiley-VCH 1995.
7. D. Voet, J. D. Voet and C. H. Pratt "Fundamentals of Biochemistry", John Wiley and Sons, E. U. (1999).
8. K. Wüthrich "NMR of protein and nucleic acid", John Wiley & Sons, E. U., 1986. b) J. N. S. Evans "Biomolecular NMR Spectroscopy". Oxford University Press, Oxford, 1995. c) J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skeggs "Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice". Academic Press, London, 1995.
9. T. F. Havel, I. D. Kuntz and G. M. Crippen, *Biopolymers* **18** (1979) 73-82.
10. F. del Río Portilla, A. Gaskell, D. Gilbert, J. Ladas and G. Wagner "Solution Structure Determination of h-RPABC14.4 by NMR" *Nature Structural Biology*, **6** (1999) 1039-1042.
11. Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" *Trends in Genetics* **16**, 276-277.
12. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures" *J. Mol. Graphics* **14**, 51-55
13. Friebolin, H. "Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy" VCH, Tirdth Edition, E. U. A., 1993.
14. Bloch, F. *Phys. Rev.* **70** (1946) 460-.
15. Peng, J. W. and Wagner, G. "Investigation of protein motions via relaxation measurements" Chapter 20, *Methods in Enzymology* Vol. 239 T. L. James and N. J. Oppenheimer Editors, Academic Press, E. U. A., ((1994) 563-596.

Semblanza del Dr. Jose Federico del Río Portilla.



Postdoctorado: Harvard Medical School de 1996-1998. Elucidación estructural de proteínas por RMN. Doctorado: Físicoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México, 1995. Estancia de dos años en la Universidad de Cambridge, Inglaterra, 1992-1994. Maestría: Química Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, 1991 Licenciatura: Químico. Universidad Nacional Autónoma de México, 1985 DISTINCIONES Investigador Nacional desde 1994. Candidato a Investigador Nacional de 1991-1994 Medalla Gabino Barreda 1995. Becario de la Organización de Estados Americanos, 1998. Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el N. I. H., 1996. Becario de la Universidad Nacional Autónoma de México, 1983-1986. Ganador del concurso de oposición en el uso de espectrometros de masas, Instituto de Química. U.N.A.M., 1987. Ganador del concurso de oposición de la materia Espectroscopía Aplicada, Facultad de Química. U.N.A.M., 1991. Ganador del concurso de oposición de la materia Química Analítica III, Facultad de Química. U.N.A.M., 1991.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

LA COMPLEJIDAD DE LAS PROTEÍNAS: RELACIÓN ENTRE ESTABILIDAD, FLEXIBILIDAD Y CATÁLISIS

Armando Gómez Puyou

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70243, 04510 México, D. F., México.

apuyou@ifisiol.unam.mx

Introducción

Las proteínas son el producto de la información que está en el genoma de cada individuo. Aunque se ha logrado descifrar el genoma de varios organismos, no deja de impresionar la cantidad de información que se encuentra en una simple secuencia de bases púricas y pirimídicas. En el código está escrito cual debe ser el primer aminoácido de cada proteína, cuáles son los que lo siguen y cual es el final. Esto en si es sorprendente ya que en promedio cada proteína está formada por aproximadamente 200 aminoácidos, y en cada célula existen miles de proteínas diferentes. Además ahora se sabe que cada una de esas proteínas tiene la capacidad para llevar a cabo un trabajo específico. El origen de las proteínas solo se puede explicar por mecanismos evolutivos en los que a través de miles de años de ensayo y error, se formaron y persistieron únicamente aquellas que podían efectuar las reacciones que se requieren para que un organismo sobreviva. Las proteínas que surgieron hace mucho tiempo son las que, con modificaciones relativamente pequeñas, llegaron hasta nuestros días.

A la complejidad del origen de las proteínas se añade el hecho de que en el microcosmos de una célula constantemente hay destrucción de proteínas, y sin embargo en las células siempre hay una cantidad relativamente constante de proteínas. Esto implica, y de hecho se ha demostrado, que en toda la vida de las células, la síntesis de las proteínas es un proceso constante. En términos muy simples, las células son esencialmente una máquina programada para sintetizar las moléculas que se destruyen. Sin embargo, cuando se quiere entender como esos procesos se llevan a cabo, se encuentra que la complejidad del sistema muchas veces rebasa los límites de las imaginaciones más activas. Este capítulo trata sobre las proteínas, que son sólo uno de los muchos tipos de componentes que forman las células del mundo biológico. Principalmente se tratará de describir la complejidad de las proteínas en cuanto a su formación y la de los factores que participan en la expresión de su función.

En esta breve introducción es apropiado señalar que la investigación de las proteínas es uno de los temas de mayor interés en la ciencia contemporánea. Esto se debe principalmente a dos razones. Una, es que en la ciencia no hay nada más atractivo que un campo de importancia en el que existen preguntas que aún no se han podido contestar. La segunda es que se tiene la certeza de que el conocimiento de las fuerzas que operan en la formación y función de las proteínas hará posible la fabricación de proteínas con las características que uno desee, o sea que el problema es de importancia económica.

Generalidades

Todas las proteínas del mundo biológico están formadas por los mismos 20 aminoácidos. Esto llama la atención ya que en la evolución las proteínas han adquirido funciones muy diversas. Por ejemplo, algunas han adquirido la capacidad de llevar a cabo procesos contráctiles, otras la de pasar solutos través de una membrana, establecer comunicación entre los distintos componentes de una células, deslizarse o girar una sobre otra, o catalizar reacciones con mecanismos químicos diferentes. La gran diversidad de funciones que las proteínas han adquirido con solo 20 aminoácidos diferentes sólo se explica si los aminoácidos que se enlazan a través de uniones peptídicas para formar una proteína determinada, lo hacen en una secuencia u orden específico, la llamada estructura primaria de las proteínas. De hecho, la estructura o el orden en que se colocan los aminoácidos es el fruto de la información que se encuentra en el genoma de cada individuo, Sin embargo, la estructura primaria es solo parte de la historia. Se sabe que la formación de una proteína funcionalmente competente requiere que la cadena polipeptídica se distorsione y así permita la interacción entre dos sitios de la cadena polipeptídica; los sitios pueden estar a distancias de unos cuantos o muchos aminoácidos. Cuando todas las interacciones entre distintos sitios de la proteína se establecen se llega al producto final, una molécula con una estructura tridimensional precisa y funcionalmente competente.

Las interacciones que se establecen entre distintos segmentos de la cadena polipeptídica ocurren principalmente entre las cadenas laterales de los aminoácidos. Es importante señalar que estas interacciones no son covalentes, aunque en algunas proteínas existen puentes disulfuro que son necesarios para mantener su estructura y función. Las interacciones no covalentes pertenecen a la categoría de uniones débiles - puentes de sal, interacciones tipo van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. En

términos energéticos todas ellas son órdenes de magnitud menos estables que las uniones covalentes.

En muchas proteínas, la estructura final se forma con una sola cadena de aminoácidos, a este tipo de proteínas se les denomina monoméricas. Sin embargo, la mayoría de las proteínas existen como oligómeros (1). Estas son el resultado de la interacción entre dos o más cadenas de aminoácidos que tienen alguna estructura tridimensional, y que en un paso posterior a la asociación adquieren la estructura nativa. En la terminología actual, cuando el producto final de la síntesis de proteínas es una proteína formada por dos o más cadenas polipeptídicas, se dice que esa proteína tiene una estructura cuaternaria. Dentro de las proteínas oligoméricas las más comunes son las diméricas, y dentro de éstas las homodiméricas (formadas por dos monómeros idénticos), pero existen proteínas que están formadas por más de 20 monómeros. Independientemente del número de cadenas polipeptídicas que las formen, a las proteínas que tienen una estructura terciaria o cuaternaria definidas y son funcionalmente competentes también se les conoce como proteínas nativas.

Después del genoma

Como se mencionó, la estructura primaria de una proteína es una cadena de aminoácidos enlazados por uniones peptídicas cuya secuencia está determinada por la información que se encuentra en el genoma. Sin embargo, una cadena de aminoácidos que no tiene estructura definida y estable no es una proteína, tal y como existen en todos los organismos de nuestro mundo. A partir de la formación de la estructura primaria, los pasos que dan lugar a la formación de las estructuras secundarias, terciarias, y cuaternarias son totalmente independientes de la información genética. Esto lo demostró Anfinsen y colaboradores (2) hace ya varias décadas. Los investigadores desnaturalizaron a una enzima (ribonucleasa), o sea que indujeron la pérdida de su estructura terciaria y secundaria. En un segundo paso eliminaron el agente desnaturalizante y observaron que la proteína volvía a adquirir su estructura nativa. El mismo fenómeno se ha visto con muchas otras proteínas. Estas observaciones han llevado a la conclusión de que en la estructura primaria de una proteína existe la información para que las proteínas adquieran una estructura tridimensional precisa y funcional.

El cómo una cadena de aminoácidos adquiere espontáneamente su estructura funcional es uno de los temas de mayor interés actual. Las siguientes observaciones y consideraciones ilustran porque este tema es un verdadero desafío intelectual. Se sabe desde hace muchos años que ciertos agentes como el cloruro de guanidinio o la urea ocasionan desnaturalización de las proteínas. Es decir, cuando las proteínas se exponen a concentraciones altas (molares) de uno de estos agentes, se observa que las proteínas pierden su estructura secundaria, terciaria, o cuaternaria si es que se trata de una enzima oligomérica. Supóngase que la proteína que se desnaturalizó estaba formada por 200 aminoácidos; este número es cercano al promedio de los aminoácidos que forman a las cadenas polipeptídicas de las proteínas. Ahora bien, si el agente desnaturalizante se elimina, es frecuente observar que la proteína adquiere nuevamente su estructura nativa. Lo impresionante y enigmático de la observación, es que la transición del estado desnaturalizado al nativo muchas veces ocurre en segundos o en fracciones de segundo.

Para entender el fenómeno, algunos investigadores han hecho algunos cálculos. Se ha examinado por ejemplo, si la formación de la estructura nativa a partir de una cadena de

aminoácidos es un proceso al azar (3). En esta línea de pensamiento, se supuso que cada uno de los aminoácidos de la cadena polipeptídica visita a todos los otros aminoácidos hasta que finalmente logran establecer las interacciones que se encuentran en la estructura nativa. Bajo estas consideraciones, se calculó que si cada visita tuviera un tiempo de duración de 1 milisegundo, la formación de la proteína nativa tardaría más de 10^{17} segundos, que es la edad del universo. Ciertamente que la adquisición de la estructura de una proteína no es un proceso al azar. Esto implica que en la secuencia de aminoácidos existe la información para que rápidamente una cadena de aminoácidos se pliegue y se establezcan los cientos de interacciones débiles que se encuentran en la estructura nativa de una proteína. De hecho, muchos investigadores se refieren a los mecanismos que operan en el plegamiento de una proteína como la segunda parte del código genético.

Actualmente se trabaja mucho para entender como es que una cadena de aminoácidos con una secuencia determinada, se pliega rápida y espontáneamente a una estructura tridimensional precisa funcionalmente competente. El trabajo ha empezado a rendir frutos. Ahora gracias al análisis detallado de estructuras cristalográficas de cientos de proteínas y de las propiedades fisico-químicas de los aminoácidos, es posible predecir con relativa seguridad la predisposición de cuando ciertas secuencias de aminoácidos para formar α hélices, hebras β , o asas. De la misma manera existen estudios que señalan cuales porciones de las proteínas pueden formar arreglos que determinan su capacidad para interactuar con otras proteínas, es decir proteínas oligoméricas (4).

Se espera que lo anterior ilustre que aún hay muchos puntos por entender en el plegamiento de las proteínas. Como se mencionó, el campo en sí es un verdadero desafío. Sin embargo, también es de interés práctico, principalmente para los diseñadores de proteínas. De nada le sirve a esos investigadores conocer cuales son los residuos y en que posición deben estar para que la proteína ejerza determinada función, si la proteína no se pliega a la estructura correcta.

Las proteínas son estructuras dinámicas

La cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear (RMN, ver capítulo de F. Del Río en este volumen) en conjunción con la información bioquímica que se ha acumulado a través de muchos años han sido fundamentales en el conocimiento que actualmente se tiene sobre las proteínas. Ahora se conoce la arquitectura atómica del interior y el exterior de muchas de ellas y como ésta se relaciona con su función. Además, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear proporcionan información precisa sobre los átomos que intervienen en la formación del complejo ligando-proteína. Esta información es muy valiosa, y por tanto es muy alentador que en los últimos años el campo de la cristalografía y la resonancia magnética nuclear se hayan desarrollado a un ritmo impresionante.. Como resultado, hoy en día en los bancos de datos, se obtiene fácilmente información estructural sobre más de 6.000 proteínas.

Las imágenes cristalográficas y las obtenidas por resonancia magnética nuclear son muy bellas. Además proporcionan datos sobre la posición de cada uno de los átomos de las proteínas en un espacio tridimensional, y en consecuencia la distancia que hay entre ellos. Esto permite hacer inferencias razonables sobre las interacciones que mantienen la estructura de las

proteínas y como los ligandos interactúan con ellas. Lamentablemente, las imágenes pueden dar la idea de que las proteínas son estructuras constantes e invariables. Nada está más lejos de la realidad. En el caso de las enzimas, aún en ausencia de su sustrato, las estructuras vibran y fluctúan constantemente. En algunas de sus regiones, las fluctuaciones son pequeñas, pero en otras, los movimientos pueden ser de varios Å. También se ha documentado que cuando un ligando se une a la proteína, se producen cambios estructurales de la proteína; a veces los cambios son en regiones cercanas al sitio de unión, pero con frecuencia se observa que la unión del ligando ocasiona cambios en lugares distantes. Todo esto indica que las proteínas son estructuras dinámicas. El dinamismo de las proteínas y su contribución a su función se percibe más claramente en las enzimas. Es por esta razón el resto del capítulo tratará principalmente sobre las enzimas.

Vale la pena señalar que el dinamismo de las enzimas se muestra muy claramente en los trabajos en que se siguió el proceso catalítico en una sola enzima (5). Este y otros datos muestran que el proceso catalítico es una secuencia de reacciones en que cada una se acompaña de movimiento y desplazamiento de distintas partes de la proteína. De hecho, algunos investigadores consideran a la catálisis como una sucesión de microestados que difieren en distintos grados de fluctuaciones locales (6). Los arreglos internos que constantemente ocurren, o aquellos que específicamente se llevan a cabo durante la catálisis solo son posibles si en las proteínas existe cierto grado de flexibilidad. Esto lleva a la consideración de lo que es una enzima funcionalmente competente. Hasta donde se puede ver, para que ejerzan su función, las enzimas deben poseer cierto grado de flexibilidad, pero al mismo tiempo deben conservar su estructura tridimensional, o sea que las proteínas sean estables.

Una vez que los aminoácidos se han enlazado por medio de uniones peptídicas, la cadena se pliega y adquiere su estructura nativa. Como se mencionó, en el caso de las proteínas oligoméricas, los polipéptidos plegados se asocian unos con otros y forman el oligómero funcionalmente competente. Es necesario señalar que en el plegamiento correcto de las proteínas con frecuencia participan factores externos, como por ejemplo, las chaperonas o chaperoninas, pero en este capítulo este tema no se discutirá. En lo que sí se hace énfasis, es que la transformación de una cadena de aminoácidos desplegada a la estructura nativa, es un proceso termodinámicamente espontáneo. Es decir, una vez que la cadena de aminoácidos se ha formado, su tendencia natural es la adquisición de la estructura nativa, o sea que el cambio de energía libre, ΔG , en la transición de la cadena desplegada a una estructura que es capaz de llevar a cabo una función es negativo.

El valor del ΔG en la reacción proteína desplegada a nativa es de importancia ya que da una idea de la estabilidad de esta última. Se han hecho numerosos estudios para determinar los valores del ΔG del plegamiento de las proteínas (por ejemplo ver ref. 7). Sobre la base de estos estudios, ahora se tiene una idea bastante cercana sobre el ΔG de esta reacción. En general, el cambio de energía libre de la reacción es del orden de unas 10 kcal por mol favorable a la formación de la estructura nativa (8).

¿Que significa un ΔG de 10 kcal por mol? Esto se tiene que evaluar tomando en cuenta la estructura global de las proteínas. A partir de las estructuras cristalográficas de muchas proteínas en su estado nativo, se ha visto por ejemplo, que una proteína conformada por una cadena polipeptídica de unos 200 aminoácidos, posee varios miles de interacciones débiles, puentes de sal, puentes de hidrógeno, interacciones tipo van der Waals e interacciones

hidrofóbicas. Sobre esta base es tal vez ilustrativo señalar a que pueden ser equivalentes 10 kcal/mol. Por ejemplo, 10 kcal por mol son equivalentes a la energía de formación de unos cuantos puentes de hidrógeno. Estas cifras indican que las proteínas son efectivamente estables, de no ser así, las enzimas catalíticamente competentes no existirían; sin embargo su estabilidad es marginal.

Esta característica de las enzimas muy probablemente está relacionada con su función. De hecho, en este momento es apropiado recordar que en algunas proteínas es muy clara la existencia de factores desestabilizantes. Por ejemplo, algunas proteínas tienen residuos cargados que se localizan en partes hidrofóbicas de las proteínas (9). La presencia de una carga en el interior de un ambiente hidrofóbico es un factor desestabilizante, y sin embargo en varias proteínas se ha demostrado la existencia de tales fuerzas y su conservación a lo largo de la evolución.

A priori, la existencia de factores desestabilizantes en las enzimas parecería una incongruencia. Sin embargo, si se acepta que los procesos catalíticos están íntimamente ligados a la flexibilidad de las enzimas, la existencia de tales factores puede tener sentido. Las enzimas sirven para catalizar, y este proceso se acompaña de muchos arreglos internos. Es decir, en las proteínas se requiere que las interacciones entre sus átomos o residuos no sean muy estables, de otra manera las proteínas no podrían sufrir los arreglos conformacionales que se requieren para su función. Bajo esta línea de pensamiento, algunos investigadores de hecho consideran que para que la enzima ejerza su función (10) es necesario que exista un balance entre fuerzas estabilizantes y desestabilizantes. Por lo tanto, no es sorprendente que el ΔG de la transición del estado desplegado a nativo sea relativamente pequeño. En este sentido, tal vez vale la pena considerar si así fue como la evolución resolvió el problema de crear una estructura flexible, pero a la vez estable.

Estabilidad, flexibilidad y catálisis

En este momento es conveniente evaluar si las consideraciones anteriores las sustentan observaciones experimentales. Específicamente la pregunta a contestar es si en las enzimas en realidad hay relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. Existen dos líneas de investigación en las que se ha acumulado información pertinente.

Una de estas versa sobre las propiedades que las enzimas adquieren cuando se colocan en medios de bajo contenido de agua. Como se mencionó, existen muchas pruebas que indican que los procesos catalíticos se acompañan de múltiples cambios conformacionales. Esto obviamente implica que en el curso de la catálisis, muchos de los residuos de la proteína se ocultan o se exponen al solvente. En otras palabras, los arreglos entre el agua y la proteína son parte del proceso catalítico. Esta misma regla se debe aplicar a la flexibilidad proteica; las fluctuaciones o movimientos de las proteínas se acompañan de arreglos entre los residuos de la proteína y el solvente.

Con esta idea, se llevaron a cabo estudios para determinar cómo la cantidad de agua en contacto con una enzima afectaba su capacidad catalítica. Uno de estos estudios lo realizó Garza-Ramos y cols (11). Los investigadores colocaron a la ATPasa mitocondrial dentro de micelas invertidas. Este sistema tiene la ventaja de que la cantidad de agua en contacto con la

enzima se puede ajustar fácilmente. Los investigadores encontraron que entre más bajo era el contenido de agua en contacto con la enzima, menor era su V_{max} . Bajo el concepto de que la catálisis se acompaña de cambios estructurales y ajustes con el solvente, los datos se explican por el hecho de que a bajas cantidades de agua (cerca de una monocapa de moléculas de agua alrededor de la enzimas), los arreglos entre la proteína y el solvente se ven seriamente afectados, y en consecuencia, la velocidad catalítica disminuye.

En el mismo sistema, los autores estudiaron la estabilidad de la enzima. Los resultados fueron dramáticos; se encontró que en ambientes de bajo contenido de agua, la enzima resistía temperaturas de más de 80° C. Los investigadores también observaron que ajustando el contenido de agua del sistema, se podía observar que existe una relación inversa entre la termoestabilidad de la enzima y su capacidad catalítica, vista como V_{max} . Es decir, entre más estable era la enzima, menor era su capacidad catalítica. Estos resultados son los que se esperarían de una estructura en la que su estabilidad está inversamente relacionada con su capacidad para llevar a cabo los cambios conformacionales que son necesarios para la catálisis. Este tipo de estudios también se han hecho en sistemas en los que las enzimas se suspenden directamente en un solvente orgánico apolar (ver revisión en ref 12). También se observó que entre más baja es la cantidad de agua en contacto con la enzima, menor es su capacidad catalítica y mayor es su termoestabilidad.

La relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis también se puede observar cuando se estudia el comportamiento de las enzimas a distintas temperaturas, y en particular cuando se comparan enzimas de organismos mesófilos y termófilos. Los experimentos clásicos en que se mide la actividad enzimática a distintas temperaturas muestran que el número de recambio de la enzima, la velocidad a la que la enzima convierte a su sustrato en producto (k_{cat}), aumenta conforme se eleva la temperatura del sistema. Todas las enzimas muestran este comportamiento, pero además en todas, cuando se llega a una temperatura determinada, la k_{cat} disminuye, y a temperaturas un poco más altas las enzimas dejan de expresar actividad catalítica. En forma gráfica, la curva de temperatura contra la magnitud de la k_{cat} tiene la forma de una campana asimétrica, el ascenso es gradual, mientras que la caída de la actividad es brusca. La temperatura a la que se observa la máxima k_{cat} se conoce como temperatura óptima. Si se considera el dinamismo de las proteínas y su flexibilidad, se puede aceptar que la parte ascendente de la curva refleja un aumento en la flexibilidad de la enzima que es inducido por el aumento gradual de la temperatura.

Cuando se compara la actividad de una enzima que proviene de un organismo mesófilo con la de un termófilo, se obtienen datos interesantes e ilustrativos sobre la relación que existe entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. Como es de esperar, las curvas de actividad enzimática *versus* temperatura de las dos enzimas tienen el mismo perfil, excepto que la curva con la enzima del termófilo se desplaza hacia temperaturas más altas. Es decir, a las temperaturas a las que la enzima mesofílica expresa actividades relativamente altas, la enzima termofílica muestra poca actividad. Sin embargo, en la medida que se incrementa la temperatura del sistema, se llega al punto en que la enzima del mesófilo deja de expresar catálisis, mientras que la del termófilo continúa aumentando hasta que finalmente se llega a una temperatura (aprox. 80° – 85° C en las enzimas termofílicas) en que su actividad catalítica desaparece.

Los trabajos en que se han comparado las k_{cat} a diferentes temperaturas de enzimas que provienen de organismos termofílicos y mesofílicos muestran una característica interesante. A

pesar de que las curvas de las enzimas termofílicas están a la derecha de las de los mesófilos, las k_{cat} de las dos enzimas a las temperaturas óptimas son muy similares. En otras palabras, las dos enzimas tienen la misma capacidad catalítica, excepto que se requieren diferentes temperaturas para que las enzimas muestren velocidades catalíticas semejantes. Jaenicke y Bohm (8) se han referido a este comportamiento como un fenómeno de estados equivalentes. En otras palabras, las dos enzimas tienen la misma capacidad para llevar a cabo los arreglos conformacionales que acompañan a la catálisis, excepto que para que éstos ocurran, las termofílicas requieren temperaturas mayores, o sea que la enzima termofílica es relativamente más rígida o menos flexible que la mesofílica.

En el comportamiento de las enzimas de los mesófilos y los termófilos en función de la temperatura hay otro punto que vale la pena meditar. Este se refiere a la temperatura a que las enzimas dejan de expresar catálisis. La temperatura a la que las enzimas mesofílicas dejan de expresar catálisis es alrededor de 60° C, mientras que en las termofílicas no es raro observar que éstas son estables a temperaturas de 85° C. Los estudios de muchos laboratorios muestran que la pérdida de actividad, se debe a que a determinada temperatura, las enzimas pierden la estructura que les permite ser catalíticamente activas. El que las enzimas termofílicas requieran mayor temperatura para perder su estructura tridimensional, obviamente implica que estas enzimas son más estables que las mesofílicas, lo cual es necesario para que los termófilos vivan en las condiciones físicas de sus nichos. Esto obviamente se logró por medio de adaptación Darwiniana. Por lo tanto es válido concluir que el balance entre las fuerzas desestabilizantes y estabilizantes fueron factores que los procesos evolutivos tuvieron que tomar en cuenta para que los distintos organismos de nuestro mundo fueran exitosos.

Contrapunto

Los datos de las enzimas que provienen de organismos que habitan distintos nichos y los que se han obtenido sobre el comportamiento de las enzimas en sistemas de bajo contenido de agua ilustran una característica general de las enzimas: entre mayor sea la estabilidad de las enzimas, menor es su capacidad catalítica. Ya que la capacidad catalítica está relacionada con la flexibilidad de la proteína, y la flexibilidad con estabilidad es entonces relativamente claro que en las enzimas estas tres características son esenciales e interdependientes. Es decir, la catálisis no es posible sin flexibilidad, pero esta última tiene que ser de una magnitud que sea compatible con el parámetro estabilidad.

Es importante señalar que esta imagen de las enzimas es congruente con muchos datos experimentales. Sin embargo, hay algunas observaciones en las cuales la relación entre estabilidad y función no es evidente. Un ejemplo son los experimentos de Mercado-Besserer y cols con la triosafosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica* (datos no publicados). Un grupo de investigadores de la UNAM clonaron, expresaron, caracterizaron y obtuvieron la estructura cristalográfica de la enzima (13,14). Mercado-Besserer y cols analizaron los datos y observaron que la enzima tiene un ácido glutámico oculto al solvente. Dada su localización, el ácido glutámico debería ejercer una acción desestabilizante, por tanto se modificó genéticamente por una glutamina y se determinó el efecto de la mutación en algunas características de la enzima. Se encontró que la termoestabilidad de la mutante era cerca de 20° C superior a la de la enzima silvestre. El resultado era el esperado; la eliminación de un factor desestabilizante aumentó la estabilidad de la proteína. Sin embargo, los investigadores también observaron que la k_{cat} y la

Km de la enzima mutante fueron similares a las de la enzima nativa. Por lo tanto los datos indican que, cuando menos en este caso, los cambios en la estabilidad global de una enzima no se relacionan con la capacidad de la enzima para sufrir los arreglos conformacionales que se requieren en la catálisis.

Conclusiones y perspectivas

Todo lo anterior indica que aún hay mucho que aprender sobre la relación entre la estructura y función de las enzimas. Sin embargo, es importante reconocer que los datos que se han obtenido con organismos de distintos nichos y con enzimas en medios de bajo contenido de agua indican fuertemente que existe una relación muy estrecha entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. De esta manera, la pregunta que surge es ¿se pueden explicar la catálisis enzimática, la flexibilidad y la estabilidad de las enzimas en términos moleculares precisos? En opinión del autor, la respuesta es no... aún. Es cierto que los mecanismos químicos por los cuales se lleva a cabo la transformación de un sustrato en producto son razonablemente claros para muchas enzimas. Sin embargo, aún se desconoce en gran parte como los eventos en el sitio catalítico se relacionan con los cambios conformacionales que ocurren en otros lugares de las enzimas. La flexibilidad de las enzimas aún presenta muchas incógnitas. Esto se debe principalmente a que es difícil medir la flexibilidad global de una proteína o la de determinadas regiones o residuos de las enzimas. Sin embargo, la técnicas en que se mide intercambio de hidrógeno por deuterio se ven prometedoras (ver Fig. 4 en ref. 15). La estabilidad es otro parámetro difícil de medir. Es cierto que la estabilidad global de una proteína en términos de ΔG es cuantificable, pero la estabilidad de regiones específicas de las enzimas aún no se puede medir fácilmente. En este punto, sin embargo, existen estudios interesantes en que por medidas de accesibilidad de una sonda que reacciona con residuos específicos de una proteína, se pueden hacer inferencias de la estabilidad de la región en la que encuentra el residuo (16).

Antes de terminar, es tal vez apropiado señalar que el nivel de complejidad de las enzimas es alto y conforme aumenta el conocimiento sobre las mismas, su complejidad es cada vez más evidente. Ahora se sabe que la estructura global de las enzimas no es simplemente un punto de apoyo para los residuos catalíticos; todo indica que el resto de de la proteína también es parte importante de la catálisis. Por tanto, es necesario conocer con certeza como las regiones distantes al sitio catalítico participan en la expresión de la catálisis, y cuales son los factores que controlan la estabilidad y flexibilidad de las enzimas. De igual importancia es definir en forma precisa como es que una proteína adquiere su estructura tridimensional. Ciertamente que únicamente con esta información se podrá pasar a la siguiente etapa de la enzimología: fabricar enzimas que sean diferentes a las que nos heredó la evolución. Por ejemplo, enzimas que catalicen la transformación de los sustratos a los productos que se deseen, o que sean termoestables, o que funcionen en condiciones industriales drásticas, o que trabajen en medios no acuosos. Ciertamente que esta parte de la historia apenas comienza.

Referencias

1. Goodsell, D. S. y Olson, A. J. (2000) Structural symmetry and protein function *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 105-153.
2. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181, 223-230.

3. Levinthal, C. (1969) How to fold graciously en Mossbauer spectroscopy in biological systems, Proceedings of a Meeting in Allerton House, Monticello, Ill (Ed. P. de Brunner, J. C. M. Tsibris, y E. Munck, University of Illinois Press, Urbana. Citado por Honig, B. (1999) Protein folding: from the Levinthal parados to structure prediction. J. Mol. Biol. 293,283-293.
4. Ofra, Y. y Rost, B. (2003) Analysing six types pf protein-protein interfaces, J. Mol. Biol. 325, 377-387.
5. Xue, Q. F. y Yeung, E. S. (1995) Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme Nature 373, 681-683.
6. Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, J., y Petsko, G. A. (1998) Adjustments of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins Proc. Nat. Acad. Sic. USA. 95, 7406-7411.
7. Najera, H., Costas, M., y Fernández-Velasco, D. A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of an enzyme Biochem. J. 370, 785-792.
8. Jaenicke, R. y Bohm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments Curr. Op. in Struct. Biol. 8, 738-748.
9. Irun, M. P., Maldonado, S y Sancho, J. (2001) Stabilization of apoflavodoxin by replacing hydrogen-bonded charged Asp or Glu residues by the neutral isosteric Asn or Gln Prot. Eng 14, 173-181.
10. Petsko, G. A. (2001) Structural basis of thermostability in hyperthermophilic bacteria, or "There is more than one way to skin a cat" Meth. Enzymol 469,-478.
11. Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Puyou, A. (1990) Enzyme catalysis in organic solvents with low water content at high temperatures. The adenosinetriphosphatase of submitochondrial particles. Biochemistry 29, 751-758,.
12. Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1998) Enzymes in low water systems Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 33, 53-89.
13. Landa, A., Rojo-Domínguez, A., Jiménez, L. Y Fernández-Velasco, D. A. (1997) Sequencing, expresion and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem. 247, 348-355.
14. Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. y Fernández-Velasco, D. A. (2002) Structure and Inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica* J. Mol. Biol. 322, 669-675.
15. Fields, P. A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility Comp. Biochem. Physiol. Part A. 129, 417-431
16. Silverman, J. A. y Harbury, P. B. (2002) The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha) 8 barrel. J. Mol. Biol. 324, 1031-1040.

Semblanza del Dr. Armando Gómez-Puyou.



Nació en San Luis Potosí, México. Estudió la carrera de médico cirujano en la Facultad de Medicina de la UNAM, y posteriormente realizó sus estudios de doctorado en bioquímica, en la Facultad de Química de la misma Universidad. Toda su carrera la ha consagrado a la investigación, la cual inició como profesor-investigador en el Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM; después como investigador en el Instituto de Biología, el CINVESTAV y actualmente, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se desempeña como investigador emérito. Ha sido profesor visitante en varias Universidades, entre las que podemos mencionar, la Johns Hopkins University, en Baltimore; el Instituto Federal Suizo de Tecnología (Eidgenössische Technische Hochschule), en Zurich; el Instituto Nencki de Biología Experimental, en Varsovia; el Laboratorio Arrhenius de la Universidad de Estocolmo; la Universidad Estadual de Campinas, y las Universidades Federal de Paraná y Río de Janeiro. Así mismo, ha impartido numerosas conferencias por invitación en diversas Universidades y Congresos de su especialidad.

Es interesante hacer notar, que su primera trabajo de investigación, lo publicó tres años antes de graduarse como médico cirujano, y actualmente suma más de 150 publicaciones en revistas especializadas.

Ha recibido numerosos reconocimientos: la beca Guggenheim; el premio de la Industria Nacional Químico-Farmacéutica, 1975; el premio Universidad Nacional en 1989, la designación como investigador emérito por el Sistema Nacional de Investigadores, en 1994, y por la Universidad Nacional en 1995. Su último reconocimiento, lo recibió este mismo año, al ser designado como Forjador de la Ciencia en México.

Su línea actual de investigación se centra en el desarrollo de nuevos fármacos diseñados específicamente para curar el mal de Chagas, frecuente en Latinoamérica, y la enfermedad del sueño, recurrente en Africa.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

MICROARREGLOS DE DNA

Jorge Ramírez, Lorena Chávez, José Luis Santillán y Simón Guzmán
Unidad de Microarreglos de DNA, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Apdo.Postal 70-242; México D.F.
04510 México, Tel: 56225753.

jramirez@ifisiol.unam.mx

<http://smcg.cifn.unam.mx/MicroarreglosDNA-IFC/index.html>

Introducción

¿Microarreglos de DNA? La mejor definición para esta pregunta es: un conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie (10,000 muestras por cm^2). Los microarreglos de DNA son una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas. Posiblemente es una de las aplicaciones más importantes para la información obtenida de la secuenciación sistemática de los genomas completos.

No hace muchos años, la mayoría de los investigadores interesados en observar cambios en los niveles de expresión de los genes, tenían que estudiarlos uno por uno. Actualmente con la tecnología de los microarreglos diseñada por Brown P.O. y Botstein D. en 1999, es posible hacer preguntas a todos los genes de un organismo determinado, en un solo experimento. En este documento trataremos de explicar, cómo se fabrican los microarreglos, cómo se procesan en el laboratorio, cómo se obtienen los resultados de ellos y finalmente cómo se analizan.

Bibliotecas genómicas.

Con la secuenciación sistemática de los genomas completos y los avances en la síntesis artificial de DNA, ya sea por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polimerase Chain Reaction) o la síntesis química de desoxiligonucleotidos, actualmente es posible obtener en el laboratorio el genoma completo de un organismo, generando cada uno de los marcos de lectura abierta (ORF) completos o fragmentos de cada uno de ellos.

Actualmente se pueden adquirir las colecciones completas de los genes de varios organismos como: Humano, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli*, por mencionar algunas.

Por lo general estas bibliotecas se depositan en microplacas de 384 pozos, en donde podemos conocer la ubicación exacta de cada uno de los genes. La información sobre los genomas completos y las bibliotecas comerciales, se puede consultar en Internet, (por ejemplo: <http://www.yeastgenome.org/>).

Impresión de microarreglos.

En la actualidad existen varios tipos de impresores para los microarreglos y los podemos separar en dos clases principales: los de contacto, que como su nombre lo indica, deposita las muestras haciendo contacto con la superficie y los piezoeléctricos en los que un aplicador ultrasónico deposita la muestra, aunque estos últimos son tecnologías muy recientes y no abundaremos en ellos. También existe otro procedimiento para la impresión de microarreglos y es el de la síntesis de DNA directamente sobre la superficie.

Los impresores de contacto, son los más económicos; su uso es relativamente sencillo y no se requiere una gran infraestructura para fabricar microarreglos de DNA con estos equipos. Básicamente se trata de un brazo robótico con movimiento en los ejes X, Y y Z y su característica más importante es, poderse desplazar en cualquiera de estas direcciones con una resolución de una décima de milímetro. Existen dos tipos de estos robots: los primeros y más sencillos en los que una superficie conteniendo las laminillas sobre las que se va a imprimir, se desplaza en los ejes (X, Y) y la cabeza con los aplicadores sube y baja en el eje Z depositando la muestra sobre la laminilla (Figura 1). En el otro tipo de robots las laminillas permanecen estáticas y un brazo mecánico se desplaza en los tres ejes aplicando las muestras (Figura 2). Los robots impresores de contacto cuentan con una cabeza en la que se pueden colocar de 1 a 48 aplicadores. (Figura 3). Los aplicadores, son pequeñas agujas (Figura 4) con una ranura en la punta similar a la punta de una pluma fuente y al igual que en ésta, la muestra se toma y se deposita por capilaridad. Los aplicadores más comunes tienen una capacidad de 0.25 µl y pueden hacer al menos 100 aplicaciones, es decir 0.0025 µl por aplicación. También existen aplicadores con capacidad de hasta 300 aplicaciones y aplicadores sólidos, es decir sin ranura, y que pueden hacer hasta 10 aplicaciones.

Las superficies sobre las que se pueden imprimir los microarreglos de DNA son dos, las membranas de materiales como la nitrocelulosa o el nylon y las laminillas de vidrio o epóxico, semejantes a las que se utilizan para microscopía. Estas últimas son las más utilizadas, ya que

permiten tener un mejor control sobre el diámetro de las aplicaciones y la distancia entre ellas. Estas laminillas se pueden conseguir con diferentes recubrimientos como: poli-lisina, aminas y aldehídos, las cuales permiten la unión química del DNA con la superficie (Figura 5).

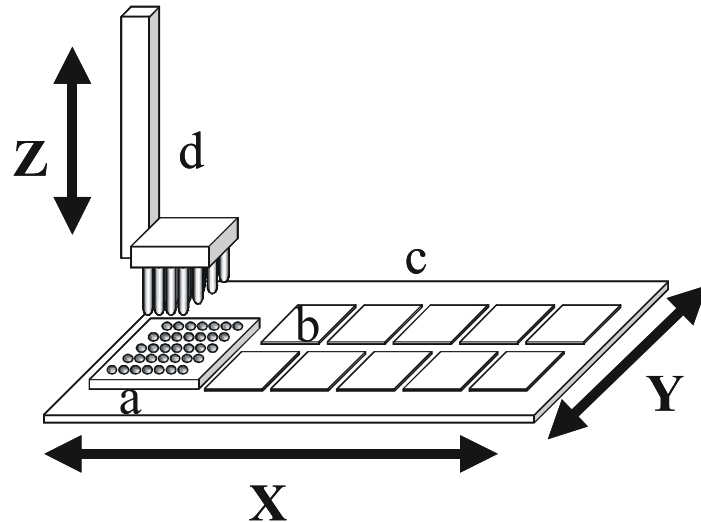


Figura 1. Diagrama de un impresor de microarreglos de contacto. En este tipo de robot la superficie (c) conteniendo la microplaca con las muestras (a) y las laminillas (b), se desplaza en las direcciones X y Y, mientras que la cabeza con los aplicadores (d) sube y baja, depositando las muestras, siguiendo el eje Z.

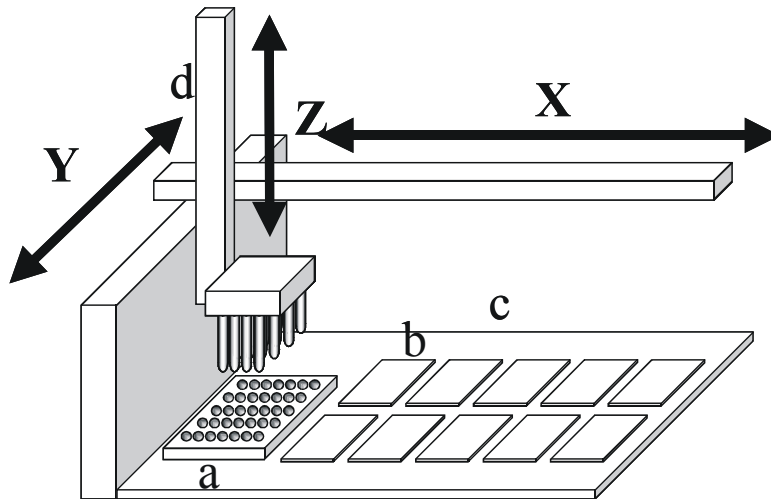


Figura 2. Diagrama de un impresor de microarreglos de contacto. En este tipo de robot la superficie (c) conteniendo la microplaca con las muestras (a) y las laminillas (b) es fija, mientras que la cabeza con los aplicadores (d) es un brazo mecánico con movimiento en las tres direcciones (X, Y y Z).

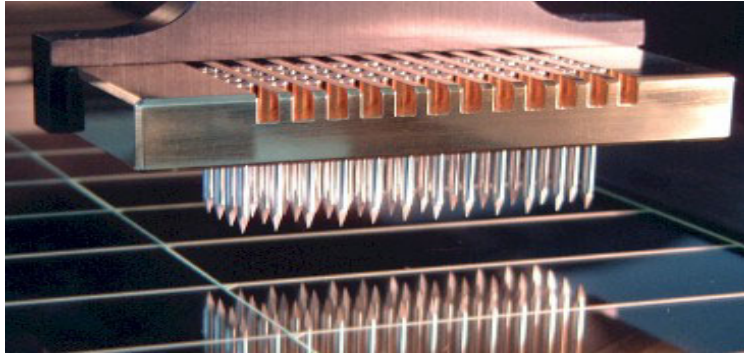


Figura 3. Fotografía de la cabeza, los aplicadores y las laminillas en un robot como el que se muestra en la figura 2.

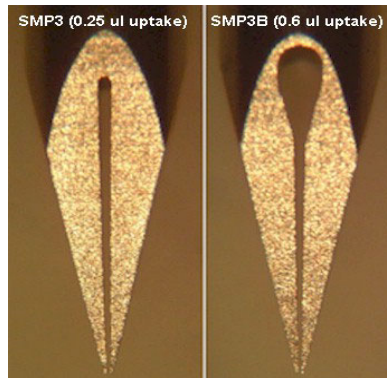


Figura 4. Micrografía de la punta de dos tipos de aplicadores. A la izquierda se muestra un aplicador con capacidad para 100 aplicaciones y a la derecha el de mayor capacidad.

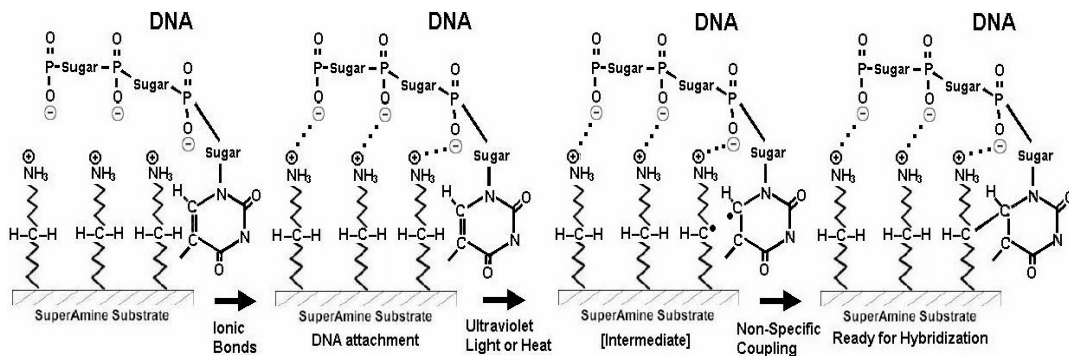


Figura 5. Ejemplo de la superficie sobre la que se pueden imprimir los microarreglos y del mecanismo para el entrecruzamiento del DNA a la laminilla.

Para la impresión de los microarreglos es importante tomar en cuenta los siguientes aspectos: de la biblioteca genómica que se desea imprimir se debe tener la mayor cantidad de información de cada gen y esta información tiene que estar ordenada en una base de datos; el DNA que se va a imprimir, debe tener la misma calidad que se requiere cuando se va a secuenciar; la cantidad de DNA de cada muestra debe ser la misma y en una solución con un contenido específico de sales. También se deben controlar la humedad y la temperatura.

Una vez impresas las laminillas, el DNA debe ser fijado a la superficie. Esto se puede lograr horneando los microarreglos a 80°C por cuatro horas o con un entrecruzador de luz ultravioleta. Adicionalmente se delimita la región donde se encuentra el microarreglo y se identifica cada laminilla, ya sea con un código de barras o un número de serie.

Obtener el equipo, contar con las bibliotecas genómicas ordenadas y establecer las condiciones para la impresión de microarreglos; requiere de una gran cantidad de recursos económicos y tiempo. Por ello es recomendable obtener los microarreglos ya elaborados. Existen diversas compañías que comercializan microarreglos y en la UNAM se cuenta con una unidad de microarreglos de DNA, creada para ofrecer a la comunidad científica y tecnológica del país, servicios de impresión de microarreglos, marcado de sondas, lectura de microarreglos y cuantificación de los mismos.

Obtención de RNA

El aislamiento del RNA para su utilización en microarreglos, no difiere de los protocolos habituales para purificar RNA total. Solo se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: obtenerlo lo más concentrado posible; que la banda ribosomal grande sea al menos dos veces más que la banda pequeña (esta relación nos permite tener una idea de la integridad del mRNA); se requieren al menos 30µg de RNA total para realizar un experimento; no se requiere aislar el RNA mensajero y puede no ser importante la presencia de DNA genómico. En cuanto a los métodos para purificar RNA se puede consultar los reportados, aunque es recomendable utilizar kits comerciales y consultar con colegas que tengan experiencia en el aislamiento de RNA. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de RNA total de levadura con las características mencionadas.

Marcado del RNA

Para el marcado del RNA (sonda) se utiliza la síntesis *in vitro* de cDNA de cadena sencilla. En los métodos más comunes; se coloca el RNA total junto con un deoxiligonucleótido poli T y un conjunto de hexámeros al azar, permitiendo que reconozcan sus sitios en el RNA mensajero. Posteriormente se agregan los deoxinucleótidos A, C, G y T, más una proporción de deoxinucleótido T marcado con una molécula fluorescente (comercialmente se pueden obtener dUTP-Cy3, dUTP-Cy5, dUTP-alexa3 y dUTP-alexa5; también se pueden obtener los mismos fluoróforos unidos a dCTP). A la mezcla se agrega transcriptasa inversa que sintetiza el cDNA a partir del mRNA, incorporando el deoxinucleótido T marcado en dos reacciones estándar. Finalmente el cDNA marcado se purifica para eliminar el deoxinucleótido fluorescente no incorporado al cDNA y se tiene la sonda marcada, lista para probarla en un microarreglo. En la Figura 7 se muestra un gel de electroforesis en el que se corrieron RNA total y RNA mensajero, marcados con los fluoróforos descritos.

Hibridización de los microarreglos

La hibridización de un microarreglo no difiere significativamente de las condiciones que comúnmente se utilizan para un experimento tipo Southern o Northern, dependiendo del experimento, se fijará la temperatura y la astringencia de la solución de hibridización. Las diferencias más importantes entre una hibridización tipo Southern o Northern y una en microarreglos son: que el volumen de hibridización no es mayor a 50 μ l, no se requiere agitación y en un microarreglo se prueban dos condiciones o sondas simultáneamente, es decir se compara la condición control, contra la experimental en el mismo experimento.

El procedimiento consiste en aplicar la solución de hibridización con las sondas sobre la laminilla y cubrirla con un cubreobjetos para permitir que la solución cubra todo el microarreglo de igual forma que se hace una preparación para microscopía. Como se podrán imaginar, la reacción es capilar y por eso requiere de muy poco volumen. Sin embargo es importante señalar que se debe tener cuidado con la evaporación. Para evitar que esto suceda, los microarreglos se colocan en cámaras húmedas diseñadas para estos propósitos (Figura 8).

Al igual que la hibridización, el lavado de un microarreglo utiliza las mismas reglas de temperatura y astringencia que se siguen en los experimentos tipo Southern o Northern, con una pequeña diferencia que es, el secado de las laminillas. Para secar las laminillas es recomendable utilizar la centrifugación ya que cualquier residuo de sales por evaporación puede afectar la lectura.

Lectura de microarreglos

Existen dos tipos de lectores de microarreglos: los lectores con cámaras digitales y los lectores confocales. En los lectores con cámaras digitales se registra la imagen fluorescente como si se tomara una fotografía común, mientras que en los lectores confocales se hace una reconstrucción de la imagen utilizando los principios de la microscopía confocal, que consiste en la utilización de fotomultiplicadores para registrar la señal. Estos últimos son posiblemente los mejores lectores para microarreglos; ya que permiten obtener una imagen de muy alta resolución, factor determinante en la obtención de resultados; desafortunadamente estos lectores son muy costosos.

En ambos tipos de lectores se utiliza un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al cDNA y poder obtener la imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo. Este procedimiento se hace para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Cy3 (rojo) y una para el fluoróforo Cy5 (verde) (Figura 9). Para la obtención de estas imágenes se debe ajustar la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores, de tal forma que ambas imágenes den valores semejantes de fluorescencia total. Comúnmente para lograr esto, en los microarreglos se colocan controles o marcadores que se utilizan para ajustar la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos. Una vez obtenidas estas imágenes, pueden ser combinadas para obtener un aspecto visual del microarreglo. En la figura 10 se muestra un ejemplo, en el que podemos observar puntos amarillos, verdes, rojos y un sin número de tonalidades entre el verde y el rojo. Si para este experimento se marcó la muestra experimental en rojo y la control en verde, todos aquellos puntos que se ven rojos o tonalidades anaranjadas, pueden ser interpretados como genes que aumentaron su expresión.

Los puntos verdes o tonalidades entre el amarillo y el verde serán aquellos genes que disminuyeron su expresión. Y finalmente los puntos amarillos representan a los genes que en ambas condiciones se expresan de igual forma.

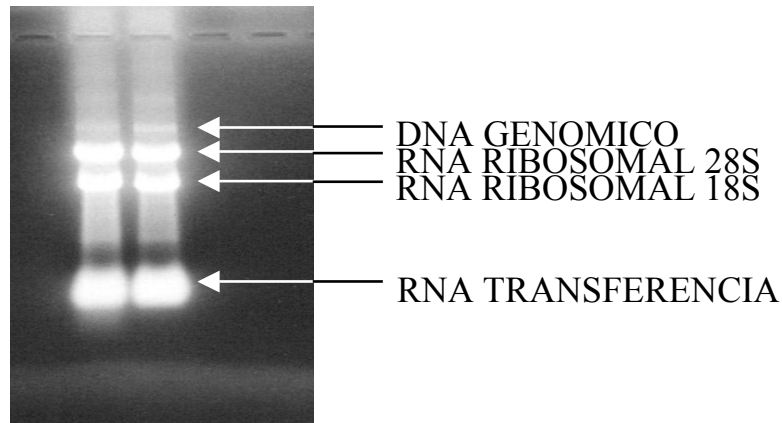


Figura 6. Fotografía de RNA total de levadura, corrido en un gel desnaturalizante de agarosa 1%.

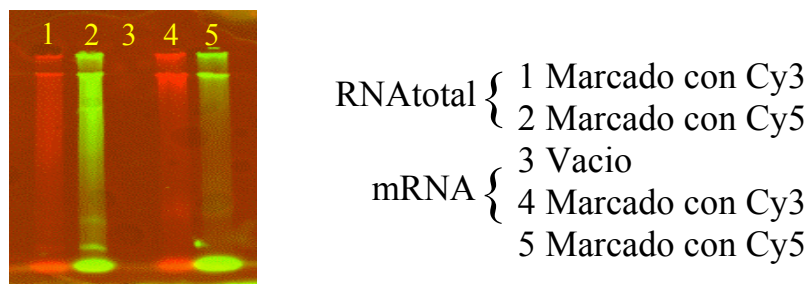


Figura 7. Imagen de fluorescencia de las sondas marcadas con los fluoróforos Cy3 rojo y Cy5 verde, corridas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida de 12.5%.



Figura 8. Fotografía de una cámara de hibridización para microarreglos.

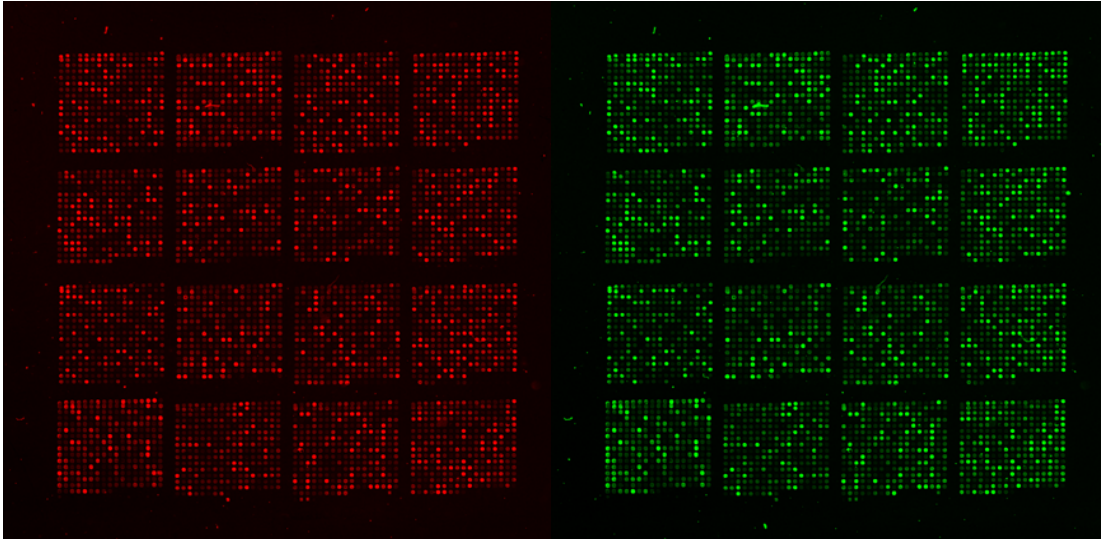


Figura 9. Imagen de fluorescencia para un microarreglo hibridizado con una sonda marcada con dUTP-Cy3 (rojo) y una sonda marcada con dUTP-Cy5 (verde).

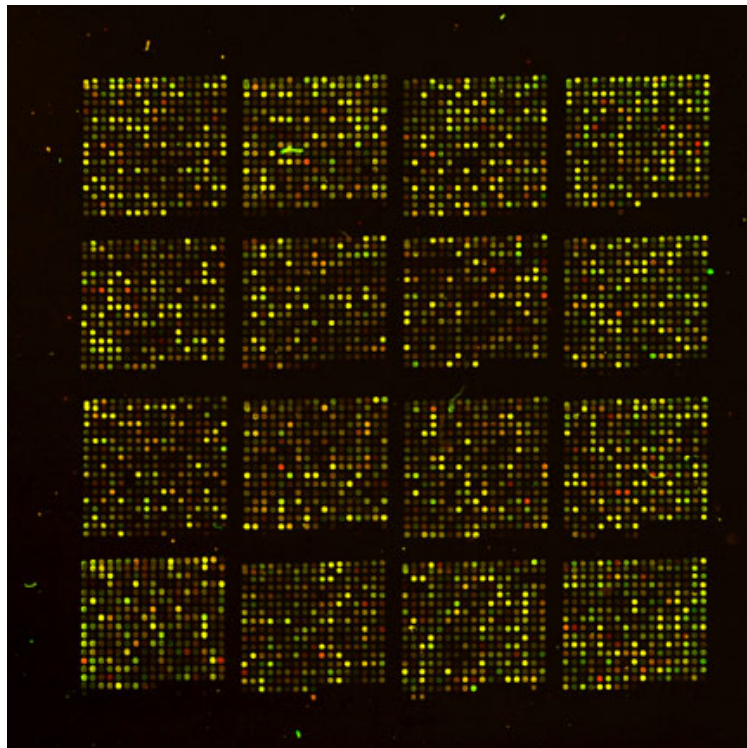


Figura 10. Imagen combinada de las imágenes de la figura 9.

Cuantificación de microarreglos

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se requiere del análisis de las imágenes. Comercialmente se pueden adquirir programas de computo para estos fines, también se les puede encontrar en sitios de software libre (por ejemplo: <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). En la mayoría de estos programas existen una serie de pasos básicos para la interpretación de estas imágenes.

En primer lugar se debe considerar la aplicación de un filtro para depurar la imagen de pequeñas imperfecciones o señales no deseadas que pudieran encontrarse entre las muestras. Posteriormente se genera una retícula en la que se definen las áreas que se van a cuantificar (Figura 11). Definida la retícula, se determina una zona de exclusión y el área para calcular la señal de fondo de la imagen (recuadro en la figura 11). Definidos estos parámetros el programa calcula la densidad de los pixeles en cada área definida, dando como resultado una tabla con las coordenadas, los valores de densidad, fondo y señal para cada una de las muestras en el microarreglo (Tabla 1). Esta información es complementada con las bases de datos en donde se tiene el nombre del gen, su función, la vía metabólica a la que pertenece, ubicación celular, etc. (Tabla 2).

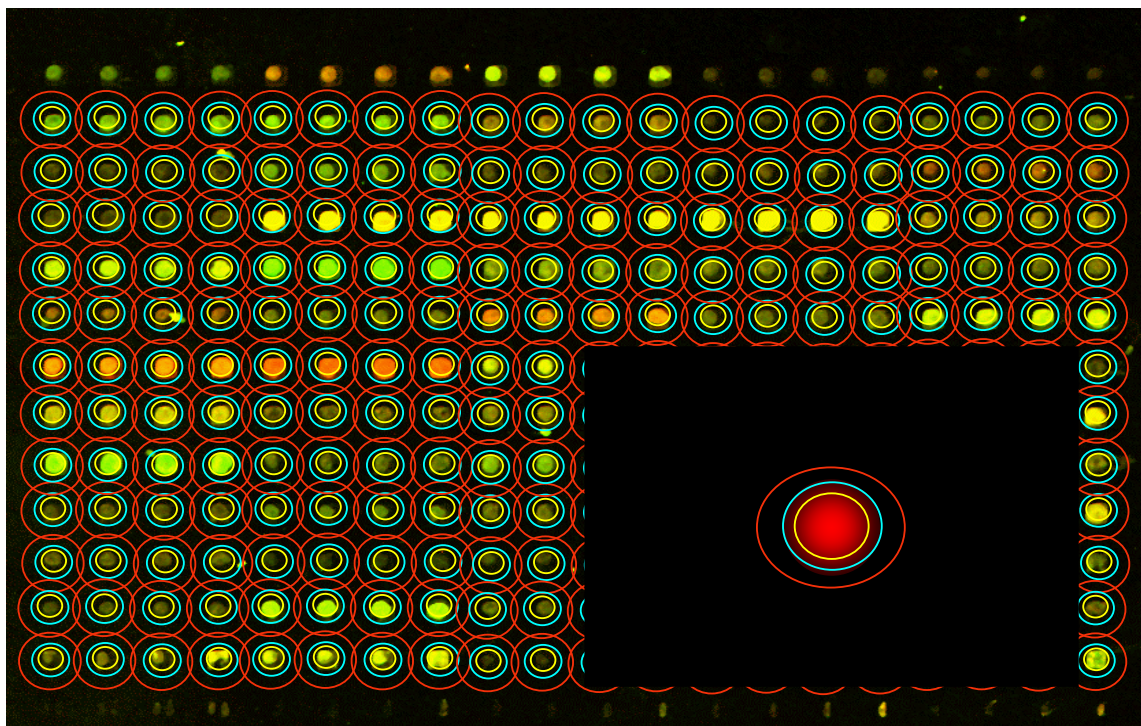


Figura 11. Cuantificación de la señal de un microarreglo, definición y ajuste de la retícula. En el recuadro dentro del círculo amarillo, está la zona para obtener la densidad real, entre el círculo amarillo y el azul está la zona no considerada y entre el círculo azul y el rojo la zona para determinar la señal de fondo.

Tabla I. Resultados obtenidos de la cuantificación de una imagen de microarreglos

Macro-renglón	Macro-columna	Renglón	Columna	Densidad Cy3	Densidad Cy5	Fondo Cy3	Fondo Cy5
1	1	1	1	401.875	416.107143	245.62264	272.59434
1	1	1	2	456.910714	408.553571	224.24528	263.29245
1	1	1	3	453.232143	455.821429	270.4434	266.21698
1	1	1	4	1112.964286	966	274.51887	243.40566
1	1	1	5	1325.625	1042.098214	266.72642	277.5566
1	1	1	6	1345.776786	1175.964286	275.70755	303.51887
1	1	1	7	669.839286	694.991071	269.89623	307.70755
1	1	1	8	660.053571	603.4375	268.79245	297.58491
1	1	1	9	742.758929	788.294643	256.63208	288.91509
1	1	1	10	552.946429	549.758929	255.63208	248.63208

Tabla II. Descripción existente para cada uno de los genes en el microarreglo.

MR	MC	R	C	ORF	biological_process	molecular_function	Chr
1	1	1	1	YBR042C	biological_process unknown	molecular_function unknown	II
1	1	1	2	YBR042C	biological_process unknown	molecular_function unknown	II
1	1	1	3	YBR018C	galactose metabolism	UTP-hexose-1-phosphate	II
1	1	1	4	YBR018C	galactose metabolism	UTP-hexose-1-phosphate	II
1	1	1	5	YBL108W	biological_process unknown	molecular_function unknown	II
1	1	1	6	YBL108W	biological_process unknown	molecular_function unknown	II
1	1	1	7	YBL088C	telomerase-dependent	inositol/phosphatidylinositol kinase	II
1	1	1	8	YBL088C	telomerase-dependent	inositol/phosphatidylinositol kinase	II
1	1	1	9	YBR040W	cellular morphogenesis	molecular_function unknown	II
1	1	1	10	YBR040W	cellular morphogenesis	molecular_function unknown	II

Nota. En ambas tablas, las primeras cuatro columnas corresponden a las coordenadas de cada gen en el microarreglo y estas coordenadas nos permiten relacionar ambas tablas.

Interpretación de los resultados

Para la interpretación de estos resultados se requiere del análisis estadísticos, los cuales pueden ser realizados con programas comerciales o libres. Básicamente se trata de discriminar entre los miles de datos que se obtienen, aquellos que son significativos y que representan un cambio real. También se existen programas que permiten agrupar a los genes ya sea por su nivel de expresión, función, estructura, etc. Estos procedimientos estadísticos y de agrupamiento es lo que actualmente se conoce como bioinformática.

En la actualidad existen pocos lugares donde se pueda obtener formación académica en bioinformática y México no es la excepción. Un reto que enfrentará todo aquel investigador que realice experimentos con microarreglos será aprender esta nueva rama del conocimiento en biología.

Ejemplo del uso de los microarreglos de DNA

Tomemos como ejemplo un estudio con microarreglos de cáncer cérvico uterino. De una paciente con diagnóstico de cáncer cérvico uterino se obtuvo un fragmento de biopsia fresca y sin incluir en parafina. También se consiguió una muestra de la misma región de tejido de una paciente sana (de cadáver) manteniendo las mismas condiciones para ambas muestras. De las muestras se aisló el RNA total y se marco (comúnmente se marca la sonda control con el fluoróforo Cy5 y la experimental con Cy3). Ambas sondas marcadas, se juntaron y se hibridizó un microarreglo con 10,000 de los genes mejor identificados en el humano. De la lectura de este microarreglo se obtuvieron las imágenes (Figura 12) y se cuantificó la señal de fluorescencia para cada sonda. Con los datos obtenidos se obtuvo la grafica de fluorescencia (Figura 13) donde podemos comprobar que los valores de fluorescencia son simétricos, lo que significa que tanto la reacción de marcado así como la hibridización y la lectura del microarreglos son correctos.

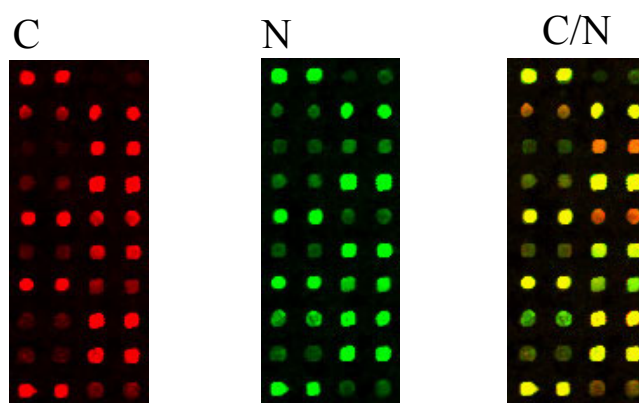


Figura 12. Se muestra un fragmento del microarreglo hibridizado, en donde vemos la señal de fluorescencia de Cy3 (rojo) para el RNA de la biopsia del paciente enfermo (C); la señal de fluorescencia de Cy5 (verde) para el RNA sin cáncer (N) y la combinación de ambas imágenes para ver la relación (C/N). A estas imágenes se hizo el procedimiento previamente descrito para obtener los valores numéricos.

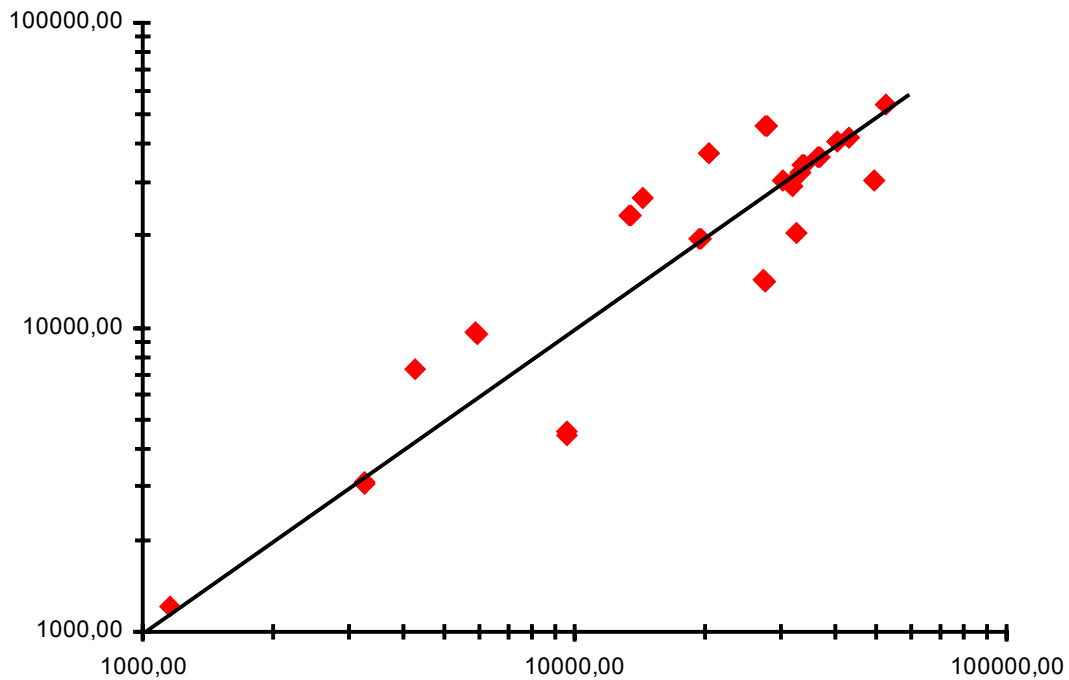


Figura 13. Grafica del logaritmo de la señal "N" eje X contra la señal "C" eje Y. Se observa que ambas señales se ajustan a una recta con un coeficiente de 0.9986, lo que indica un buen marcado, hibridación y lectura.

Una vez que se verificó el marcado, hibridación y lectura, se procedió a obtener los valores de fluorescencia para cada uno de los genes contenidos en el microarreglo. En la Tabla 3 se muestran los genes que se localizan en el fragmento que se va a analizar.

A partir de los valores de densidad y fondo (Tabla 4), se definieron dos nuevas columnas en donde se obtuvo el cociente entre la densidad y el fondo respectivamente. Estos valores nos permiten ver si los datos de señal que estamos obteniendo, son significativos.

Para este experimento, el cociente de la fluorescencia promedio contra el fondo promedio es de 6.98, luego entonces todos los valores para las relaciones (Den/Bck) deben ser mayores o iguales a 6.98 para ser considerados como significativos.

Tabla 3. Posición y descripción de cada uno de los genes analizados en este fragmento del microarreglo.

Row	Colum	Gene Function
1	1	tata box binding protein tbp-associated factor rna polymerase ii h 30kd; taf2h
1	2	tata box binding protein tbp-associated factor rna polymerase ii h 30kd; taf2h
1	3	core promoter element binding protein; copeb
1	4	core promoter element binding protein; copeb
2	1	midkine neurite growth-promoting factor 2; mdk
2	2	midkine neurite growth-promoting factor 2; mdk
2	3	internexin neuronal intermediate filament protein alpha; ina
2	4	internexin neuronal intermediate filament protein alpha; ina
3	1	nasopharyngeal epithelium specific protein nesg1.
3	2	nasopharyngeal epithelium specific protein nesg1.
3	3	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1; tiam1
3	4	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1; tiam1
4	1	transducin-like enhancer of split esp1 homolog drosophila; tle2
4	2	transducin-like enhancer of split esp1 homolog drosophila; tle2
4	3	transglutaminase prostate; tgm4
4	4	transglutaminase prostate; tgm4
5	1	Far upstream element-binding protein; fubp1
5	2	Far upstream element-binding protein; fubp1
5	3	nuclear mitotic apparatus protein 1; numa1
5	4	nuclear mitotic apparatus protein 1; numa1
6	1	chromosome condensation 1; chc1
6	2	chromosome condensation 1; chc1
6	3	transforming growth factor beta receptor ii 70-80kd; tgfr2
6	4	transforming growth factor beta receptor ii 70-80kd; tgfr2
7	1	angiotensin i; agt
7	2	angiotensin i; agt
7	3	ankyrin-like protein 1; anktm1
7	4	ankyrin-like protein 1; anktm1
8	1	fibroblast growth factor receptor 4 isoform 2; fgfr4
8	2	fibroblast growth factor receptor 4 isoform 2; fgfr4
8	3	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-8; adamts8
8	4	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-8; adamts8
9	1	guanine nucleotide binding protein g alpha 12; gna12
9	2	guanine nucleotide binding protein g alpha 12; gna12
9	3	estradiol 17 beta-dehydrogenase 3; hsd17b3
9	4	estradiol 17 beta-dehydrogenase 3; hsd17b3
10	1	hypothetical protein flj11160; flj11160
10	2	hypothetical protein flj11160; flj11160
10	3	solute carrier family 4 sodium bicarbonate cotransporter member 7; slc4a7
10	4	solute carrier family 4 sodium bicarbonate cotransporter member 7; slc4a7

Tabla 4. Valores obtenidos de la cuantificación del microarreglo. Las columnas muestran: densidad (Den) y fondo (Bck), para cada una de las imágenes obtenidas.

Row	Colum	Den "C"	Den "N"	Bck "C"	Bck "N"
1	1	37254.47	36520.06	427.63	507.25
1	2	36984.06	36819.11	430.01	501.18
1	3	1516.23	1618.54	365.14	410.67
1	4	4628.32	7734.03	360.69	403.30
2	1	27954.15	14460.36	461.50	335.87
2	2	27707.81	14585.53	461.50	335.87
2	3	43308.49	42290.43	345.96	332.12
2	4	43454.32	42154.34	354.60	323.19
3	1	14050.25	23816.10	475.06	532.32
3	2	13909.43	23766.45	488.58	520.21
3	3	32914.65	20901.05	377.42	380.19
3	4	33157.36	20891.16	380.25	386.26
4	1	14635.07	27186.54	317.89	440.97
4	2	14753.06	27201.71	318.85	443.68
4	3	53079.49	54542.79	542.55	582.04
4	4	52968.20	54398.86	540.08	583.19
5	1	41215.58	41300.45	630.98	415.03
5	2	41329.66	41311.00	636.12	416.28
5	3	50100.50	31062.06	450.78	531.68
5	4	49978.34	30997.69	448.98	539.70
6	1	3718.98	3616.45	442.15	491.02
6	2	3686.94	3522.56	439.31	483.47
6	3	20019.00	19989.90	461.03	459.98
6	4	19899.15	20080.03	455.18	462.15
7	1	30845.67	31009.87	375.60	460.16
7	2	30684.14	30934.32	373.56	457.71
7	3	28182.57	46246.12	382.86	661.01
7	4	27997.68	46370.65	387.98	639.54
8	1	20788.10	37460.25	388.75	364.59
8	2	20864.26	37816.63	373.89	335.87
8	3	31945.87	30025.42	380.25	443.97
8	4	32175.77	29524.59	387.81	476.39
9	1	6298.87	10114.02	380.25	539.68
9	2	6330.92	10097.12	393.55	622.37
9	3	33567.87	32698.79	400.09	564.35
9	4	33835.10	32766.00	416.35	575.23
10	1	34421.32	34516.65	456.78	478.95
10	2	34212.31	34418.69	425.69	459.35
10	3	10021.11	5065.74	389.50	545.86
10	4	9936.33	4973.08	390.92	543.69

Como podemos observar en la tabla 5, la mayoría de los resultados obtenidos son significativos con excepción de los datos obtenidos para la muestra localizada en el renglón 1 columna 3 cuyos valores son menores a la relación mínima.

Tabla 5. Estimación de resultados significativos, con rojo se indican los valores para la relación de "C" y con verde para la relación de "N"

Row	Colum	Den "C"	Den "N"	Bck "C"	Bck "N"	DenC/BckC	DenN/BckN
1	1	37254.47	36520.06	427.63	507.25	87.12	72.00
1	2	36984.06	36819.11	430.01	501.18	86.01	73.46
1	3	1516.23	1618.54	365.14	410.67	4.15	3.94
1	4	4628.32	7734.03	360.69	403.30	12.83	19.18
2	1	27954.15	14460.36	461.50	335.87	60.57	43.05
2	2	27707.81	14585.53	461.50	335.87	60.04	43.43
2	3	43308.49	42290.43	345.96	332.12	125.18	127.33
2	4	43454.32	42154.34	354.60	323.19	122.54	130.43
3	1	14050.25	23816.10	475.06	532.32	29.58	44.74
3	2	13909.43	23766.45	488.58	520.21	28.47	45.69
3	3	32914.65	20901.05	377.42	380.19	87.21	54.98
3	4	33157.36	20891.16	380.25	386.26	87.20	54.09
4	1	14635.07	27186.54	317.89	440.97	46.04	61.65
4	2	14753.06	27201.71	318.85	443.68	46.27	61.31
4	3	53079.49	54542.79	542.55	582.04	97.83	93.71
4	4	52968.20	54398.86	540.08	583.19	98.07	93.28
5	1	41215.58	41300.45	630.98	415.03	65.32	99.51
5	2	41329.66	41311.00	636.12	416.28	64.97	99.24
5	3	50100.50	31062.06	450.78	531.68	111.14	58.42
5	4	49978.34	30997.69	448.98	539.70	111.32	57.44
6	1	3718.98	3616.45	442.15	491.02	8.41	7.37
6	2	3686.94	3522.56	439.31	483.47	8.39	7.29
6	3	20019.00	19989.90	461.03	459.98	43.42	43.46
6	4	19899.15	20080.03	455.18	462.15	43.72	43.45
7	1	30845.67	31009.87	375.60	460.16	82.12	67.39
7	2	30684.14	30934.32	373.56	457.71	82.14	67.59
7	3	28182.57	46246.12	382.86	661.01	73.61	69.96
7	4	27997.68	46370.65	387.98	639.54	72.16	72.51
8	1	20788.10	37460.25	388.75	364.59	53.47	102.75
8	2	20864.26	37816.63	373.89	335.87	55.80	112.59
8	3	31945.87	30025.42	380.25	443.97	84.01	67.63
8	4	32175.77	29524.59	387.81	476.39	82.97	61.98
9	1	6298.87	10114.02	380.25	539.68	16.57	18.74
9	2	6330.92	10097.12	393.55	622.37	16.09	16.22
9	3	33567.87	32698.79	400.09	564.35	83.90	57.94
9	4	33835.10	32766.00	416.35	575.23	81.27	56.96
10	1	34421.32	34516.65	456.78	478.95	75.36	72.07
10	2	34212.31	34418.69	425.69	459.35	80.37	74.93
10	3	10021.11	5065.74	389.50	545.86	25.73	9.28
10	4	9936.33	4973.08	390.92	543.69	25.42	9.15

En la Tabla 6, los valores de señal se obtienen de la resta numérica de la densidad menos el fondo de cada uno de los genes estudiados. Los valores de la relación se obtienen del cociente entre ambas señales. Finalmente de la relación de las señales se obtiene el logaritmo base 2 de cada una de ellas y se multiplica por 100, para la identificación de aquellos genes que aumentaron o disminuyeron su expresión, así como aquellos que no cambiaron. En la Tabla 6 se identificaron con rojo los genes que aumentaron mas de 10 unidades y con verde aquellos menores a -10 unidades.

Para garantizar que un gene aumentó o disminuyó su expresión, se deben tomar en cuenta que la relación de la densidad entre el fondo sea significativa y que el valor de 100 veces el logaritmo base 2 sea mayor a 10 unidades para los genes que aumentaron su expresión y menor a -10 unidades para los que disminuyeron. Esto resultados se pueden obtener definiendo las siguientes funciones lógicas: Si DenC/BckC es mayor o igual a 6.89 y $\text{Log}_2 \cdot 100$ de Sig es mayor o igual a 10, entonces es verdadero. En la columna "Up" de la Tabla 7, están marcados con rojo los genes que aumentaron su expresión y en qué dimensión. Si DenN/BckN es mayor o igual a 6.89 y $\text{Log}_2 \cdot 100$ de Sig es menor o igual a -10 entonces es verdadero. En la Tabla 7, la columna "Down" tiene marcados con verde genes que disminuyeron su expresión y en qué dimensión. También se pueden graficar el logaritmo base 10 de los resultados de los valores obtenidos de la relación C/N de la Tabla 6, columna "Ratio C/N", lo que nos dará una panorámica de nuestros resultados que podrá ser comparada con los resultados obtenidos de las funciones lógicas (Figura 14).

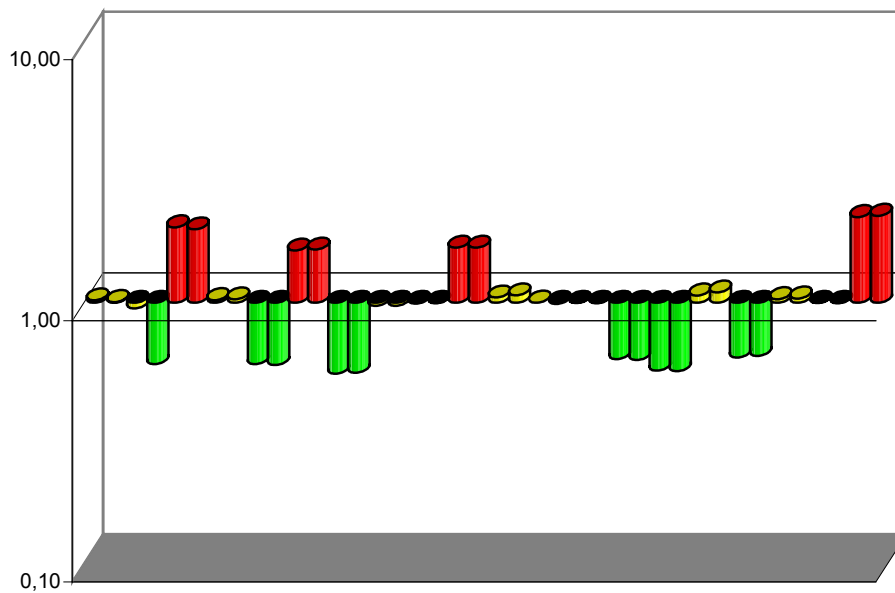


Figura 14. Grafica del logaritmo base 10 de los valores de relación obtenidos de la Tabla 6, columna "Ratio C/N". Los rojos indican posible aumento de expresión, los verdes disminución y los amarillos no cambio o cambios muy pequeños.

Tabla 6. Identificación de señales que aumentaron o disminuyeron entre ambas condiciones.

Row	Colum	DenC/BckC	DenN/BckN	Sig "C"	Sig "N"	Ratio C/N	Log2(C/N)*100
1	1	87.11804	71.99685	36826.84	36012.82	1.022604	3.224687
1	2	86.00744	73.46484	36554.05	36317.93	1.006501	0.934928
1	3	4.152462	3.941218	1151.09	1207.87	0.952992	-6.94646
1	4	12.83191	19.17678	4267.636	7330.731	0.582157	-78.052
2	1	60.57237	43.05371	27492.65	14124.49	1.946452	96.0847
2	2	60.0386	43.42639	27246.31	14249.66	1.912067	93.5133
2	3	125.1827	127.3338	42962.52	41958.31	1.023934	3.412235
2	4	122.5446	130.4321	43099.72	41831.15	1.030326	4.310084
3	1	29.57574	44.74019	13575.19	23283.78	0.583032	-77.8353
3	2	28.46936	45.68649	13420.85	23246.25	0.577334	-79.2521
3	3	87.20961	54.97528	32537.23	20520.86	1.585569	66.50002
3	4	87.19993	54.08515	32777.12	20504.89	1.598502	67.67209
4	1	46.03816	61.65168	14317.18	26745.57	0.53531	-90.1553
4	2	46.26975	61.30941	14434.22	26758.04	0.539435	-89.0479
4	3	97.83388	93.71006	52536.95	53960.75	0.973614	-3.85782
4	4	98.07473	93.27811	52428.12	53815.67	0.974217	-3.76855
5	1	65.31995	99.51196	40584.6	40885.42	0.992642	-1.06541
5	2	64.97122	99.23777	40693.54	40894.72	0.995081	-0.71147
5	3	111.1411	58.42256	49649.72	30530.39	1.626239	70.15397
5	4	111.3153	57.43504	49529.36	30457.99	1.626153	70.14632
6	1	8.411127	7.365179	3276.83	3125.43	1.048441	6.824614
6	2	8.392548	7.285966	3247.63	3039.087	1.06862	9.574953
6	3	43.42234	43.45819	19557.97	19529.92	1.001436	0.20706
6	4	43.71717	43.44906	19443.97	19617.88	0.991135	-1.2846
7	1	82.12372	67.38932	30470.07	30549.71	0.997393	-0.37659
7	2	82.14054	67.58535	30310.59	30476.62	0.994552	-0.7881
7	3	73.61093	69.96288	27799.71	45585.11	0.609842	-71.3493
7	4	72.16269	72.50625	27609.7	45731.11	0.60374	-72.8001
8	1	53.47487	102.745	20399.36	37095.66	0.549912	-86.2727
8	2	55.8032	112.5931	20490.37	37480.76	0.54669	-87.1204
8	3	84.01281	67.62939	31565.62	29581.45	1.067075	9.366132
8	4	82.9676	61.97609	31787.96	29048.2	1.094318	13.00315
9	1	16.56508	18.74077	5918.62	9574.34	0.618175	-69.3912
9	2	16.0868	16.22372	5937.368	9474.755	0.626651	-67.4265
9	3	83.9008	57.94062	33167.78	32134.44	1.032157	4.566212
9	4	81.2662	56.96192	33418.75	32190.77	1.038147	5.401073
10	1	75.35645	72.06733	33964.54	34037.7	0.997851	-0.31042
10	2	80.36932	74.92928	33786.62	33959.35	0.994914	-0.73565
10	3	25.72814	9.280292	9631.61	4519.88	2.130944	109.1493
10	4	25.41813	9.146934	9545.416	4429.396	2.155015	110.7698

Tabla 7. Definición de aumento o disminución en la expresión de los genes.

Row	Colum	DenC/BckC	DenN/BckN	Log2(C/N)*100	Up	Down
1	1	87.11804	71.99685	3.224687	FALSE	FALSE
1	2	86.00744	73.46484	0.934928	FALSE	FALSE
1	3	4.152462	3.941218	-6.94646	FALSE	FALSE
1	4	12.83191	19.17678	-78.052	FALSE	TRUE
2	1	60.57237	43.05371	96.0847	TRUE	FALSE
2	2	60.0386	43.42639	93.5133	TRUE	FALSE
2	3	125.1827	127.3338	3.412235	FALSE	FALSE
2	4	122.5446	130.4321	4.310084	FALSE	FALSE
3	1	29.57574	44.74019	-77.8353	FALSE	TRUE
3	2	28.46936	45.68649	-79.2521	FALSE	TRUE
3	3	87.20961	54.97528	66.50002	TRUE	FALSE
3	4	87.19993	54.08515	67.67209	TRUE	FALSE
4	1	46.03816	61.65168	-90.1553	FALSE	TRUE
4	2	46.26975	61.30941	-89.0479	FALSE	TRUE
4	3	97.83388	93.71006	-3.85782	FALSE	FALSE
4	4	98.07473	93.27811	-3.76855	FALSE	FALSE
5	1	65.31995	99.51196	-1.06541	FALSE	FALSE
5	2	64.97122	99.23777	-0.71147	FALSE	FALSE
5	3	111.1411	58.42256	70.15397	TRUE	FALSE
5	4	111.3153	57.43504	70.14632	TRUE	FALSE
6	1	8.411127	7.365179	6.824614	FALSE	FALSE
6	2	8.392548	7.285966	9.574953	FALSE	FALSE
6	3	43.42234	43.45819	0.20706	FALSE	FALSE
6	4	43.71717	43.44906	-1.2846	FALSE	FALSE
7	1	82.12372	67.38932	-0.37659	FALSE	FALSE
7	2	82.14054	67.58535	-0.7881	FALSE	FALSE
7	3	73.61093	69.96288	-71.3493	FALSE	TRUE
7	4	72.16269	72.50625	-72.8001	FALSE	TRUE
8	1	53.47487	102.745	-86.2727	FALSE	TRUE
8	2	55.8032	112.5931	-87.1204	FALSE	TRUE
8	3	84.01281	67.62939	9.366132	FALSE	FALSE
8	4	82.9676	61.97609	13.00315	TRUE	FALSE
9	1	16.56508	18.74077	-69.3912	FALSE	TRUE
9	2	16.0868	16.22372	-67.4265	FALSE	TRUE
9	3	83.9008	57.94062	4.566212	FALSE	FALSE
9	4	81.2662	56.96192	5.401073	FALSE	FALSE
10	1	75.35645	72.06733	-0.31042	FALSE	FALSE
10	2	80.36932	74.92928	-0.73565	FALSE	FALSE
10	3	25.72814	9.280292	109.1493	TRUE	FALSE
10	4	25.41813	9.146934	110.7698	TRUE	FALSE

Tabla 8. Función de los genes identificados en el microarreglo por su cambio de expresión en una muestra de cáncer cérvico uterino. Los rojos indican aumento en la expresión y los verdes disminución.

Row	Colum	Log2(C/N)*100	Up	Down	Gene	Funcion
1	1	3.22469	FALSE	FALSE	tata box binding protein	tbp-associated factor rna polymerase ii h 30kd; taf2h
1	2	0.93493	FALSE	FALSE	tata box binding protein	tbp-associated factor rna polymerase ii h 30kd; taf2h
1	3	-6.94646	FALSE	FALSE	core promoter element binding protein;	copeb
1	4	-78.052	FALSE	TRUE	core promoter element binding protein;	copeb
2	1	96.0847	TRUE	FALSE	midkine neurite growth-promoting factor 2;	mdk
2	2	93.5133	TRUE	FALSE	midkine neurite growth-promoting factor 2;	mdk
2	3	3.41223	FALSE	FALSE	internexin neuronal intermediate filament protein alpha;	ina
2	4	4.31008	FALSE	FALSE	internexin neuronal intermediate filament protein alpha;	ina
3	1	-77.8353	FALSE	TRUE	nasopharyngeal epithelium specific protein	nesg1.
3	2	-79.2521	FALSE	TRUE	nasopharyngeal epithelium specific protein	nesg1.
3	3	66.5	TRUE	FALSE	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1;	tiam1
3	4	67.6721	TRUE	FALSE	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1;	tiam1
4	1	-90.1553	FALSE	TRUE	transducin-like enhancer of split esp1 homolog drosophila;	tle2
4	2	-89.0479	FALSE	TRUE	transducin-like enhancer of split esp1 homolog drosophila;	tle2
4	3	-3.85782	FALSE	FALSE	transglutaminase prostate;	tgm4
4	4	-3.76855	FALSE	FALSE	transglutaminase prostate;	tgm4
5	1	-1.06541	FALSE	FALSE	far upstream element-binding protein;	fubp1
5	2	-0.71147	FALSE	FALSE	far upstream element-binding protein;	fubp1
5	3	70.154	TRUE	FALSE	nuclear mitotic apparatus protein 1;	numa1
5	4	70.1463	TRUE	FALSE	nuclear mitotic apparatus protein 1;	numa1
6	1	6.82461	FALSE	FALSE	chromosome condensation 1;	chc1
6	2	9.57495	FALSE	FALSE	chromosome condensation 1;	chc1
6	3	0.20706	FALSE	FALSE	transforming growth factor beta receptor ii 70-80kd;	tgfr2
6	4	-1.2846	FALSE	FALSE	transforming growth factor beta receptor ii 70-80kd;	tgfr2
7	1	-0.37659	FALSE	FALSE	angiotensin i;	agt
7	2	-0.7881	FALSE	FALSE	angiotensin i;	agt
7	3	-71.3493	FALSE	TRUE	ankyrin-like protein 1;	anktm1
7	4	-72.8001	FALSE	TRUE	ankyrin-like protein 1;	anktm1
8	1	-86.2727	FALSE	TRUE	fibroblast growth factor receptor 4 isoform 2;	fgfr4
8	2	-87.1204	FALSE	TRUE	fibroblast growth factor receptor 4 isoform 2;	fgfr4
8	3	9.36613	FALSE	FALSE	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-8;	adams8
8	4	13.0032	TRUE	FALSE	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-8;	adams8
9	1	-69.3912	FALSE	TRUE	guanine nucleotide binding protein g alpha 12;	gna12
9	2	-67.4265	FALSE	TRUE	guanine nucleotide binding protein g alpha 12;	gna12
9	3	4.56621	FALSE	FALSE	estradiol 17 beta-dehydrogenase 3;	hsd17b3
9	4	5.40107	FALSE	FALSE	estradiol 17 beta-dehydrogenase 3;	hsd17b3
10	1	-0.31042	FALSE	FALSE	hypothetical protein flj11160;	flj11160
10	2	-0.73565	FALSE	FALSE	hypothetical protein flj11160;	flj11160
10	3	109.149	TRUE	FALSE	solute carrier family 4 sodium bicarbonate cotransporter member 7;	slc4a7
10	4	110.77	TRUE	FALSE	solute carrier family 4 sodium bicarbonate cotransporter member 7;	slc4a7

Después de realizar todas las operaciones, se agrega la descripción que existe para cada uno de los genes (Tabla 8) y se puede generar una base de datos que nos permita conocer la función, el proceso biológico y la localización celular, de cada uno de los genes que identificados en nuestro microarreglo que tienen un cambio en su expresión

Como podemos observar, los genes están duplicados y este será el ultimo criterio para comprobar que se tiene o no un cambio. Si vemos en la Tabla 8 los datos obtenidos para el renglón 1 columna 4 veremos que su duplicado en el renglón 1 columna 3 no corresponden lo que invalida este dato. Lo mismo se observa para la muestra en el renglón 8 columna 4 y su duplicado en el renglón 8 columna 3.

Como conclusión de este experimento tenemos que 9 genes cambian su expresión, 4 aumentan y 5 disminuyen. Esto parece muy simple sin embargo sus implicaciones pueden ser muy importantes: si consideramos qué genes son y las posible relaciones entre ellos y si estudiamos muchos pacientes con este padecimiento, entonces podríamos definir una firma genética para este mal, lo que nos permitiría identificarlo en etapas tempranas; conociendo la función de los genes modificados y su relación entre ellos, podemos acercarnos al entendimiento del mal y su posible tratamiento.

Un estudio real de este tipo ya se realizó en cáncer mamario: Van de Vijver MJ y col. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med 347: 1999-2009.

En la descripción que hemos realizado de esta técnica, solo nos hemos referido a algunos procedimientos ya reportados. La mayor parte de lo descrito se ha desarrollado en la Unidad de Microarreglos de DNA, ubicada en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A continuación se enlistan una serie de artículos sobre microarreglos, en donde se pueden encontrar técnicas, usos, aplicaciones y formas de interpretar los resultados..

Bibliografía selecta

- Beier M, et al. 2000. [Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays](#). Nucleic Acids Res. 28(4):E11
- Bertucci, F., Bernard, K., Loriol, B., Chang, Y.-C., Granjeaud, S., Birnbaum, D., Nguyen, C., Peck, K., Jordan, B. R. 1999. [Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples](#) Hum Mol Genet 1999 8: p. 1715-1722
- Bowtell DD. 1999. [Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray](#). Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):25-32
- Brown, MP, et al. 2000. [Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines](#). PNAS 97(1):262-267.
- Brown PO, Botstein D. 1999. [Exploring the new world of the genome with DNA microarrays](#). Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):33-7
- Mark Chee, Robert Yang, Earl Hubbell, Anthony Berno, Xiaohua C. Huang, David Stern, Jim Winkler, David J. Lockhart, Macdonald S. Morris, Stephen P. A. Fodor. 1996. Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays. [Science 274: 610-614](#).
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. 1999. [Making and reading microarrays](#). Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):15-9

- Cheung VG, Gregg JP, Gogolin-Ewens KJ, Bandong J, Stanley CA, Baker L, Higgins MJ, Nowak NJ, Shows TB, Ewens WJ, Spielman RS. 1998. [Linkage-disequilibrium mapping without genotyping](#). *NATURE GENETICS* 18: (3) 225-230 MAR 1998
- Cheung VG, Nelson SF. 1998. [Genomic mismatch scanning identifies human genomic DNA shared identical by descent](#). *Genomics* 1998 Jan 1;47(1):1-6
- Claverie, J.-M. 1999. Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet* 1999 8: p. 1821-1832.
- Debouck C, Goodfellow PN. 1999. [DNA microarrays in drug discovery and development](#). *Nat Genet* 1999 Jan;21(1 Suppl):48-50
- DeRisi JL, Iyer VR. 1999. [Genomics and array technology](#). *Curr Opin Oncol* 1999 Jan;11(1):76-9
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. 1996. [Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer](#). *Nat Genet* 1996 Dec;14(4):457-460
- DeRisi J. L., V. R. Iyer, P. O. Brown. 1997. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* 1997 October 24; 278 (5338):680
- Desprez T, Amselem J, Caboche M, Hoffe H. 1998. [Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays](#). *PLANT JOURNAL* 14: (5) 643-652 JUN 1998
- Drobyshev A, Mologina N, Shik V, Pobedimskaya D, Yershov G, Mirzabekov A. 1997. [Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of beta-thalassemia mutations](#). *Gene* 1997 Mar 25;188(1):45-52
- Dubiley S, Kirillov E, Lysov Y, Mirzabekov A. 1997. [Fractionation, phosphorylation and ligation on oligonucleotide microchips to enhance sequencing by hybridization](#). *Nucleic Acids Res* 1997 Jun 15;25(12):2259-2265
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. 1999. [Expression profiling using cDNA microarrays](#). *Nat Genet* 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4
- Eisen MB, Spellman, PT, Brown, PO and D Botstein. 1998. [Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns](#). *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25):14863-14868
- Favis, R., Day, JP, Gerry, NP, Phelan, C., Narod, S., and Barany, F. 2000. [Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2](#) *Nat Biotechnol* May; 18(5):561-564.
- Ferguson JA, Boles TC, Adams CP, Walt DR. 1996. [A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression](#). *NATURE BIOTECHNOLOGY* 14: (13) 1681-1684 DEC 1996
- Fodor, S. A. 1997. Massively Parallel Genomics. *Science* 277:393-395.
- Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. 1997. [Genome screening by comparative genomic hybridization](#). *TRENDS IN GENETICS* 13: (10) 405-409 OCT 1997
- Gerry NP, et al. 1999. [Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations](#). *J. Mol. Biol.* 292(2):251-62
- Ginot F. 1997. [Oligonucleotide micro-arrays for identification of unknown mutations: how far from reality?](#) *Hum Mutat* 1997;10(1):1-10
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gassenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and E. S. Lander. 1999. [Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring](#). *Science* 1999 286: 531-537.
- Gunderson KL, Huang XC, Morris MS, Lipshutz RJ, Lockhart DJ, Chee MS. 1998. [Mutation detection by ligation to complete n-mer DNA arrays](#). *Genome Res* 1998 Nov;8(11):1142-53
- Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, Gemmell A, Shick V, Proudnikov D, Arenkov P, Mirzabekov A. 1997. [Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips](#). *Anal Biochem* 1997 Aug 1;250(2):203-211
- Hacia JG, Woski SA, Fidanza J, Edgemon K, Hunt N, McGall G, Fodor SP, Collins FS. 1998. [Enhanced high density oligonucleotide array-based sequence analysis using modified nucleoside triphosphates](#). *Nucleic Acids Res* 1998 Nov 1;26(21):4975-82
- Joseph G. Hacia, Bryan Sun, Nathaniel Hunt, Keith Edgemon, Deborah Mosbrook, Christiane Robbins, Stephen P.A. Fodor, Danilo A. Tagle, and Francis S. Collins. 1998. [Strategies for Mutational Analysis](#)

- [of the Large Multiexon ATM Gene Using High-Density Oligonucleotide Arrays](#). Genome Res. 1998 December 1; 8(12): p. 1245-1258
- Hacia JG. 1999. [Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays](#). Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):42-7
- Hayward RE, et al. 2000. [Shotgun DNA microarrays and stage-specific expression in plasmodium falciparum malaria](#). Mol Microbiol 35(1):6-14
- Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. 1997. [Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays](#). Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Mar 18;94(6):2150-2155
- Hoheisel JD. 1997. Oligomer-chip technology. TRENDS IN BIOTECHNOLOGY 15: (11) 465-469 NOV 1997
- Johannes G, et al. 1999. [Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray](#). Proc Natl Acad Sci USA 96(23):13118-23.
- Johnston M. 1998. [Gene chips: Array of hope for understanding gene regulation](#). CURRENT BIOLOGY 8: (5) R171-+ FEB 26 1998
- Kal, A. J., van Zonneveld, A. J., Benes, V., van den Berg, M., Koerkamp, M. G., Albermann, K., Strack, N., Ruijter, J. M., Richter, A., Dujon, B., Ansorge, W., Tabak, H. F. 1999. [Dynamics of Gene Expression Revealed by Comparison of Serial Analysis of Gene Expression Transcript Profiles from Yeast Grown on Two Different Carbon Sources](#). Mol. Biol. Cell. 10:1859-1872
- Khan J, et al. 1999. [cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene](#). Proc Natl Acad Sci USA 96(23):13264-9
- Khrapko KR, Lysov YuP, Khorlyn AA, Shick VV, Florentiev VL, Mirzabekov AD. 1989. [An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing](#). FEBS Lett 1989 Oct 9;256(1-2):118-122
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. [Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens](#). Nat Med 1998 Jul;4(7):844-847
- Kruglyak L, McAllister L. 1998. [Who needs genetic markers?](#) NATURE GENETICS 18: (3) 200-202 MAR 1998
- Lander ES. 1999. [Array of hope](#). Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):3-4
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW. 1997. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. [PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA](#) 94: (24) 13057-13062 NOV 25 1997
- Lee PS, Lee KH. 2000. [Genomic analysis](#). Curr Opin Biotechnol Apr; 11(2):171-175
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. 1999. [High density synthetic oligonucleotide arrays](#). Nat Genet 1999 Jan;21(1 Suppl):20-4
- David J. Lockhart, Helin Dong, Michael C. Byrne¹, Maximillian T. Follettie, Michael V. Gallo, Mark S. Chee, Michael Mittmann, Chunwei Wang, Michiko Kobayashi, Heidi Horton, and Eugene L. Brown. 1996. [Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays](#), [NATURE BIOTECHNOLOGY](#) 14: (12) 1675-1680 DEC 1996
- Marshall A, Hodgson J. 1998. [DNA chips: an array of possibilities](#). Nat Biotechnol 1998 Jan;16(1):27-31
- Matsumura H, et al. 1999. [Technical Advance: Transcript profiling in rice \(Oryza sativa L.\) seedlings using serial analysis of gene expression \(SAGE\)](#). Plant J. 20(6):719-726.
- Lucito R, Nakimura M, West JA, Ying H, Chin K, Jensen K, McCombie R, Gray JW, Wigler M. 1998. Genetic analysis using genomic representations. [PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA](#) 95: (8) 4487-4492 APR 14 1998
- Noble D. 1995. [DNA sequencing on a chip](#). Anal Chem 1995 Mar 1;67(5):201A-204A
- Pappalardo PA, Bonner R, Krizman DB, Emmert-Buck MR, Liotta LA. 1998. [Microdissection, Microchip Arrays, and Molecular Analysis of Tumor Cells \(Primary and Metastases\)](#). Semin Radiat Oncol 1998 Jul;8(3):217-223
- Pennisi E. 1999. DNA chips give new view of classic test. [Science 1999 Jan 1;283\(5398\):17-8](#)
- Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A. 1998. [Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips](#). ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 259: (1) 34-41 MAY 15 1998

- Radtkey, R., Feng, L., Muralhidar, M., Duhon, M., Canter, D., DiPerro, D., Fallon, S., Tu, E., McElfresh, K., Nerenber, M., and R. Sosnowski. 2000. [Rapid high fidelity analysis of simple sequence repeats on an electronically active DNA microchip](#). *Nucleic Acids Research Methods* 28(7) April 1.
- Ramsay G. 1998. [DNA chips: State-of-the-art](#). *NATURE BIOTECHNOLOGY* 16: (1) 40-44 JAN 1998
- Richmod T and S Somerville. 2000. [Chasing the dream: plant EST microarrays](#). *Curr Opin Plant Biol* Apr;3(2):108-116.
- Schena M. 1996. [Genome analysis with gene expression microarrays](#). *Bioessays* 1996 May;18(5):427-31
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. 1996. [Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes](#). *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 93: (20) 10614-10619 OCT 1 1996
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* Jul; 16(7):301-6
- SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO. 1995. Quantitative Monitoring Of Gene-expression Patterns With A Complementary-DNA Microarray. *SCIENCE* 270: (5235) 467-470 OCT 20 1995
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. 1998. [Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics](#). *Trends Biotechnol* 1998 Jul;16(7):301-306
- Schuchhardt, J., Beuele, D., Malik, A., Wolski, E., Eickhoff, H., Lehrach, H., and H. Herzel. 2000.
- Service, Robert F. 1998. [GENOMICS:DNA Chips Survey an Entire Genome](#) *Science* 281: 1122.
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO. 1996. [A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization](#). *GENOME RESEARCH* 6: (7) 639-645 JUL 1996
- Shalon D. 1998. [Gene Expression Micro-arrays: A new tool for genomic research](#). *PATHOLOGIE BIOLOGIE* 46: (2) 107-109 FEB 1998.
- Shchepinov MS, Case-Green SC, Southern EM. 1997. [Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays](#). *Nucleic Acids Res* 1997 Mar 15;25(6):1155-1161
- Sniegowski, P. 1999. [Evolution: The genomics of adaptation in yeast](#). *Current Biology* 9: R897-R898
- Stimpson DI, Cooley PW, Knepper SM, Wallace DB. 1998. [Parallel production of oligonucleotide arrays using membranes and reagent jet printing](#). *Biotechniques* 1998 Nov;25(5):886-90
- Southern E, Mir K, Shchepinov M. 1999. [Molecular interactions on microarrays](#). *Nat Genet* 1999 Jan;21(1 Suppl):5-9
- Southern EM. 1995. [DNA fingerprinting by hybridisation to oligonucleotide arrays](#). *Electrophoresis* 1995 Sep;16(9):1539-1542
- Southern EM. 1996. [DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale](#). *Trends Genet* 1996 Mar;12(3):110-115
- Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, and F Winston. 2000. [Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of Saccharomyces cerevisiae](#). *Proc Natl Acad Sci USA* March 21: eprint-not yet published
- Vahey, M. Nau, M. E., et al. 1999. [Performance of the Affymetrix GeneChip HIV PRT 440 Platform for Antiretroviral Drug Resistance Genotyping of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clades and Viral Isolates with Length Polymorphisms](#) *J. Clin. Microbiol.* 37: 2533-2537
- Vingron M, et al. 1999. [Computational aspects of expression data](#). *J Mol Med* 77(1):3-7
- D. G. Wang, J. Fan, C. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander. 1998. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 1998 May 15; **280 (5366):1077** (in Reports).
- Watts HJ, Yeung D, Parkes H. 1995. [Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor](#). *Anal Chem* 1995 Dec 1;67(23):4283-4289
- Welford SM, Gregg J, Chen E, Garrison D, Sorensen PH, Denny CT, Nelson SF. 1998. [Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization](#). *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 26: (12) 3059-3065 JUN 15 1998
- White, KP et al. 1999. [Microarray analysis of Drosophila development during metamorphosis](#). *Science* 286(5447):2179-84.

- Winzeler Elizabeth A., Dan R. Richards, Andrew R. Conway, Alan L. Goldstein, Sue Kalman, Michael J. McCullough, John H. McCusker, David A. Stevens, Lisa Wodicka, David J. Lockhart, Ronald W. Davis. 1998. [Direct Allelic Variation Scanning of the Yeast Genome](#). Volume 281, Number 5380 Issue of 21 Aug 1998, pp. 1194 - 1197
- Winzeler EA, Davis RW. 1997. Functional analysis of the yeast genome. [CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT](#) 7: (6) 771-776 DEC 1997
- Wodicka L, Dong HL, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. 1997. [Genome-wide expression monitoring in Saccharomyces cerevisiae](#). [NATURE BIOTECHNOLOGY](#) 15: (13) 1359-1367 DEC 1997
- Yang, GP, ROss, DT, Kuang, WW, Brown, PO, and RJ Weigel. 1999. [Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes](#). *Nucleic Acids Res* 27(6): 1517-1523.
- Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I, Parinov S, Guschin D, Drobishev A, Dubiley S, Mirzabekov A. 1996. [DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 May 14;93(10):4913-4918
- Zanders, ED et al. 2000. [Analysis of immune system gene expression in small rheumatoid arthritis biopsies using a combination of subtractive hybridization and high-density cDNA arrays](#). *J Immunol Methods*. 233(1-2):131-140.

Semblanza del Dr. Jorge Ramírez Salcedo.

Nació en la Ciudad de México el 2 de noviembre de 1958, obtuvo el grado de QFB en Microbiología y Bioquímica en la Facultad de Química de la UNAM. En el 2001 se doctoró en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, obteniendo mención honorífica. Cuenta con 44 publicaciones internacionales, una patente y es miembro del SIN, nivel 1. Ha impartido diferentes cursos y seminarios en la Universidad Nacional Autónoma de México; en la Universidad de Praga, Checoslovaquia; en la Universidad de Concepción, Chile y en la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. Ha recibido la Distinción Guillermo Massieu en 3 ocasiones (entre 1989 y 1991), y la Distinción Federico Fernández Cansino en 4 ocasiones (entre 1993 y 1998). Colaboró en la creación de la Unidad de Microarreglos de DNA en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, de la que actualmente es el responsable.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

¿ES TÓXICO EL ALCOHOL?

Enrique Piña¹, José Gutiérrez-Salinas², José Antonio Morales-González³ y Martha Zentella de Piña¹

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. A. Postal 70159, México 04530, México, D.F. México.

² Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado. México, D.F., México.

³ Laboratorio de Bioquímica Médica, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, y Profesor de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

epgarza@servidor.unam.mx

¿Qué es la vida a quien le falta el vino que ha sido creado para contento de los hombres?

Regocijo del corazón y contento del alma es el vino bebido a tiempo y con medida.

Eclesiástico 31:27 y 28
Biblia de Jerusalem

Introducción

Pocas sustancias resultan tan atractivas para el hombre como el alcohol. Para el común de los hombres, alcohol es equivalente en particular al alcohol etílico o etanol; este trabajo se refiere al etanol. La vida social humana está marcada por el etanol, su consumo moderado,

aceptado por la mayoría de las culturas y religiones, es parte de la convivencia cotidiana; su consumo exagerado, reprobado por esas mismas culturas y religiones es parte de la patología humana.

El título de este trabajo es una pregunta, y tal como está enunciada, la respuesta perfectamente válida puede ser desde un no, hasta un sí condicionado. Entre las moléculas que se utilizan o se producen en la industria en general el etanol es muy poco tóxica, incluso llama la atención su pequeña acción tóxica, aun cuando alcance elevadas concentraciones en las células y los tejidos, tal como se ilustra más adelante. En el otro extremo es válido asegurar que el 10% de las muertes ocurridas en este país están asociadas al etanol (97). En los dos casos mencionados se sobreentiende que es el **consumo** de etanol lo que realmente define su toxicidad. Así, se ha insistido desde época inmemorial: el consumo moderado de etanol no es tóxico y ofrece ventajas al individuo, mientras que el consumo exagerado resulta tóxico para el bebedor. Entonces, la pregunta inmediata es ¿qué es consumo moderado? La respuesta precisa es para cada individuo (edad, peso corporal, género, polimorfismo genético*, medicamentos y factores hormonales), en cada situación particular (ayuno, tipo de comida, cantidad de comida, estado de salud, etc.); sin embargo, una regla general es la siguiente: no más de dos bebidas (copa, cocktail, cerveza) por día. Si la actividad social es prolongada, dos bebidas las primeras 3 horas y una bebida cada una de las 2 horas subsiguientes; no más de una reunión de este tipo a la semana. En mujeres embarazadas “cero” bebidas a todo lo largo del embarazo. Cualquier cantidad que exceda a las anotadas se considera exceso, muy especialmente en mujeres, quienes manifiestan mayor susceptibilidad a las posibles acciones tóxicas por la ingestión de etanol.

Para responder a la pregunta que le da origen, se incluye enseguida información suficiente para sustentar la respuesta. Relativo al consumo moderado, se menciona su significado social, las calorías que se obtienen al ser metabolizado por el individuo y algunos de los principales beneficios que se han documentado. En relación al consumo exagerado de etanol y a las alteraciones que puede producir en los organismos de los mamíferos, el trabajo se enfoca casi exclusivamente a tratar de entender la “bioquímico-patología” de las lesiones hepáticas. A pesar de su enorme interés e importancia no se incluyen en este trabajo los impresionantes cambios promovidos por el etanol en el comportamiento de los individuos. El trabajo tampoco alude a la demostrada toxicidad del etanol, muy aparente en los fetos de madres, las cuales lo ingieren en pequeñas cantidades dando origen a los devastadores síndromes de alcoholismo fetal.

Consumo moderado de etanol. Con la frase: “y el vino que recrea el corazón del hombre” inicia el versículo 15 del Salmo 104 de la Biblia, fue escrito hace cerca de 3 000 años, y resume poética y magistralmente el beneficio fundamental por la ingestión moderada de etanol. Son numerosas las consecuencias de ese recrear el corazón del hombre, entre ellas, el desarrollo de la importante industria de vinos y licores, el comercio de los mismos y los altísimos precios a los que llegan a cotizarse las viejas botellas del buen vino tinto; la certeza de que en una reunión social el etanol es el invitado que nunca falta. Después de la ingestión del primer trago, el efecto ansiolítico y la sensación de bienestar y desinhibición animan la reunión y facilitan la comunicación. Desde el punto de vista químico y energético ¿qué significa la ingestión de 2

* La variabilidad de las poblaciones humanas para degradar el etanol constituye un ejemplo de polimorfismo genético, esto es, el número de veces que en condiciones normales se repite la presencia de un gene, en este caso, los genes de las distintas deshidrogenasas alcohólicas.

bebidas con etanol? Para fines prácticos es muy similar el contenido de etanol en 1 litro de pulque, 2 cervezas de 300 ml cada una, 2 copas de vino de 100 ml cada una ó 2 copas de tequila, ron, coñac, whisky o vodka de 1 onza (28 ml) cada una. El contenido de etanol en esas dos copas es de aproximadamente 20 g, equivalente a 0.43 moles de etanol, los cuales llegan a alcanzar una concentración sanguínea de 10 mM y su oxidación completa, hasta H₂O y CO₂, libera 150 kcalorías ó 627.6 kjoules (ya que 1 kcal = 4.184 kJ). Para apreciar el significado de las cifras anteriores compárense con la ingestión de carbohidratos, lípidos y proteínas en 24 horas de un individuo de 70 kg de peso corporal que realiza actividad física moderada (Tabla 1).

Tabla I. Ingestión cotidiana de los principales nutrimentos en comparación con la ingestión de 2 copas de una bebida con etanol

Nutrimento	Peso (g)	Peso molecular	Moles	Energía liberada (en kcal)	Concentración sanguínea (mM) normal
H ₂ O	2000	18	110	0	42,000 ^d
Carbohidratos	250	180 ^a	1.4	1000	5
Lípidos	720	275 ^b	0.26	720	0.9-2.0 ^b
Proteínas	70	100 ^c	0.75	280	—
Etanol	20	46	0.43	150	10

a) glucosa, b) triacilglicérido promedio c) aminoácidos promedio d) calculando que la sangre contiene un 75% de agua.

Otro de los beneficios registrados por el cotidiano consumo moderado de etanol incluye el registro de valores de colesterol sanguíneo más bajo, mayor cantidad de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL, el colesterol “bueno”) en comparación con las lipoproteínas de baja densidad (LDL, el colesterol “malo”) y una menor incidencia de problemas de salud consecutivos al depósito de colesterol en las arterias, véase por ejemplo la referencia (122).

En suma, el consumo moderado de etanol no es tóxico, en un sentido más amplio de como se escribió originalmente, el “vino recrea el corazón del hombre” y lo recrea en el sentido espiritual, afectivo, físico y biológico.

Consumo exagerado de etanol. El resto del trabajo se refiere al consumo exagerado de etanol y sus repercusiones hepáticas. Nótese que al referirse al consumo exagerado se hace referencia a dos ejes: cantidad de etanol ingerido por día y período de tiempo con ese consumo.

Enfermedad hepática por etanol

Cuando la ingestión exagerada de etanol ocurre esporádicamente, y por un sólo día, la lesión hepática más común es la de esteatosis. Si la ingestión exagerada es frecuente y sucede por semanas o meses, la lesión predominante es de inflamación. Se requieren varios años de ingestión exagerada y frecuente del etanol, así como de cierta predisposición, para que la lesión predominante en el hígado sea la de fibrosis. Dependiendo de varios factores y del patrón de bebida pueden coexistir dos, o los tres tipos de lesiones en el hígado. Actualmente se define la

cirrosis como la etapa final de la fibrosis del parénquima hepático, con formación de nódulos y una función hepática alterada (37). En el 2003 se insiste en que las tres etapas de la enfermedad son reversibles, sí la cirrosis hepática se considera reversible (49,50). Aunque se dispone de escasa y fragmentaria información sobre la reversibilidad de la cirrosis, existe amplia evidencia de que con frecuencia es posible. Otro ángulo de interés es que la fibrosis y la cirrosis representan las consecuencias de una respuesta sostenida a una lesión crónica del hígado por varias causas que incluyen etanol, virus, drogas, autoinmunidad, colestasis y enfermedades metabólicas. No deja de ser una incógnita el que, en relación con el etanol, sólo un 20% de los bebedores crónicos llegan a presentar cirrosis.

Existe abundantísima información sobre un sinnúmero de procesos metabólicos y reguladores que son alterados por la presencia de concentraciones altas de etanol en sangre y que afectan un buen número de células. No obstante lo anterior, aún son fragmentarios los conocimientos sobre los mecanismos responsables de la hepatotoxicidad del etanol. Los esquemas más exitosos sobre dichos mecanismos de toxicidad incluyen la lesión del etanol sobre alguna o algunas de las células presentes en el órgano hepático, y cómo dicha lesión repercute en el funcionamiento de otras células de diferente estirpe localizadas en el hígado, se compromete más el funcionamiento normal del órgano y se puede hablar de toxicidad. Varios autores han señalado la participación de los macrófagos hepáticos o células de Kupffer en la fisiopatología del daño con etanol, que repercute en las células estelares o de Ito, con un aumento en la síntesis de colágena hepática. En este trabajo se amplía la idea previa y se hace notar que desde el inicio de la hepatopatía sucede la intervención de células muy diferentes a las presentes en el hígado, hepatocitos, células de Kupffer y células estelares, las cuales al responder a las concentraciones elevadas de etanol en sangre contribuyen a las manifestaciones hepáticas de toxicidad del propio etanol: esteatosis, inflamación y fibrosis.

Límites, concentraciones y tiempos. Uno de los mayores motivos de confusión al referirse a los estudios sobre el etanol es la ligereza con las que se revisan las condiciones experimentales al efectuar comparaciones entre diferentes trabajos. En el resto de este escrito, y a menos de que se establezca específicamente lo contrario, se considerarán exclusivamente los efectos obtenidos por la ingestión de cantidades elevadas de etanol. Cantidades en el rango de 5 g/kg de peso para la rata; al comparar con el ser humano y basado en el peso corporal correspondería a ingerir 350 g etanol (los cuales están contenidos en una botella, 750 ml, y media de brandy, ron, tequila, vodka o whisky) en 24 h, en un individuo de 70 kg, con los que se logran concentraciones de etanol en plasma alrededor de 50 mM, en comparación con valores de 0.5 mM (88) que se registran en la vena porta debido a la absorción del etanol sintetizado por la actividad metabólica de las bacterias contenidas normalmente en el intestino.

Las extrapolaciones que se intentan establecer entre los resultados de experimentos en humanos y los experimentos con animales de laboratorio a menudo son absurdas y en otras ocasiones muy difíciles de sustentar. Así por ejemplo, en la mayoría de las ocasiones los humanos determinan voluntariamente la cantidad de etanol y el tiempo en que lo ingieren, lo que no sucede así con los animales de laboratorio. ¿A qué equivale experimentalmente en un grupo de ratas el que dos individuos beban en condiciones similares de vida 1 botella de ron, cada uno por 5 días a la semana, por 25 años, al cabo de los cuales uno manifiesta una típica cirrosis y el otro evidencia datos moderados de lesión hepática? Uno de los modelos preferidos para estudiar el efecto del etanol en el hígado de la rata consiste en una dieta líquida en que se fuerza la ingestión de etanol a una velocidad constante a lo largo de las 24 h, y en la cual, 1/3 de las

calorías de la dieta lo constituye el etanol, 1/3 está representado por grasas y el otro tercio satisface todos los demás requerimientos de carbohidratos y proteínas, además de vitaminas y minerales del animal (113). Una dieta semejante en el sujeto alcohólico que se bebe una botella y media (o sea 350 g de etanol, esto es, 5 g etanol/kg de peso al día) diaria de ron equivaldría a recibir cerca de 7,875 kcal al día: al etanol corresponderían 2,625 kcal, 290 g de grasa proveería de otras 2,625 kcal y consumiría 656 g de carbohidratos y proteínas más, que liberarían 2,625 kcal. Pero la comparación se complica cuando en estos tipos de experimentos a las ratas se les forza a recibir hasta 14.5 g de etanol por kg de peso y por día, en un hombre de 70 kg de peso sería similar a beber casi 2 botellas de ron (750 ml).

Kilogramos vs m². Hace casi 100 años, cuando se realizaron las primeras determinaciones del metabolismo basal en diferentes especies, se encontró que dicho metabolismo basal, o sea la producción de calor durante 24 h en condiciones de reposo, al ser calculada por kg de peso corporal, resultó mayor mientras menor fuera el peso corporal. El metabolismo basal en el ratón (20 g de peso corporal) tiene un valor de 212 kcal x kg⁻¹ x día⁻¹, mientras que para el caballo (441 kg de peso corporal) da una cifra de 11.3 kcal x kg⁻¹ x día⁻¹, para un hombre de 64 kilos el dato es de 32.1 kcal x kg⁻¹ x día⁻¹, y para una rata de laboratorio (200 g de peso corporal) el valor es aproximadamente 4 veces mayor que para el hombre. Si el metabolismo basal se calcula por m² de superficie corporal se registran cifras cercanas a las 1 000 kcal x día⁻¹/m² para la inmensa mayoría de especies estudiadas, y desde luego, para las 4 anotadas.

Al repetir las comparaciones anteriores de la ingestión de alcohol entre el hombre y la rata, pero ahora con base en la superficie corporal, se obtienen datos que parecen más realistas. Así el valor de 5 g de etanol/kg de peso en la rata, comparado con base en la superficie corporal, equivale en el hombre a ingerir 1.25 g/kg de peso, lo cual en un individuo de 70 kg de peso se logra al beber 275 ml de ron, poco más de 1/3 de la botella (o una bebida similar), o bien 1 botella y 1 copa de vino tinto. Si se repiten los cálculos para dietas destinadas para ratas con 1/3 de etanol, 1/3 de grasa y 1/3 de otros requerimientos, con la ingestión de 1.25 g/kg de peso (275 ml de ron en un individuo de 70 kg), entonces el cálculo para el hombre equivale a recibir 656 kcal por 275 ml de ron, 656 kcal debidas a la ingestión de 73 g de grasa y 656 kcal por recibir 164 g de proteínas y carbohidratos, en resumen una dieta de casi 2,000 kcal por día. Para finalizar las comparaciones con base en la superficie corporal, los 14.5 g/kg de peso y por día con el que se forza a las ratas a recibir etanol representa para el hombre el administrarle 3.6 g de etanol/kg de peso y por día. En un sujeto de 70 kg representaría 252 g, esto es 5/6 de 1 botella de ron al día. En conclusión, tal como era de esperarse al comparar los resultados de los experimentos en el hombre y la rata, dicha comparación es más objetiva al correlacionarlos con la energía liberada en función de la superficie corporal y no del peso corporal. Quedan pendientes y sin una aceptable explicación, por ejemplo, la acción del tiempo, tal vez pudieran asociarse al período de vida. Así los experimentos en los que se aprecian lesiones iniciales de fibrosis en ratas requieren semanas, mientras que en los humanos se observan después de años.

Otro aspecto obvio que se ha mencionado repetidamente es la diferente susceptibilidad al etanol en las distintas especies ensayadas. Para eliminar esas enormes diferencias entre humanos y roedores se han realizado experimentos con monos.

Propuesta del modelo: el efecto dominó

A pesar de las dificultades inherentes en cada uno de los modelos experimentales delineados, en este trabajo se amplía la información sobre las células, las señales intercelulares y las vías regulables que llevan a la conclusión de que las típicas lesiones hepáticas (esteatosis, inflamación y fibrosis) ocasionadas por el etanol suceden por un “efecto dominó”: el etanol produce una respuesta en una estirpe celular y las moléculas liberadas por ese tipo de célula; junto con el etanol y/o sus productos de oxidación, producen una respuesta en una segunda estirpe celular, las moléculas producidas por el segundo tipo de célula, más las previamente liberadas por las primeras células, más el etanol y/o sus productos de oxidación afectan una tercer estirpe celular, que a su vez, libera moléculas que se suman a las formadas previamente y al etanol y/o sus cada vez más abundantes productos de oxidación, para afectar una cuarta estirpe celular y así sucesivamente. Este “efecto dominó” incluye, conservadoramente, tal como se revisa a continuación, una docena de estirpes celulares, al menos diez entidades químicas producidas por la oxidación del etanol, y un número aún mayor de mensajeros químicos. La interacción de todos los participantes ocasiona una complejísima red de respuestas que puede llevar a la enfermedad hepática y en la que brillan con luz propia dos aspectos: la extraordinaria capacidad “homeostática” del organismo humano y la baja toxicidad del etanol *per se*: se requiere ingerir una molécula (que no es alimento natural) para alcanzar concentraciones sanguíneas 10 veces más altas que las fisiológicas de glucosa en sangre, por períodos de 25 años o mayores, para que sólo un 20% de los adictos presenten cirrosis, a los que habrán de sumarse los enfermos en los que el alcohol afectó otros órganos: cerebro, corazón, glándulas endocrinas y sangre.

Análisis de las variables. Conviene establecer un esquema mínimo que facilite el análisis de una respuesta compleja. Se efectuarán distintas consideraciones sobre las diferentes células que se han identificado como importantes en la respuesta a elevadas concentraciones de etanol en sangre. De la docena de células revisadas en este trabajo, las que de ninguna manera son el total de todas las que intervienen en el proceso que nos ocupa, existen nueve cuyo análisis de su participación será breve y hay tres que tienen especial importancia y que se revisan con mayor detalle: los hepatocitos, las células de Kupffer y las células estelares o células de Ito. Idealmente para cada una de estas tres células se revisarán los aspectos sobresalientes en las que intervienen para integrar la secuencia hacia la enfermedad hepática. Aquí se revisará su capacidad para oxidar el etanol, el efecto deletéreo de los productos de oxidación del etanol sobre las diferentes células, los mensajeros liberados y sus acciones así como las principales respuestas a los mensajeros recibidos y a los productos generados por la acción del etanol.

El análisis de la bibliografía no es exhaustivo, la cantidad de información disponible rebasa con mucho la presentada. La bibliografía escogida es compatible con un esquema congruente de las acciones del etanol para integrar una patología hepática aguda (esteatosis), subaguda (inflamación) y crónica (fibrosis). Si bien existe información opuesta a la del esquema propuesto, cada pequeño segmento de la información, en contra y a favor, ameritaría un análisis detallado que ocuparía una extensión similar a la de todo el trabajo aquí presentado. Por lo tanto, más que ofrecer investigaciones particulares en favor o en contra de algún punto de controversia, se prefirieron artículos de revisión coincidentes con los puntos expresados. Queda para el futuro, en caso requerido, una exhaustiva confrontación en apoyo o en contra de los puntos sobresalientes de la hipótesis aquí resumida.

El hepatocito

El hepatocito es la principal unidad funcional del hígado; calculado por volumen representa el 78% del parénquima hepático de la rata (14), si bien para la misma rata equivale del 60 al 68% de la población celular total, mientras que para el hombre los hepatocitos son el 80% de la población celular total del hígado (76). En los mamíferos es la célula que oxida la mayor parte del etanol consumido. Los hepatocitos han sido históricamente el foco central de atención de la mayoría de los estudios que investigan los efectos del etanol en la función hepática; además, la muerte progresiva de los hepatocitos es una de las consecuencias graves de la cirrosis.

Papel del hepatocito sobre el etanol y sus metabolitos. Tal como se mencionó, el hepatocito es la principal célula que oxida al etanol, dicha oxidación eleva el consumo de oxígeno (112) y produce acetaldehído y acetato (66), además se incrementa la producción de NADH y disminuye la de NAD^+ en el citosol del hepatocito, con lo que la relación NADH/NAD^+ se llega a elevar por un factor de 100 (61). Simultáneamente se consume NADPH y se eleva la poza de NADP. Por otra parte se eleva la presencia de especies de oxígeno reactivas (EOR) (26) y disminuye la concentración de glutatión total (GT) y de glutatión reducido (GSH) (28).

Al subir la relación NADH/NAD se afecta todo el metabolismo del hepatocito, tal como lo describió Krebs hace 40 años, con lo que se eleva la poza de sustratos que demandan de NAD para su oxidación, por ejemplo el lactato (62). Actualmente se sabe que la ingestión aguda de etanol y su oxidación promueve la formación de EOR en el hepatocito, y la toxicidad del etanol se ha asociado, cada vez con mayor frecuencia, desde 1966 (26), a la formación de esas EOR. En el momento presente existen tres hipótesis sobre el origen de las EOR generados después de la administración elevada de etanol. En este sitio del trabajo se revisan las dos series de experimentos que ubican la formación de EOR en dos fracciones subcelulares diferentes del hepatocito y a través de mecanismos moleculares distintos. Otra hipótesis se resume en la sección correspondiente de las células de Kupffer.

En el hepatocito, la inducción del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) por el etanol es para unos investigadores el camino metabólico central por el cual el etanol genera un estado de estrés oxidativo (20), ya que la actividad *in vitro* del CYPE21 genera el anión superóxido (65,25). El enfoque usado fue el de establecer una línea celular, la HepG2, que constitutivamente sobre-expresa el CYP2E1. La adición de etanol, o un ácido graso insaturado, o fierro, o la eliminación de GSH, fue tóxico para las células que sobre-expresan el CYP2E1, pero no para las células controles. La toxicidad se asoció con una elevada peroxidación de lípidos y puede ser prevenida con antioxidantes e inhibidores del CYP2E1. Concluyen que la asociación entre el estrés oxidativo promovido por la actividad del CYP2E1, algunas lesiones mitocondriales y la homeostasis particular del GSH pueden contribuir a la acción tóxica del etanol sobre el hígado (20). Lo anterior no es concluyente ya que en experimentos hechos en ratones a los cuales se les eliminó (knockout) el gene codificador para el CYP2E1 se encontró que la intoxicación con etanol en este tipo de ratones genera EOR y cambios patológicos muy similares a los observados en los animales controles (57).

Los experimentos de otros autores localizan en la mitocondria la formación de un exceso de EOR por la administración de etanol. En situación normal la mitocondria utiliza cerca del 90% del oxígeno consumido por la célula (103) preferentemente a nivel de complejo de la citocromo

oxidasa. En la cadena mitocondrial de transporte de electrones las EOR se forman principalmente en el sitio de la ubiquinona en el complejo III en el cual se activa el O_2 y como subproducto se forma el radical superóxido (21). La mitocondria posee una superóxido dismutasa (SOD) dependiente de Mn, que convierte los iones superóxido en H_2O_2 , que es convertido en H_2O y O_2 por una peroxidasa dependiente de GSH. Por lo tanto la función del GSH de la matriz mitocondrial en la célula hepática es eliminar el H_2O_2 generado por el transporte de electrones (30). Cualquier condición que eleve el estrés oxidativo mitocondrial (por ejemplo isquemia, ingestión de etanol, citotoxicidad inducida por el $TNF-\alpha$) hace de la poza mitocondrial de GSH el factor crítico para definir la pérdida de la función mitocondrial y la viabilidad celular. La administración crónica de etanol provoca en las mitocondrias del hepatocito un defecto selectivo en el transporte del GSH desde el citosol a la mitocondria (29), como además el GSH se sintetiza exclusivamente en el citosol del hepatocito, lo que se observa es una disminución en los niveles de GSH mitocondrial, así se facilita la elevación de EOR en la mitocondria y se compromete la función del organelo y la viabilidad celular. Otros trabajos apoyan la hipótesis de que la producción de EOR son un factor crítico en la lesión hepática causada por etanol (118): en comparación con las ratas normales, aquellas en las que se sobre-expresa por tres veces el gene de la SOD dependiente de Mn (empleando la técnica de vectores adenovirales) no presenta las siguientes lesiones que normalmente son observadas por intoxicación crónica con etanol, tales como disminución en los niveles mitocondriales de GSH, elevación en los niveles séricos de la alanina aminotransferasa, aparición de lesiones histopatológicas, aparición de radicales libres derivados del etanol y apoptosis. En conclusión el estrés oxidativo mitocondrial en los hepatocitos participa en la lesión hepática producida por el etanol (118). Por otro lado, queda pendiente de averiguar un mecanismo por el cual las EOR formadas en una célula pueden afectar las células vecinas.

Una vez formadas las EOR el hepatocito contribuye importantísimamente a promover la génesis de más EOR, cuando menos por 4 mecanismos que aquí se mencionan pero se analizarán posteriormente: acción de la epinefrina (19), elevación en los triacilglicéridos hepáticos, (24) un estado hipermetabólico que puede llevar a la hipoxia (116) y eliminación del glutatión oxidado (GSSG) (108). Y recuérdese que la aparición de EOR sólo se observa si el etanol se oxida (78).

Productos metabólicos liberados y sus consecuencias. Aquí se revisan 4 productos liberados por el hepatocitos y algunas de sus consecuencias. El acetaldehído, el acetato, el GSSG y un conjunto de enzimas del hepatocito llamadas de escape. Un 80% del etanol se convierte en acetato (107), que se oxida preferentemente en el tejido muscular. El acetaldehído es sumamente reactivo, puede oxidarse en otras células además del hepatocito, por ejemplo en las células de Kupffer y en las células estelares, en estas últimas activa la formación de colágena. El acetaldehído se une químicamente a proteínas de suero, y de muchas células (93), con lo que se forman proteínas con funciones alteradas y proteínas inmunológicamente reactivas (18,44,89) que cuando la ingestión de etanol se hace crónica, ayuda a explicar los problemas inmunológicos observados en los alcohólicos.

Las proteínas alteradas resultan de la producción de aductos estables que se forman por la reacción química del acetaldehído con los aminoácidos de las proteínas; así como otros aldehídos provenientes de la oxidación del etanol administrado en cantidades importantes, también estimulan la fibrogénesis hepática y llegan a formar auto-anticuerpos. Además, la demostración de la presencia de tales aductos en ciertas zonas de los hepatocitos de los

alcohólicos en las fases tempranas de lesión histológica hepática, indica que tales aductos pueden ser importantes en la secuencia de eventos que conducen a la enfermedad alcohólica hepática (para una revisión ver referencia 91). La formación experimental de aductos es potenciada de manera notable si los animales experimentales, además del etanol, reciben dietas con alto contenido de grasa y con hierro; en tales condiciones también se registra estrés oxidativo, aumento en las citocinas pro-inflamatorias e imágenes de lesiones histopatológicas progresivas (114).

La eliminación de GSSG es promovida por la epinefrina (106) y puede abatir en el hepatocito la posible defensa para eliminar a las EOR. La presencia de enzimas de escape en suero se usa como índice de "lesión" del hepatocito, sin embargo, disminuye su utilidad mientras más crónico se torna el problema de alcoholismo.

Productos metabólicos recibidos. Tal vez los más importantes sean los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, con los que se llega a configurar el cuadro de esteatosis hepática, que consiste el característico y mal llamado hígado graso (24). Si bien a la esteatosis hepática se le han identificado otros orígenes existe suficiente evidencia experimental para justificar que el principal aporte de grasa para la esteatosis del alcohólico proviene de los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo y captados y acumulados en el hígado (96). La formación de altos niveles de EOR requiere de ácidos grasos poli-insaturados presentes en la dieta y que lleguen al hígado (32), además de precisar de la oxidación de etanol tal como se mencionó anteriormente, y de más factores, los cuales se incluirán al revisar el efecto del etanol en otras estirpes celulares.

Una serie de experimentos de nuestro laboratorio resaltan la importancia de los ácidos grasos, provenientes del tejido adiposo, en el desarrollo de la enfermedad hepática por etanol. He aquí los hechos y las interpretaciones sobresalientes:

a) Cuatro anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), la aspirina, el naproxén, el nimesulide y el piroxicam, previenen parcialmente 3 de los cambios moleculares registrados en el hígado por la administración aguda de 5 g de etanol por kilo de peso en la rata, a saber, el aumento en la lipoperoxidación (medida por poza de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS); el aumento en la poza de triacilglicéridos, TAG; y la disminución de glutathion total, GT (123,124,125).

b) Los mismos 4 AINEs inhiben la lipólisis promovida por las catecolaminas como una respuesta a la intoxicación aguda con etanol. El efecto de los AINEs se observa también *in vitro* cuando la lipólisis se estimula por medio del dibutiril AMPcíclico en adipocitos aislados (126). El mediador de los efectos antilipolíticos de los AINEs es el peróxido de hidrógeno (127).

c) La interpretación de los datos anteriores es que los AINEs, al impedir la lipólisis estimulada por el etanol, abaten el arribo de ácidos grasos al hígado, con lo que disminuye el acúmulo de triacilglicéridos en el hepatocito, existen menos sustratos susceptibles de ser atacados por las EOR, aparece menguada la lipoperoxidación (recuérdese que se trata de una reacción en cadena, un radical libre al incidir sobre un doble enlace $C = C$ genera 2 radicales libres, y cada uno de esos 2 genera, a su vez, otros dos radicales libres y así sucesivamente) y se "gasta" menos GT en abatir la poza de radicales libres, ya que hubo menos generación de los mismos.

Este ejemplo, al igual que muchos otros, ilustra como el efecto dominó a nivel molecular acaba dañando la estructura celular hepática por el etanol, así como el hecho de que al eliminar una ficha del dominó, la lipólisis, la falta de respuesta aparece en otra célula, la hepática, y en 3 indicadores diferentes, la poza de TAG, los niveles de TBARS, y la de GT.

Mensajeros recibidos y respuestas. Entre varios mensajes que recibe el hepatocito después de la ingestión de etanol, el que se revisa aquí con detalle se refiere a la epinefrina y los glucocorticoides. La selección obedeció a la demostración de que beber etanol en cantidades grandes produce un estrés con la liberación de epinefrina y glucocorticoides. Es más, la eliminación del eje pituitario adrenal en la rata que bebe etanol impide la aparición de la enfermedad alcohólica aguda en el hígado, esto es, no se observa esteatosis (17,67).

Cuando menos para el caso de la epinefrina, después de ingerir etanol en cantidades grandes, aumenta la concentración de la hormona en sangre (60) y aumentan los productos de su catabolismo en el orina (6). Es bien sabido que la epinefrina tiene una amplísima gama de efectos en diferentes tejidos. Por brevedad aquí se comentan únicamente cinco. La epinefrina estimula el consumo de oxígeno en el hígado (51). La epinefrina estimula el consumo hepático del propio etanol (75). La epinefrina potencia la toxicidad de otros hepatotóxicos distintos al etanol, por ejemplo el acetaminofén (98). La epinefrina disminuye los valores hepáticos de glutatión, principalmente del GSSG el cual activa su transferencia a los conductos biliares (106). Además la epinefrina promueve la formación de radicales OH^{*} en el hígado (19). Todo lo anterior puede interpretarse como que la epinefrina estimula la formación de EOR, mismas que son pobremente neutralizadas debido a los bajos niveles de glutatión hepático, lo que se traduce en una potenciación de tóxicos hepáticos, cuyo mecanismo de toxicidad es a través de la formación de radicales libres. Lo anterior podría aplicarse al etanol, los radicales libres generados por la intoxicación alcohólica potencian su acción tóxica debido a la presencia de la epinefrina (19). Si además, el hígado está recibiendo un aporte elevado de ácidos grasos saturados y poli-insaturados provenientes de los depósitos, es evidente que la reacción en cadena de la lipoperoxidación hepática ocurre en su máxima expresión a costa de los ácidos grasos poli-insaturados.

Suspensión del efecto dominó. El quitar una sola ficha suspende el efecto dominó. La idea es aplicable a la situación que nos ocupa y equivaldría al tratamiento de la enfermedad hepática causada por el etanol. Vale la pena escribir una línea de prevención. Desde el punto de vista médico, siempre será mejor la no ingestión de grandes cantidades de etanol al empleo de cualquier tratamiento que suspenda el efecto dominó.

Células de médula suprarrenal

Son las responsables de la síntesis de epinefrina y norepinefrina sistémica. Aquí no se analizan las acciones de las dos hormonas, ni la diversidad de tipos de receptores que poseen las diversas células del organismo para desencadenar un sinnúmero de respuestas específicas. De aplicación práctica para este trabajo es que el exceso de la ingestión de etanol a dosis elevadas (> 4 g/kg pc) promueve la liberación de epinefrina como parte de un cuadro más general de estrés (60).

A más de actuar en varios tejidos aquí sólo se mencionan las acciones de la epinefrina sobre los tejidos adiposo y hepático. En el tejido adiposo estimula la lipólisis y ocasiona una importante liberación de ácidos grasos no esterificados y de glicerol (63). Son bien conocidas las acciones de la epinefrina en el hepatocito, en este trabajo sólo se hizo énfasis en que estimulan el consumo de oxígeno, abaten los niveles de glutatión y favorecen la generación de EOR (ver párrafos anteriores), todo lo cual, en presencia del etanol y de los ácidos grasos recibidos por el hepatocito, potencian la acción nociva de ese etanol.

Adipocitos

La participación de los adipocitos en la enfermedad hepática por etanol ya quedó establecida: por acción de la epinefrina liberan ácidos grasos no esterificados y glicerol. Ambos sustratos son consumidos por otras células del organismo y los ácidos grasos en particular se concentran en el hepatocito. Evidencias experimentales adicionales resaltan la importancia de los ácidos grasos, y en particular de los ácidos grasos poli-insaturados, en la enfermedad alcohólica hepática por etanol (32).

En prácticamente todos los modelos experimentales subagudos donde se explora la acción del etanol sobre el hígado, se incluye la aplicación de dietas con un altísimo contenido de grasa, más de 30% de las calorías consumidas diariamente por el animal (113). Si disminuye el contenido de grasa en la dieta, no se obtienen las lesiones adjudicadas al etanol, en estricta realidad las acciones tóxicas detectadas en el hígado sólo se observan, y por lo tanto se deben, al efecto combinado del etanol y la dieta rica en grasa.

Por su parte, el grupo de Nanji ha demostrado que si la grasa de la dieta está constituida por ácidos grasos saturados disminuye en el hígado la expresión del RNAm del factor de necrosis tumoral- α (84) y no aparecen las lesiones que produce el exceso de etanol sobre el hígado, lesiones que si se observan cuando la grasa de la dieta contiene ácidos grasos poli-insaturados. Es más, con dietas enriquecidas en ácidos grasos saturados se revierte la necrosis, inflamación y necrosis que se producen por la administración de etanol, y se revierten aún cuando se continúen administrando altas concentraciones de etanol (86).

Un dato complementario de interés se incluye en la Fig. 1 en donde se demuestra que la lipoperoxidación hepática depende linealmente del contenido hepático de TAG (109). Finalmente vale la pena recordar que el sobrepeso por más de 10 años es uno de los 3 factores independientes de riesgo para desarrollar hepatitis y cirrosis (87). Obviamente el sobrepeso representa abundancia de sustrato para la lipólisis.

Células intestinales

La mucosa del tubo digestivo, en condiciones normales, permite el paso de pequeñas cantidades de macromoléculas (15). El beber etanol, ya sea en forma crónica como aguda, aumenta la permeabilidad del tubo digestivo al paso de macromoléculas; en una serie de experimentos en particular se demostró en intestino delgado aislado que el paso de endotoxinas por la mucosa aumenta en función de la dosis de etanol administrada (7). Por otra parte la ingestión crónica de etanol puede alterar la flora bacteriana del intestino y causar un mayor crecimiento de las bacterias gram-negativas (16). En consecuencia, la mayor cantidad de

endotoxinas en el tubo digestivo y la permeabilidad ampliada del mismo, asegura una elevación de las endotoxinas en la sangre de la vena porta, lo que ampliamente favorece una activación de las células de Kupffer (111).

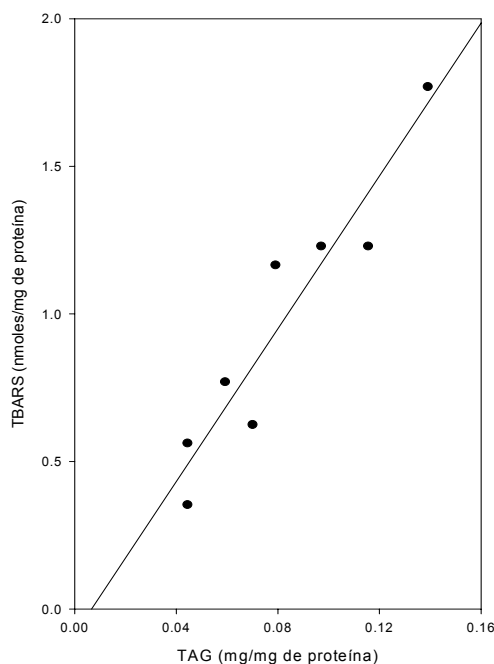


Fig. 1. En esta figura se ilustra cómo el grado de lipoperoxidación hepática depende la cantidad de TAG disponible en el propio hígado (Terrazos-Luch y *col*, referencia 109).

Cuando la flora intestinal es disminuida con administración de lactobacilos, que suspenden el crecimiento de bacterias gram-negativas, (79) o por medio de antibióticos (2), las lesiones hepáticas producidas en la rata por la administración oral de etanol son menores. Mientras que las lesiones hepáticas por alcohol se exacerbaban en la rata por la administración enteral de endotoxinas (72). La información disponible indica que la presencia de altas dosis de etanol facilitan el desarrollo de la flora de bacterias gram-negativas y el aumento en la permeabilidad de las células epiteliales del tracto digestivo, lo cual interviene positivamente en la aparición de la enfermedad hepática por alcoholismo.

Células endoteliales

Los sinusoides hepáticos forman una rica red vascular revestida de células endoteliales directamente adosadas a los hepatocitos, lo que facilita el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. Las células endoteliales son células planas, muy porosas, fenestradas que responden a hormonas e inhibidores (76). Desde el punto de vista volumétrico representan el 2.8% del total del parénquima hepático en la rata (14). Es sabido que las células endoteliales expresan un conjunto de moléculas de adhesión al ser inducidas por citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina (IL)-1 (74). Como consecuencia de la ingestión de etanol en el hígado hay una inflamación que en los modelos experimentales de rata se manifiesta por la presencia de neutrófilos infiltrados en el hígado, esto es, típicas células inflamatorias (45). Entre las moléculas de adhesión liberadas por las células endoteliales se sabe

que para una de ellas, la llamada ICAM-1 (por sus siglas en inglés intracellular adhesion molecule, ICAM) aumenta la expresión de su RNA mensajero (81). El ensayo de que una molécula como el ICAM-1 participara o no en la historia molecular de la enfermedad hepática por etanol se realizó con ratones a los cuales se les eliminó (knockout) del gene del ICAM-1 (59). Los resultados mostraron que en comparación con los ratones normales, los ratones sin gene (knockout) del ICAM-1 tratados con la misma dieta alta en lípidos y en etanol, hubo una disminución significativa en la aparición y gravedad de la enfermedad hepática causada por el etanol, esto es, menor esteatosis e inflamación, menor número de leucocitos infiltrantes y la expresión del RNAm del TNF- α no se observó en los ratones sin el gene ICAM-1 y sí se observó en los ratones normales. La conclusión de los investigadores (59) es que los datos demuestran que el ICAM-1 de las células endoteliales participa de manera importante en la enfermedad hepática por etanol, muy probablemente en un mecanismo en el que participa el TNF- α formado en el hígado a partir de las células Kupffer.

Leucocitos

En respuesta a una inflamación los leucocitos de la sangre se concentran en los sitios de la inflamación. Esta situación general es aplicable a la enfermedad hepática por ingestión de etanol. Es muy probable que moléculas de adhesión formadas en las células endoteliales hepáticas, del tipo ICAM-1, recluten leucocitos circulantes y favorezcan su acumulación en la glándula hepática. La activación de dichos leucocitos por la presencia de endotoxinas circulantes, tal como se comenta en el párrafo anterior, y por algunos otros factores locales, podrán promover en los leucocitos reclutados los mensajeros químicos ampliamente estudiados en otros procesos inflamatorios, los que al actuar en las células residentes en la glándula hepática, contribuirán a la patogénesis de la enfermedad hepática por etanol (59). Existe una breve revisión sobre las lesiones hepatocelulares mediadas por las células inflamatorias en general, y presente en la hepatitis alcohólica (33).

Eje hipotálamo suprarrenal

La administración de cantidades altas de etanol provoca estrés, y en el estrés existe una estimulación del eje hipotálamo suprarrenal, en el que un estímulo nervioso llega al hipotálamo del que salen factores liberadores, en este caso, sería el factor liberador de la hormona adrenocórtico trófica (ACTH) que al llegar a la hipófisis activa la salida del ACTH, misma que, vía sanguínea en la corteza suprarrenal acelera la síntesis de la hormona cortisol. En resumen, altas dosis de etanol estimulan la síntesis de cortisol. A su vez el cortisol, entre una de sus acciones, se encuentra la de activar la lipólisis de los tejidos periféricos. En la vieja literatura sobre el etanol y la movilización de ácidos grasos de los depósitos (para una revisión véase referencia 96), se señala que la hipofisectomía o la adrenalectomía (17,67) previenen la acumulación de lípidos en el hígado después de beber dosis agudas y elevadas de etanol. En bebedores humanos, adolescentes, los efectos son contundentes: la intoxicación alcohólica eleva los niveles plasmáticos de ACTH, 6 veces para los hombres y 10 veces para las mujeres, mientras que el cortisol se eleva 50% en hombres o mujeres (34). Esa elevación del cortisol activará la lipólisis en los tejidos periféricos con lo que contribuirá a elevar los ácidos grasos libres en suero y, sobre todo, a promover la formación del hígado graso.

De esta manera, la ingestión exagerada de etanol estimula la liberación de productos de las células del eje hipotálamo –hipófisis– suprarrenal, o sean células del sistema nervioso y de dos tipos de glándulas endocrinas, para contribuir a la enfermedad hepática por etanol.

Hormonas sexuales

En general las mujeres muestran mayor susceptibilidad a las lesiones hepáticas causadas por el etanol. En una muestra de 1,600 alcohólicos se identificaron los tres principales factores independientes de riesgo para desarrollar hepatitis y cirrosis: cantidad de etanol consumido, sobrepeso por al menos 10 años y ser mujer (87). En experimentos con ratas y dietas con alto contenido de grasas y etanol, la sensibilidad a este último es 2 veces mayor en ratas de sexo femenino en comparación con las del masculino (45). Los indicadores de toxicidad fueron escape de enzimas al suero, patología celular con indicadores numéricos, infiltración de neutrófilos, niveles circulantes de endotoxinas y expresión de ICAM-1. Además, el tratamiento con estrógenos eleva, en las células de Kupffer, la presencia del receptor DC-14 a la endotoxina (48). De alguna manera los estrógenos elevan la susceptibilidad de las células de Kupffer a algunos productos generados por la administración de etanol y coadyuvan a la manifestación de la enfermedad hepática por etanol.

Por otro lado, en adolescentes de género masculino intoxicados con etanol disminuyen los niveles plasmáticos de testosterona (34). Por último, la cantidad más alta de aductos de distintos aldehídos, provenientes de la intoxicación alcohólica, con diversas proteínas hepáticas se observó en pequeños cerdos castrados, el hígado de los cuales además mostró esteatosis, necrosis, inflamación e inducción de las enzimas del citocromo P450 (90).

Células de Kupffer

Las células de Kupffer constituyen el 80 al 90% de los macrófagos fijos al endotelio de los sinusoides hepáticos (13). Su principal función es fagocitar material de la sangre que circula por los sinusoides, las toxinas que arriban al hígado son particularmente fagocitadas por las células de Kupffer. En volumen las células de Kupffer ocupan el 21% del parénquima hepático (14), pero en cuanto al número de células puede llegar a ser el 10% del total de las células en el hígado (13). La hipótesis del efecto dominó, para mejor entender la enfermedad hepática por etanol, surgió en gran parte de los experimentos en los que se demuestra la participación central de las células de Kupffer, recibiendo mensajes de unas células y respondiendo con la liberación de otros mensajeros y con la generación de EOR (111). Una muestra evidente de la enorme importancia de las células de Kupffer en la patología de la enfermedad alcohólica es que su destrucción con cloruro de gadolinio ($GdCl_3$) impide los aumentos de enzimas séricas, la acumulación de grasa, la inflamación y la necrosis provocadas por la administración crónica de etanol a las ratas (1).

Mensajeros recibidos. El avance de los conocimientos alrededor del factor nuclear κB (NF- κB) en la fisiopatología de las respuestas a procesos inflamatorios crónicos (11) condujo a investigar su posible participación en la enfermedad hepática por etanol. A continuación se revisa la posible activación del NF κB por etanol, los genes cuya transcripción regula y que están

estrechamente vinculados con la enfermedad hepática por etanol, y los tres tipos de mensajeros identificados que requieren las células de Kupffer para activar el NF- κ B.

Se consideró que una inhibición en la activación del NF- κ B evitaría la aparición de la enfermedad hepática por etanol (115). Con el uso de un vector adenoviral se logró la super-represión de la proteína I κ B, indispensable para activar y translocar el NF- κ B, y con ello regular la transcripción de un grupo de genes blanco (11). Efectivamente, se previnieron las lesiones hepáticas experimentales observadas después de la intoxicación con etanol; en conclusión, se requiere de la activación y translocación del NF- κ B, regulando activamente un grupo de genes, para la aparición de las lesiones iniciales de la enfermedad hepática por etanol (115).

Se sabe de varios genes cuya transcripción regula el NF- κ B y que dan origen a proteínas de especial relevancia para el tema que nos ocupa: participan en el proceso inflamatorio, funcionan como mensajeros, algunas de ellas sintetizan pequeñas moléculas que a su vez actúan como moduladores de la función celular y están implicadas en la bioquímica patológica de la enfermedad alcohólica hepática. Entre tales genes es conveniente anotar los de: el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-12 (IL-12), la proteína quimiotáctica 1 de los monocitos (MCP-1), la proteína inflamatoria 2 de los macrófagos (MIP-2), la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS), y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (73;80,82,83,85).

La activación del NF- κ B se ha estudiado con detalle (10); para el caso de las células de Kupffer la activación del NF- κ B es una de las respuestas fundamentales en la instalación de la enfermedad hepática por etanol. Para que se dé esa activación es indispensable el arribo de mensajeros generados por el etanol fuera de las células de Kupffer, junto con otros moduladores formados por el etanol en el seno de dichas células de Kupffer. Hasta el momento se sabe que los mensajeros que vienen de fuera son las endotoxinas del intestino, el Ca²⁺ y el acetaldehído, a los que se unen las EOR (64), ya sean las formadas interior de las células de Kupffer o las provenientes de los hepatocitos, y todo ello en un medio con concentraciones elevadas de etanol. La participación de cada uno de ellos se revisa en seguida.

Las endotoxinas, producidas por las bacterias en el intestino al ingerir cantidades elevadas de etanol, están constituidas por lipopolisacáridos y llegan a las células de Kupffer debido a un aumento en la permeabilidad de las células intestinales por el etanol (7), donde en combinación con una elevada poza de etanol producen una sensibilización y activación de las mismas células que se manifiesta, entre otras cosas, por un aumento en la expresión del receptor de la endotoxina conocido como CD14 (119), un aumento en la expresión y actividad de la quinasa asociada al receptor de la interleucina-1 (120) y probablemente un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa (58).

La “mula” de seis, indispensable para integrar el efecto dominó aquí esbozado, lo constituyen las EOR presentes en el hígado de los sujetos intoxicados con etanol. En la presentación del hepatocito se revisó una de las hipótesis para generar EOR por la ingestión de etanol. Otra hipótesis se revisa en seguida. En los macrófagos activados, el principal sistema enzimático generador de oxidantes para dar origen a las EOR es la NADPH oxidasa (9). Como las células de Kupffer son macrófagos, se ensayó la participación de la NADPH oxidasa en el desarrollo de la enfermedad hepática por etanol, por medio de la tecnología de eliminar (knockout) el gene de la enzima. Así se probó la hipótesis de que los oxidantes provenientes de

la NADPH oxidasa participarán en las etapas tempranas de la lesión hepática producida por etanol. En ratones deficientes de NADPH oxidasa, de manera opuesta a como ocurre en el animal normal, el etanol no determinó un aumento en la producción de EOR, no hubo activación del NF- κ B, no hubo aumento del RNA mensajero para el TNF- α y no se detectó patología hepática. En conclusión, las EOR provenientes de la actividad de la NADPH oxidasa en las células de Kupffer tienen una participación predominante en la patogénesis de la hepatitis inducida por etanol (58).

Un indicador de la importancia de las EOR en el progreso de la enfermedad hepática por etanol lo constituye un experimento en el que se provocó la sobre-expresión del gene de la superóxido dismutasa (SOD) hepática en ratones y esos ratones se expusieron a altas dosis de etanol. Una sobre-expresión de la SOD impide esa inducción del receptor CD14, de NF- κ B y de algunas citocinas, aun cuando se administre el etanol (119).

Por otra parte, el Ca²⁺ interviene en la fisiología de las células de Kupffer y en la fisiología de todas las células de los organismos. Al estudiar los canales para el Ca²⁺ en las células de Kupffer se encontró que esos canales son dependientes de voltaje (43) y que la concentración intracelular del catión aumenta al doble a las 2 h de haberlas colocado en presencia de etanol (111). Además se ha demostrado que el Ca²⁺ es esencial para la activación de las células de Kupffer; en particular la síntesis de prostaglandinas estimulada por lipopolisacáridos es dependiente de Ca²⁺ (53). Es interesante que un bloqueador de los canales de Ca²⁺, la nimodipina, disminuya las lesiones inducidas por el etanol, lo cual apoya el papel crucial del Ca²⁺ en la activación de las células de Kupffer (46). Por último, existe información de que el acetaldehído activa la transcripción del NF- κ B, al menos en una línea de hepatocitos (100).

En resumen, el mensaje de las endotoxinas intestinales, las EOR, el Ca²⁺, el acetaldehído y el etanol activan el NF- κ B que regula la transcripción de genes cuyas proteínas son moduladoras de la inflamación.

Mensajeros liberados. Los genes activados por el NF- κ B en las células de Kupffer dan origen a un grupo de proteínas típicas de la respuesta inflamatoria que inciden en células vecinas (70) en este caso hepatocitos, células endoteliales, neutrófilos, células estelares y otras células. En tales células provocan sendas respuestas, las cuales dan apoyo a la hipótesis del efecto dominó en la enfermedad hepática aguda. Previamente se incluyeron algunas de las proteínas cuya inducción promueve el NF κ B, por brevedad sólo se comentará uno que manifiesta especial importancia: el TNF- α . Los experimentos que originaron la hipótesis del papel central de las células de Kupffer y los factores por ellas liberados aparecieron en 1989 (23). Más adelante se encontró una atenuación de las lesiones hepáticas al aplicar anticuerpos contra el TNF- α en ratas sometidas a la administración crónica con etanol (47). La demostración concluyente del papel esencial del TNF- α en la lesión hepática promovida por el etanol se obtuvo con el uso de ratones a los cuales se les eliminó el gene (knockout) del receptor 1 para el TNF- α (121): en estos ratones la administración crónica de una dieta alta en lípidos y etanol, por 4 semanas consecutivas, no produjo en el hígado severa esteatosis macrovesicular, inflamación focal, ni necrosis, a diferencia de lo observado en ratones poseedores del gene del receptor. El TNF- α , como prototipo de una molécula pro-inflamatoria, produce una abigarrada respuesta, de la que se menciona algunos aspectos aplicables a la enfermedad hepática por etanol. El TNF- α : inhibe la síntesis de proteínas en hepatocitos cultivados de rata (77), estimula la migración y

activación de neutrófilos e induce a proteasas así como la liberación de EOR (110), produce estrés oxidativo mitocondrial consecuente a muerte celular (38) y es importante en la génesis de EOR en las mitocondrias de los hepatocitos (4,30,40), estimula a las células endoteliales de los sinusoides para sintetizar moléculas de adhesión tipo ICAM-1 (12), interviene en el desarrollo de la esteatosis hepática causada por etanol (27), evoca la apoptosis (104), activa una esfingomielinasa que opera a pH neutro (3), aumenta la poza de ceramida, mensajero común para la transducción de señales para varios factores (3).

En suma, el TNF- α produce una vasta gama de efectos que dependen en parte de la concentración a la que se encuentre y del tiempo durante el cual actúa. De lo que no hay duda es de que es indispensable para establecer la enfermedad hepática por etanol, y de que en esa situación las células de Kupffer son sus principales productores y de que modula la función de muchas otras células.

Células estelares

Originalmente se identificaron como células de Ito, su descubridor; también se llaman lipocitos, células almacenadoras de grasa o células estrelladas o células perisinusoidales. Se trata de células no parenquimatosas y fibrogénicas que se localizan en oquedades entre los hepatocitos y las células de Kupffer, dispersas en el espacio perisinusoidal de Disse (76). En la rata y calculado por volumen las células de Ito representan el 1.4% del total del hígado (14); sin embargo, otros datos indican que constituyen el 15% del total de células residentes en el hígado (36). Forman un grupo heterogéneo de células anatómica y funcionalmente similares pero diferentes en su expresión de filamentos del citoesqueleto, sus contenidos de retinoides y sus potenciales para producir matriz extracelular (55). Son las células del organismo de los mamíferos con mayor contenido de vitamina A (42). La respuesta de las células estelares a la administración crónica de etanol está estrechamente ligada a la matriz extracelular del hígado, por lo que es adecuado mencionar algunos aspectos básicos de dicha matriz. En el hígado humano normal el 4% de la proteína es colágena (101), mientras que en la rata sólo lo es el 0.55% (102). En el hígado humano normal, los estudios bioquímicos han identificado a la colágena intersticial y el 53% es de tipo I y el 47% es de tipo III (101); mientras que en la rata normal el 60% es del tipo I y el 40% es de tipo III (102). La colágena tipo I se localiza predominantemente en la superficie del hígado en la cápsula de Glisson y en el tejido conectivo portal; la colágena tipo III predomina en el área perisinusoidal (71). A diferencia de otros tejidos, en el hígado no existe una membrana basal que se interponga entre el plasma y la célula parenquimatosa, el hepatocito, con lo que se facilita el intercambio de metabolitos entre ambos compartimentos, no obstante en algunos sitios se encuentra una membrana basal descontinuada (71). Un componente constante en el espacio perisinusoidal es la fibronectina, cuya función puede ser similar a la que se le observa a esa proteína en los estadios tempranos del desarrollo, ser una matriz extracelular primaria, menos limitante en términos de filtración que la membrana basal de otros tejidos (71), pero que si es un soporte para las células. Esa matriz extracelular provee, además, de señales que mantienen las funciones diferenciadas de las células vecinas. Durante la lesión celular la matriz extracelular se asemeja a una cicatriz y deteriora la función hepatocelular.

Activación de las células estelares. Es el evento dominante en la fibrogénesis y se lleva a cabo con cambios progresivos en la función celular. Como consecuencia de una lesión hepática

de cualquier etiología las células estelares se activan, esto es, ocurre una transición de células quiescentes a células proliferativas, fibrogénicas y miofibroblastos contráctiles. Se trata de una respuesta pleiotrópica, estrechamente programada y reproducible. Para su estudio se ha dividido en dos estadios: iniciación y perpetuación. La iniciación incluye un conjunto de cambios rápidos a la expresión de genes y en el fenotipo que hacen a las células capaces de responder a citocinas y otros estímulos locales. La perpetuación se refiere a los cambios celulares que conducen a una implicación del fenotipo activado, que se logra a través de una mayor capacidad de respuesta a las citocinas.

Los estímulos iniciadores de la activación de las células estelares provienen de los hepatocitos, las células endoteliales y las células de Kupffer. Entre ellas se tienen las EOR cuya génesis se ha mencionado con anterioridad, la cual como también se relató cursa con una disminución de antioxidantes, en particular el GSH. La sobre-expresión del citocromo P450 2E1 en las células estelares aumenta la poza de EOR y estimula la expresión del gene de la colágena I, el efecto es menor si se aplican antioxidantes (92). La lesión de las células endoteliales hepáticas estimula la producción de una variante de la fibronectina que activa las células estelares (52) y que por otra parte convierten al factor transformante de crecimiento β -1 latente (TGF- β 1) en una forma activa fibrogénica, a través de la activación de plasmina (35). Al menos media docena de genes se encienden en las células estelares, aquí se anotan sólo unos ejemplos, uno es el formador de moléculas de adhesión (ICAM-1) (41), que favorece la presencia de células pro-inflamatorias *in situ*, el gene llamado KLF6 (95) que activa genes reguladores de acumulación de la matriz extracelular (54), y genes que aumentan la expresión del gene de la colágena, a través de la participación de proteínas y factores de transcripción (22).

Perpetuación de las células estelares. En el estadio de perpetuación de las células estelares ocurre un aumento de respuestas a las citocinas a través de múltiples mecanismos (35), entre ellos, el aumento en la expresión de los receptores situados en la membrana celular y una mayor señalización (para una revisión ver Pinzani y *col* referencia 94). Se ha hecho notar que en especial el receptor de tirosina cinasas está sobre-regulado en la lesión hepática (5), se conoce que dicho receptor en las células estelares es el mediador de las respuestas a las citocinas.

Simultáneo a la fase de perpetuación de las células estelares se observa una remodelación de la matriz extracelular (35), la matriz subendotelial de baja densidad es remplazada de manera progresiva por una matriz formadora de fibras de colágena que repercute en la fisiología de las células como los hepatocitos, las células endoteliales y las propias células estelares, en las cuales acelera su activación (37). En este sentido se caracterizó un receptor de tirosina cinasa que responde a la colágena (105,117) cuyo RNAm está presente en las células estelares (5) que explica por qué la colágena tipo I ocasiona la perpetuación en la activación de las células estelares (5,105).

Se han descrito un conjunto de respuestas fenotípicas en las células estelares activadas por cualquier tipo de lesión que sufra el hígado. Si se mantiene la lesión hepática se perpetúa la activación de las células estelares y progresa la enfermedad hepática. Excelentes resúmenes sobre estas respuestas fenotípicas se encuentran en los trabajos de Friedman (35,37). Aquí sólo se enlistan los cambios y se anotan la o las moléculas que de manera especial favorecen el cambio anotado. Como podrá constatarse, el efecto dominó aquí introducido para darle unidad a

la enfermedad hepática por alcohol, en el caso de las células estelares alcanza su máxima expresión.

Respuestas fenotípicas de las células estelares a la lesión hepática (por etanol). Se han identificado:

Proliferación. Aumento en el número de células estelares cuyos receptores de tirosina cinasas responden al principal factor proliferativo identificado, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, cuya acción requiere de captura de Ca^{2+} extracelular (94).

Contractilidad. La mayor contractilidad de más células estelares es un mecanismo importante de elevación en la resistencia de la vena Porta durante la lesión hepática. El principal estímulo para hacer las células contráctiles es la endotelina 1, parcialmente de origen autócrino y que contribuye a la proliferación de las células estelares (99).

Fibrogénesis. Las células estelares son las productoras de la matriz extracelular en el hígado, y aunque existe un buen número de citocinas que las estimulan para formar colágena (37), la principal de todas ellas es el factor transformante de crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ por sus siglas en inglés) (35) de distintos orígenes, el más importante el autócrino (39). A la acción del TGF- $\beta 1$ se suma la acción de la colágena autoprotetuyendo su formación, tal como se mencionó líneas arriba.

Degradación de la matriz. Las células estelares tienen la capacidad de sintetizar el total de moléculas con actividad proteolítica responsables de degradar y remodelar los distintos componentes de la matriz extracelular presente en el hígado. Dichas moléculas aceleran la activación de las células estelares y aparecen al haber una lesión del hígado (8,56). Las proteínas que degradan el endotelio normal de la matriz extracelular son la metalo-proteínasa 2 de la matriz y la estromelisin/MMP-3 (8). Con la degradación del subendotelio normal se acelera el remplazo de la matriz extracelular por fibras formadoras de colágena con lo que se activa el crecimiento de las células estelares y la producción de la metaloproteínasa-2 (31).

Quimiotaxis de las células estelares. La migración de las células estelares activadas aumenta su acumulación en áreas de lesión. Los agentes quimiotácticos identificados son el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y la proteína quimiotáctica 1 de monocitos (69).

Pérdida de retinoides. La activación de las células estelares conlleva la pérdida de vitamina A almacenada intracelularmente. Se ignora si la pérdida de retinoides se requiere para iniciar la activación celular o si es la activación de las células la que provoca la pérdida de esos retinoides. Se estudian la causa y las consecuencias (37).

Liberación de citocinas y quimioatracción de leucocitos. La mayor producción y actividad de las citocinas son críticas para mantener la perpetua activación de las células estelares. Al respecto es conveniente considerar dos aspectos: todos los factores requeridos para la activación de las células estelares provienen de citocinas de origen autócrino (35) y la matriz extracelular hepática es un reservorio importante de factores de crecimiento los cuales se unen a la matriz referida (35).

La relevancia de las células estelares en la enfermedad hepática por etanol se amplifica al considerar que además de todo lo mencionado dichas células pueden amplificar la inflamación

por medio de moléculas con actividad quimioattractante de neutrófilos y monocitos, por ejemplo con la proteína quimioattractante-1 de monocitos (68).

Conclusión

Tomando al etanol como ejemplo de agente agresor se ofrece en este trabajo un resumen de la complejísima respuesta del hígado al ser lesionado. Para que avance la enfermedad hepática, el agente agresor afectará las células del organismo no sólo las hepáticas, y el agente agresor (en este caso el etanol) más la respuesta de muchas otras células provoca la participación de varios cientos de moléculas que de manera secuencial organizada y jerarquizada definen la situación de la lesión hepática, su gravedad, velocidad de afectación y sobre todo su reversibilidad. En algunos experimentos es notable la limitación en el progreso de la enfermedad al eliminar una etapa importante, al quitar una ficha del dominó que evita la aparición o activación del suceso consecutivo en el avance de la enfermedad hepática. Un aspecto estimulante en el estudio de la enfermedad hepática crónica es que ahora se considera reversible. Si bien existen muchas dudas sobre el mecanismo que facilita la reversibilidad, dada la tremenda complejidad del proceso, cada vez existen más situaciones, moléculas, estilos de vida y medicamentos que permiten vislumbrar un panorama más promisorio.

Los bioquímicos trabajan intensamente para que los médicos encuentren los mejores procedimientos terapéuticos para eliminar las fichas del dominó que con certeza eviten el progreso de la enfermedad hepática.

Agradecimientos

- a) Proyecto IN211402/3 PAPIIT, DGAPA, UNAM
- b) PAPCA-FES Iztacala, UNAM.

De manera especial a la señora Alejandra Palomares por escribir una y otra y otra y otra vez el manuscrito original.

Referencias

1. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK y Thurman RG (1994). Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20:453-460.
2. Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gav W, Thurman RG (1995). Antibiotics prevent liver injury in rats following long term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 108:218-224.
3. Adam-Klages S, Adam D, Wiegman K, Struve S, Kolanus W, Schenider-Mengener J y Kronke M (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 86:937-947.
4. Adamson GM y Billings RE (1992). Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 294:223-229.
5. Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS y Friedman SL (1998). Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 17: 115-121.
6. Anton AH (1965). Ethanol and urinary catecholamines in man. *Clin Pharmacol Therap* 6: 462-469.
7. Arai M (1986). Effect of ethanol on the intestinal uptake of endotoxin (Abstract). *Nippon Shokakibyō Grakkai Zasshi* 83:1060.

8. Arthur MJ (1995). Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol* 22; Suppl 2, 43-48.
9. Badwey JA y Karnovsky ML (1980). Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem* 49: 695-726.
10. Baeuerle PA y Baltimore D (1996). NF- κ B: ten years after. *Cell* 87:13-20.
11. Barnes PJ y Karin M (1997). Nuclear factor κ B- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Eng J Med* 336:1066-1071.
12. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS y Gimbrone MA (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9238-9242.
13. Biozzi G y Stiffel C (1965). The physiopathology of the reticuloendothelial cells of the liver and spleen. *Progr Liver Dis* 2:166-191.
14. Blouin A, Bolender RP y Weibel ER (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. *J Cell Biol* 72: 441-445.
15. Bode JC (1980). Alcohol and the gastrointestinal tract. En: *Advances in Internal Medicine and Pediatrics*, editado por Frinck HP, Harnack GA, Martini GA y Prader A. Springer-Verlag. Heilderberg pp. 1-75.
16. Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr H-K y Martini GA (1984). Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 31:30-34.
17. Brodie BB, Buther WN Jr, Honing MG, Maickel RP y Maling HM (1961). Alcohol-induced triglyceride deposition in liver through derangement of fat transport. *Am J Clin Nutr* 9:432-435.
18. Bueneka Im Klajner F, Orrego H, Vidins E, Blandis L y Israel Y (1987). Antibodies against acetaldehyde-modified protein epitopes in human alcoholics. *Hepatology* 7:1210-1214.
19. Castrejón-Sosa M, Villalobos-Molina R, Guinzberg R y Piña E (2002). Adrenaline (via α_{1B} -adrenoceptors) and ethanol stimulate OH \cdot radical production in isolated rat hepatocytes. *Life Sci* 71: 2469-2474.
20. Cederbaum AI, Wu D, Mari M y Bai J (2001). CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HEP G2 cells. *Free Rad Biol Med* 31:1539-1543.
21. Chance B, Sies H y Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
22. Chen A y Davis BH (1999). UV irradiation activates JNK and increases alpha I (I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 274: 158-164.
23. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Krack U, Peters T y Decker K (1989). Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. *J Leukoc Biol* 45:139-146.
24. Dianzani MU (1991). Biochemical aspects of fatty liver. En *Hepatotoxicology*. Meeks RG, Harrison SD y Bull RJ. CRC Pres. Boca Raton pp. 327-399.
25. Dicker E y Cederbaum AI (1988). Increased oxygen radical-dependent inactivation of metabolic enzymes by liver microsomes after chronic ethanol consumption. *FASEB J* 2:2901-2906.
26. DiLuzio NR y Kalish GH (1966). Enhanced peroxidation of lipid in the pathogenesis of acute ethanol-induced liver injury. *Gastroenterology* 50: 392-396.
27. Feingold KR, Hardardottir I y Grunfeld C (1994). Cytokine-induced alterations in hepatic lipid metabolism. En: *Cytokines and the liver* Eds Gerok W, Decker K, Andus T y Gross V. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht pp. 172-181.
28. Fernández V y Videla LA (1981). Effect of acute and chronic ethanol ingestion on the content of reduced glutathione of various tissues of the rat. *Experientia* 37:398-394.
29. Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Ookhlens M y Kaplowitz N (1991). Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondrial from ethanol-fed rats. *J Clin Invest* 87:397-405.
30. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite M y Morales A (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol induced defect. *Am J Physiol* 273:G7-G17.
31. Fibbi G, Pucci M, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, Casini A, Miliani S y Del Rosso M (1999). Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology* 29:868-878.

32. French SW (1993). Nutrition in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 28:97-109.
33. French SW (2002). Alcoholic hepatitis, inflammatory cell-mediated hepatocellular injury. *Alcohol* 27:43-46.
34. Frias J, Rodriguez R, Torres JM, Ruiz E y Ortega E (2000). Effects of acute alcohol intoxication on pituitary-gonadal axis hormones, pituitary-adrenal axis hormones β -endorphin and prolactin in human adolescents of both sexes. *Life Sci* 67: 1081-1086.
35. Friedman SL (1999). Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 19: 129-140.
36. Friedman SL (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275:2247-2250.
37. Friedman SL (2003). Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol* 38:s38-s53.
38. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC (1995). Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 48:825-834.
39. Gressner AM (1995). Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 22; Suppl 2, 28-36.
40. Goossens V, Grooten J, Vos KD y Fiers W (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8115-8119.
41. Hellerbrand C, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA y Rippe RA (1996). Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated stellate cells. *Hepatology* 24:670-676.
42. Hendriks HFJ, Verhoofstad WAMM, Boruwer A, DeLeeuw AM y Knook DL (1985). Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res* 160:138-149.
43. Hijjota R, Rosenberg RL, Lemasters JJ y Thurman RG (1991). Kupffer cells contain voltage-dependent calcium channels. *Mol Pharmacol* 41:435-440.
44. Hoerner N, Behrens UJ, Worner T y Lieber CS (1986). Humoral immune response to acetaldehyde adducts in alcoholic patients. *Res Comm Chem Path Pharmacol* 54:3-12.
45. Iimuro Y, Frankenberg MV, Artee GE, Bradford BU, Wall CA y Thurman RG (1997a). Female rats inhibit greater susceptibility to early alcohol-induced injury than males. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272:G1186-G1194.
46. Iimuro Y, Ikejima K, Rose ML, Bradford BU y Thurman RG (1997b). Nimodipine, a dehydropyridine-type calcium channel blocker, prevents alcoholic hepatitis due to chronic intragastric ethanol exposure in the rat. *Hepatology* 24:391-397.
47. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H y Thurman RG (1997c). Antibodies to tumor necrosis factor- α attenuate hepatic necrosis and inflammation due to chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 26:1530-1537.
48. Ikejima K, Enomoto N, Iimuro J, Ikejima D, Fang D, Xu J, Forman DT, Brenner DA y Thurman RG (1998). Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol* 274 (*Gastrointest Liver Physiol* 37): G669-G676.
49. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S y col (1998). Mechanism of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 102:538-549.
50. Iredale JP (2001). Stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 21:427-436.
51. Israel Y, Videla L y Bernstein J (1975). Liver hypermetabolic state after chronic ethanol consumption: hormonal interrelations and pathogenic implications. *Federation Proc* 34:2052-2059.
52. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS y Bissell DM (1994). Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 127:2037-2048.
53. Kawada M, Mizoguchi Y, Kobayashi T, Monna T y Morisawa S (1992). Calcium-dependent prostaglandin biosynthesis by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 47:209-214.

54. Kim Y, Ratziu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang O, Kim SJ y Friedman SL (1998). Transcriptional activation of transforming growth factor beta 1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/score promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanism for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 273:33750-33758.
55. Knittel, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubawer K, Piscaglia F y Ramadori G (1999a). Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: differential cell populations of the fibroblasts lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117: 1205-1221.
56. Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubawer K, Mehde M, Eichhorst S y Ramadori G (1999b). Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 154: 153-167.
57. Kono H, Bradford BU, Yin M, Sulik KK, Koop DR, Peters JM, Gonzalez FJ, McDonald T, Dikalova A, Kadiiska MB, Mason RP y Thurman RG (1999). CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol* 277:G1259-G1267.
58. Kono H, Rusyn M, Yin M, Gäbele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM y Thurman RG (2000). NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 106:867-872.
59. Kono H, Uesugi T, Froh M, Rusyn I, Bradford BU y Thurman RG (2001). ICAM-1 is involved in the mechanism of alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1289-G1295.
60. Kovács GL, Soronez M y Tegyes I (2002). Plasma catecholamines in ethanol tolerance and withdrawal in mice. *Eur J Pharmacol* 448:151-156.
61. Krebs HA (1968). The effects of ethanol on the metabolic activities. *Adv Enzym Regul* 6: 467-480.
62. Krebs HA (1973). Piridyn nucleotides and rate control. *Symp Soc Exp Biol* 27: 299-318.
63. Lafontan M y Berlan M (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34:1057-1091.
64. Li N y Karin M (1999). Is NF-kappa β the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13:1137-1143.
65. Lieber CS (1988). Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med* 319:1639-1650.
66. Lundquist F, Tygstrup N, Winkler K, Mellemggaard K y Munch-Petersen S (1962). Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver. *Clin Invest* 41:954-961.
67. Mallov S (1957). Effect of adrenalectomy on ethanol and fat metabolism in the rat. *Am J Physiol* 189:428-432.
68. Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G y Gentilini P (1998). Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 152:423-430.
69. Marra F, Romanelli RG, Geannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P y Gentilini P (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 29:140-148.
70. Martínez F, Abril ER, Earnest DL y Watson RR (1992). Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol* 9:455-458.
71. Martínez-Hernández A. (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 51:57-74.
72. Mathurin P, Deng QG, Kerhavarzian A, Choudhary S, Holmes EW y Tsukamoto H (2000). Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 32:1008-1017.
73. McClain CJ, Hill D, Schmidt J y Diehl AM (1993). Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 13: 170-182.
74. Menger MD, Richter S, Yamauchi J y Vollmar B (1999). Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatogastroenterology* 46, Suppl 2:1452-1457.
75. Mezey E, Potter JJ, Sharma S y Akinshola E (1990). Effect of epinephrine on ethanol metabolism by isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 40: 2473-2478.
76. Miyai K (1991). Structural organization of the liver. En: *Hepatotoxicology*. Meeks RG, Harrison SD y Bull RJ. CRC Press Boca Raton pp. 1-65.

77. Monden K, Arai S, Itai S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji y Tobe T (1991). Enhancement and hepatocyte-modulating effect of chemical mediators and monokines produced by hepatic macrophages in rats with induced sepsis. *Res Exp Med (Berl)* 191:177-187.
78. Müller A y Sies H (1982). Role of alcohol dehydrogenase activity and of acetaldehyde in ethanol-induced ethane and pentane production by isolated perfuse rat liver. *Biochem J* 206: 153-156.
79. Nanji AA, Khettry U y Sadrzadeh SMH (1994a). Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 205:243-247.
80. Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SMH y Waxman DJ (1994b). Use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction to evaluate in vivo cytokine gene expression in rats fed ethanol for long periods. *Hepatology* 19:1483-1487.
81. Nanji AA, Griniuviene B, Jacoub LK, Fogt F y Tahan SR (1995a). Intracellular adhesion molecule-1 expression in experimental alcoholic liver disease: relationship to endotoxemia and TNF α messenger RNA. *Exp Mol Pathol* 62:42-51.
82. Nanji AA, Greenberg SS, Tahan SR, Fogt F, Loscalzo J, Sadrzadeh SMH, Xie J y Stamler JS (1995b). Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: role in protection from injury. *Gastroenterology* 109: 899-907.
83. Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR y Dannenberg AJ (1997a). Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 112:943-951.
84. Nanji AA, Zakin D, Rahemtulla A, Daly T, Mias L, Zhao S, Khwaja S, Than SR y Dannenberg AJ (1997b). Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* 26: 1538-1545.
85. Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR y Su GL (1999). Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 30:934-943.
86. Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A y Dannenberg AJ (2001). Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 299:638-644.
87. Neveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert F, Capron F y Chaput JC (1997). Excess weight factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 25:108-111.
88. Newsholme EA y Leech AR (1983). Biochemistry for the Medical Sciences. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. pp 472-480.
89. Niemelä O, Klajner F, Orrego H, Vidins E, Blendis L e Israel Y (1987). Antibodies against acetaldehyde-modified protein epitopes in human alcoholics. *Hepatology* 7:1210-1214.
90. Niemelä O, Parkkila S, Pasanen M, Viitala K, Villanueva JA y Halsted CH (1999). Induction of cytochrome P450 enzymes and generation of protein-aldehyde adducts are associated with sex-dependent sensitivity to alcohol-induced liver disease in micropigs. *Hepatology* 30:1011-10117.
91. Niemelä O (2001). Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radical Biol Med* 31:1533-1538.
92. Nieto N, Friedman SL, Greenwel P y Cederbaum AI (1999). CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 30:987-996.
93. Nomura F y Lieber CS (1981). Binding of acetaldehyde to rat liver microcosms: enhancement after chronic consumption. *Biochem Biophys Res Comm* 100: 131-137.
94. Pinzani M, Marra F y Carloni V (1998). Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 18:2-13.
95. Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S y Friedman SL (1998). Zf9, A Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9500-9505.
96. Reitz RC (1979). The effect of ethanol ingestion on lipid metabolism. *Progr Lipid Res* 18:87-115.
97. Riveros RJ, Julián-Sánchez A y Piña E (2003). Mortalidad atribuible al alcoholismo en México. No publicado.
98. Roberts SM, DeMott RP y James RC (1997). Adrenergic modulation of hepatotoxicity. *Drug Metabolism Rev* 29:329-353.

99. Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Crayon A, Vallee P, Rey C y Housset C (1998). Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effect in stellate cells. *Hepatology* 27: 472-480.
100. Roman J, Colell A, Blasco C, Caballería J, Pares A, Rodes J y Fernández-Checa JC (1999). Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF- κ B. *Hepatology* 30:1473-1480.
101. Seyer JM, Hutcheson ET y Kang AH (1977). Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* 59:241-248.
102. Seyer JM (1980). Interstitial collagen polymorphism in rat liver with CCl₄-induced cirrhosis. *Biochem Biophys Acta* 629:490-498.
103. Shigenaga MK, Hagen TM y Ames BN (1990). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771-10778.
104. Shinagawa T, Joshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y y Takayanagi M (1991). Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of TNF and interferon- γ . *J Pathol* 165:247-253.
105. Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb M, Glass DJ, Lemke G y Yancopoulos GD (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1:25-34.
106. Sies H y Graf P (1985). Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem J* 226: 545-549.
107. Siler SQ, Neese RA y Hellerstein MK (1999). De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole body lipid balances in human after acute alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 70: 928-936.
108. Speisky H, MacDonald A, Giles G, Orrego H e Israel Y (1985). Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem J* 225:565-572.
109. Terrazos-Luch J, Corona-García S, Zentella-de Piña M, Ramírez-González D y Piña-Garza E (1997). Butylated hydroxytoluene prevents hepatic damage induced by food oil. *Proc West Pharmacol Soc* 40:97-99.
110. Thiele DL (1989). Tumor necrosis factor, the acute phase response and the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology* 9: 497-499.
111. Thurman RG (1998). Mechanism of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275:G605-G611.
112. Trémolières J y Carré L (1961). Etudes sur les modalités d'oxidation de l'alcool chez l'homme normal et alcoolique. *Rev l'Alcool* 7:202-227.
113. Tsukamoto H, Gaal K y French SW (1990). Insights into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis: status report. *Hepatology* 12:599-608.
114. Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S y Brittenham GM (1995). Experimental liver disease induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 96:620-630.
115. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Gabele E, Wheeler MD y Thurman RG (2001). Delivery of I kappa B supressor gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Hepatology* 36:1149-1157.
116. Videla L, Bernstein J e Israel Y (1973). Metabolic alteration produced in the liver by chronic alcohol administration. Increased oxidative capacity. *Biochem J* 134:507-514.
117. Vogel W (1999). Discoidin domain receptor: structural relations and functional implications. *FASEB J* 13: (suppl.) 77-82.
118. Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason R, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M y Thurman RG (2001). Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J Biol Chem* 276:36664-36672.
119. Wheeler MD y Thurman RG (2003). Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. *J Biol Chem* 278:8435-8441.
120. Yamashina S, Wheeler MD, Rusyn I, Ikejima K, Sato N y Thurman RG (2000). Tolerance and sensitization to endotoxin in Kupffer cells caused by acute ethanol involve interleukin-1 receptor-associated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 277:686-690.
121. Yin M., Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI y Thurman RG (1999). Essential role of tumor necrosis factor α in alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 117:942-952.

122. Zentella de Piña M, Diaz Belmont A, Rodriguez Lizárraga L y Piña E (1991). Importance of age upon the increase in DHL₂-cholesterol in the alcoholic. *Arch Invest Med Mex* 22:223-227.
123. Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A. y Piña E (1992). Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett* 298:123-125.
124. Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y, Hernández-Tobías A y Piña E (1993). Non-steroidal anti-inflammatory drugs lower ethanol mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcoholism Clin Exp Res* 17:1228-1232.
125. Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernández AE, Saldaña-Balmori Y, Cabrera G y Piña E (1994). Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. *Life Sciences* 54:1433-1439.
126. Zentella de Piña M, Vázquez-Meza H, Piña-Zentella G, Pimentel L y Piña E (2002). Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine-and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Pharmacy Pharmacol* 54:577-582.
127. Zentella de Piña y col (2003). Datos no publicados.

Semblanza del Dr. Enrique Piña Garza.



Es médico cirujano por la Facultad de Medicina de la UNAM. Obtuvo en 1969 el grado de Doctor en Bioquímica en la Facultad de Química de la misma UNAM. Realizó estudios sobre Bioquímica genética con el Dr. Edward L. Tatum (Premio Nobel, 1958), del Instituto Rockefeller en New York. Ha colaborado en los Laboratorios de los Drs. Gordon Sato, Antony J. Andreoli y Otto H. Weiland de la Universidad de California en San Diego, la Universidad del Estado de California en los Ángeles y el Hospital del Estado de Baviera en Munich, respectivamente. En la Facultad de Medicina UNAM es profesor desde hace 46 años. También ha ocupado los cargos de Jefe del Departamento de Bioquímica, Coordinador de Investigación y Secretario General. Ha sido Profesor Titular en 64 cursos de licenciatura y posgrado. Ha dirigido 34 tesis, la mitad de ellas en el posgrado. Algunas actividades académico-administrativas desempeñadas por el doctor Piña en la UNAM: fungir como Secretario Académico de la Coordinación del Sistema de Universidad Abierta (SUA), Director General de Estudios de Posgrado y Encargado de la Dirección de la Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado (UACPyP). En la Secretaría de Salud estuvo a cargo del Laboratorio de Investigación del Hospital General de la Ciudad de México y de la Dirección General de los Efectos del Ambiente en la Salud; además fue Director General de Investigación en Salud. Es autor de 3 libros de texto y 136 trabajos de investigación, la mayoría publicados en revistas extranjeras; así como editor de 6 libros especializados. Ha colaborado escribiendo en 30 libros, varios internacionales; ha presentado cerca de 270 trabajos en congresos nacionales e internacionales. Pertenece a numerosas sociedades científicas, entre ellas la Academia Nacional de Medicina y la Academia Mexicana de Ciencias. Fungió como Presidente de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. de la cual además es Socio Fundador. Forma parte del Sistema Nacional de Investigadores con el Nivel III. Le fue otorgado el reconocimiento como Profesor Emérito de la Facultad de Medicina y el Premio Universidad Nacional 1993 de Docencia en Ciencias Naturales por parte de la UNAM. Además, se le ha distinguido con los premios "Dr. Eduardo Liceaga" y "Dr. Miguel Otero" del Consejo de Salubridad General de la SSA.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

EXPERIMENTACIÓN EN EL PEZ-CEBRA, UN MODELO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

Ernesto Maldonado

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior,
Ciudad Universitaria, Coyoacán, Apartado Postal 70-243 México, DF. 04510 MEXICO
Tel. 56-22-56-39
emaldona@ifisiol.unam.mx

Introducción

Aunque les voy a hablar de peces, nuestra historia comienza con una mosca llamada *Drosophila melanogaster*, que es el nombre científico de la mosca de la fruta. En 1973 una joven llamada Christiane Nusslein-Volhard realizaba sus estudios de doctorado en el Instituto Max-Planck de la ciudad de Tübingen, Alemania, en un proyecto de biología molecular en el que purificaba y estudiaba las propiedades de una RNA polimerasa de origen viral. En un principio, este proyecto le pareció interesante, sin embargo, luego de un tiempo se volvió tedioso y aburrido. Buscando otros temas de investigación, se entusiasmó con las lecturas de los trabajos de Alfred Kühn sobre la biología del desarrollo y con ciertos reportes acerca de la regeneración de la hidra. En ese momento se percató del interesante problema de la formación de patrones corporales durante el desarrollo embrionario. Por la misma época, su atención fue captada por el trabajo de un profesor del mismo Instituto Max-Planck, llamado Friedrich Bonhoeffer, quién

realizaba la mutagénesis en *Escherichia coli* y había aislado diferentes mutantes, encontrando varios genes novedosos. Sin embargo, lo que realmente atrajo su atención, fue la sofisticada metodología con la que el grupo de Bonhoeffer generaba y aislaba una gran cantidad de mutantes. Nusslein-Volhard llegó a la conclusión de lo útil que sería aplicar las poderosas técnicas de la genética molecular a los problemas del desarrollo embrionario.

Nusslein-Volhard concluyó su doctorado y en 1975 se mudó a la ciudad de Basel en Suiza para iniciar un postdoctorado en el laboratorio de Walter J. Gehring, en donde de manera entusiasta inició su trabajo con las moscas de la fruta o "*Drosophila*". El enfoque principal del laboratorio de Gehring era el de clonar genes interesantes para la biología del desarrollo. Con la ayuda del estudiante de doctorado Eric Wieschaus, pronto aprendió todas las técnicas necesarias para estudiar a los embriones de líneas mutantes de *Drosophila*.

Pasado un tiempo, Nusslein-Volhard comenzó a sentirse frustrada ya que los métodos para colectar e inspeccionar a los embriones le parecían tediosos e insatisfactorios. Así pues, y siguiendo su espíritu innovador, se asoció con otros postdoctorados (Jeanette Holden, David Ish Horowicz y Jitse van der Meer) y desarrolló algunas técnicas que le facilitaron el trabajo, tales como un sistema para la colecta simultánea (en bloques) de huevos de varias líneas de moscas, o un protocolo para la fijación y aclaramiento de la cutícula de los embriones que le permitieron observar la estructura, segmentos y polaridad en los embriones.

Para el año de 1978 recibió una oferta de trabajo por tres años, para compartir un laboratorio con Eric Wieschaus en el "European Molecular Biology Laboratory" (EMBL) que recientemente se había fundado. Nusslein-Volhard convenció a Wieschaus de que en ese momento eran las únicas personas en el mundo capaces de llevar a cabo una mutagénesis en gran-escala buscando mutantes de la fase embrionaria de *Drosophila*. Con la participación de dos técnicos se lanzaron a una empresa titánica, pero convencidos de que sería sumamente provechosa. Inventaron metodologías novedosas para incrementar la eficiencia en su trabajo, lo que les permitió aislar en 3 meses 4200 mutantes en genes localizados en el cromosoma 2 de la mosca, el cual contiene el 40% de su DNA.

Este fue el inicio de un trabajo por el que Christiane Nusslein-Volhard y Eric Wieschaus compartieron el premio Nobel en el año de 1995. Para el momento en que Nusslein-Volhard recibió el premio Nobel muchas cosas habían pasado. En 1986 un artículo firmado por George Streisinger de la Universidad de Oregon [1] atrajo su atención; en este manuscrito Streisinger sugería que el Pez-cebra (un pez de ornato que usualmente se consigue en tiendas de mascotas) podía ser utilizado como un modelo para el análisis genético del desarrollo embrionario en vertebrados.

Desde ese momento Nusslein-Volhard decidió repetir su mutagénesis en gran escala pero ahora en el Pez-cebra, obviamente en ese momento no existían precedentes ni siquiera para planear la logística con la que llevar a cabo este enorme proyecto que requeriría de cientos de miles de peces.

Finalmente en 1992, en su nuevo laboratorio del Instituto Max-Planck de la ciudad de Tübingen en Alemania, se inauguró un vivero con 7000 acuarios destinados a la enorme búsqueda de mutantes del Pez-cebra. Varias personas fueron claves para este proyecto, entre las que se encontraban los estudiantes Stefan Schulte-Merker y Matthias Hammerschmidt,

quienes junto con la Dra. Nancy Hopkins (profesor en visita sabática del MIT) comenzaron desde 1988 a establecer la infraestructura para el proyecto. La participación de Wolfgang Driever (un exalumno de Nusslein-Volhard) y de su estudiante Liliana Solnika-Krezel fue también crucial, ya que 25% del experimento se llevó a cabo en su laboratorio de la ciudad de Boston en los Estados Unidos.

Los resultados de este proyecto se dieron a conocer en diciembre de 1996 cuando la revista *Development* publicó un número especial (conocido como el “*Zebrafish issue*”) con 37 artículos, en el que se describen 1200 mutantes del Pez-cebra. Cada mutante con uno o más aspectos del desarrollo embrionario afectados.

¿Por qué estudiar la biología del desarrollo en un pez?

El Pez-cebra es un organismo modelo ideal para estudiar la genética y el desarrollo en organismos vertebrados [2-4]. Debido a que embriogénesis ocurre externamente además de que los embriones son transparentes, lo que permite observar en el microscopio todos los estadios de su desarrollo, y seguir con detalle las primeras divisiones celulares y la formación de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (figura 1). El desarrollo de este organismo es rápido y a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). Para los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales (figura 1). En este momento el pez es perfectamente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento [5].

Los análisis genéticos y la disponibilidad de material biológico se facilitan por la cantidad de embriones (entre 100 y 200 individuos) que una sola pareja de peces puede producir cada semana. El Pez-cebra es diploide y con ciclos generacionales cortos (de 2 a 3 meses), los adultos tienen un tamaño de 3 centímetros, por lo que en un laboratorio acondicionado con 50 tanques (cada uno del tamaño de la caja para un ratón) se puede albergar una colonia de al menos 500 peces. Aunado a esto, el genoma completo del Pez-cebra se está secuenciando y ya existen mapas muy precisos de marcadores genéticos.

A la par de una descripción detallada de la anatomía del embrión y la larva del Pez-cebra, se han desarrollado metodologías robustas que permiten la experimentación en varios aspectos como son: la localización de proteínas “*in vivo*” por medio de fusiones de la proteína verde fluorescente (GFP), el apagado específico de genes empleando morfollinos (RNA antisentido) así como la ablación y el transplante de células [6, 7].

Una segunda mutagenesis en gran escala en el pez-cebra

Una manera de descifrar la función de un gen, consiste en inactivarlo dentro de un organismo modelo y observar el efecto que tiene sobre el desarrollo del individuo. Cuando se obtiene una mutante en el Pez-cebra y se determina con certeza qué gen está mutado, se genera una combinación ideal de conocimiento, ya que podemos predecir la función del gen (o la

proteína que codifica) y tenemos una herramienta para estudiar cómo participa este gen en el desarrollo. Un ejemplo de lo anterior es la mutante del Pez-cebra "*Weissherbst*", en la que se produce una anemia letal y cuyo gen mutado corresponde a la *Ferroportina-1*. La mutante *Weissherbst* se ha estudiado con detalle y ahora se sabe que la función de esa enzima es la de participar en el transporte de hierro durante el desarrollo del sistema hematopoyético [8].

Con el trabajo de mutagénesis a gran escala en el Pez-cebra que llevaron a cabo los grupos de Christiane Nusslein-Volhard y Wolfgang Driever hace 7 años, generaron 1200 mutantes que afectan el desarrollo, cuyos fenotipos son tan interesantes que de conocerse todos los genes que producen dichas mutaciones, nuestro conocimiento de la biología se incrementaría sustancialmente, incluyendo la causa de varias enfermedades hereditarias en humanos. Sin embargo, a la fecha solo se han logrado identificar 100 de los genes mutados. Esto se debe a que las mutaciones fueron inducidas con un mutágeno químico (Etil-nitroso-urea) y para identificar los genes responsables primero hay que determinar en qué cromosoma está la mutación y después ubicar su posición con exactitud (clonamiento posicional) para después aislarlo (clonarlo) y secuenciarlo. Así, la identificación de un solo gen representa una tarea enorme que puede emplear el trabajo de un solo investigador por un año o más. La otra manera de identificar los genes mutados, es por medio de la estrategia del "*gen candidato*", en la cual se compara el fenotipo de la mutante de Pez-cebra con mutantes similares en otros organismos como la *Drosophila* o el ratón en los cuales ya se conoce una gran colección de genes mutados.

Recientemente, entre los años de 1998 y 2002, el grupo de la Dra. Nancy Hopkins en el Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT) de la ciudad de Boston, llevó a cabo una nueva mutagénesis en gran escala, pero empleando una novedosa metodología conocida como "*mutagénesis-insercional*", que básicamente permite generar a las mutantes en el Pez-cebra, pero al mismo tiempo identificar fácilmente a los genes responsables de la mutación (figura 2).

La diferencia principal entre la mutagénesis de Nusslein-Volhard y esta nueva *mutagénesis-insercional* consiste en lo siguiente: en lugar de utilizar un mutágeno químico se emplea a un retrovirus, el cual infecta a las células de los embriones e inserta de manera aleatoria fragmentos de DNA en el genoma del pez. La idea es de que algunas de estas inserciones van a colocarse interrumpiendo genes del desarrollo y entonces producirán las mutantes que se están buscando. En un ensayo piloto en el que se obtuvieron ocho mutantes [9-13], se demostró que por cada 100 inserciones se puede generar una mutante en el desarrollo del Pez-cebra.

Las inserciones retrovirales se integran en forma estable en el genoma del pez, de tal manera que varias generaciones después continúan presentes. Para identificar el gen que tiene una mutación, se corta el DNA en fragmentos y con la técnica llamada hibridización *southern blot* se localiza el fragmento que alberga la inserción y que provoca el fenotipo mutante. Como el DNA que flanquea por ambos lados a la inserción corresponde al gen mutado, es posible basarse en su secuencia para determinar de qué gen se trata. Lo anterior se logra a partir de comparaciones contra las bases de datos genómicas.

Con la *mutagénesis-insercional* a gran escala se logró introducir más de 50,000 inserciones retrovirales en el genoma del Pez-cebra y obtuvimos cerca de 500 mutantes de las cuales hemos identificado a la fecha un poco más de 300 genes [14, 15].

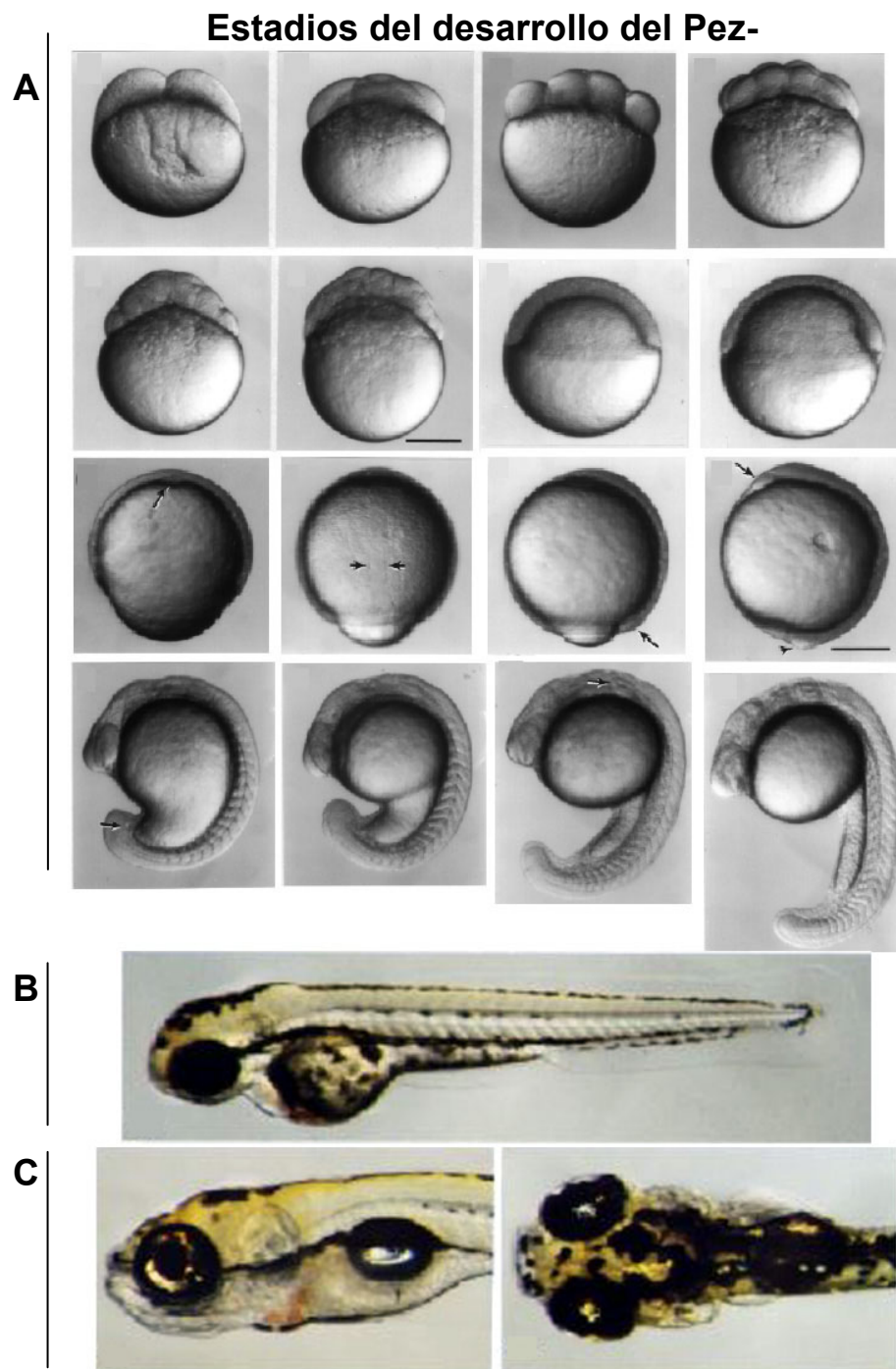


Figura 1. Estadios de desarrollo en el Pez-cebra (*Danio rerio*). (A) Se presentan las primeras 18 horas del desarrollo. La primera división celular ocurre 45 minutos después de la fertilización y las siguientes divisiones cada 15 minutos, aquí se muestran los eventos de blastulación, epíbole, gastrulación y somitogénesis. También se muestra a la larva del Pez-cebra a los 2 días (B) y 5 días de desarrollo (C).

Protocolo de la mutagénesis insercional

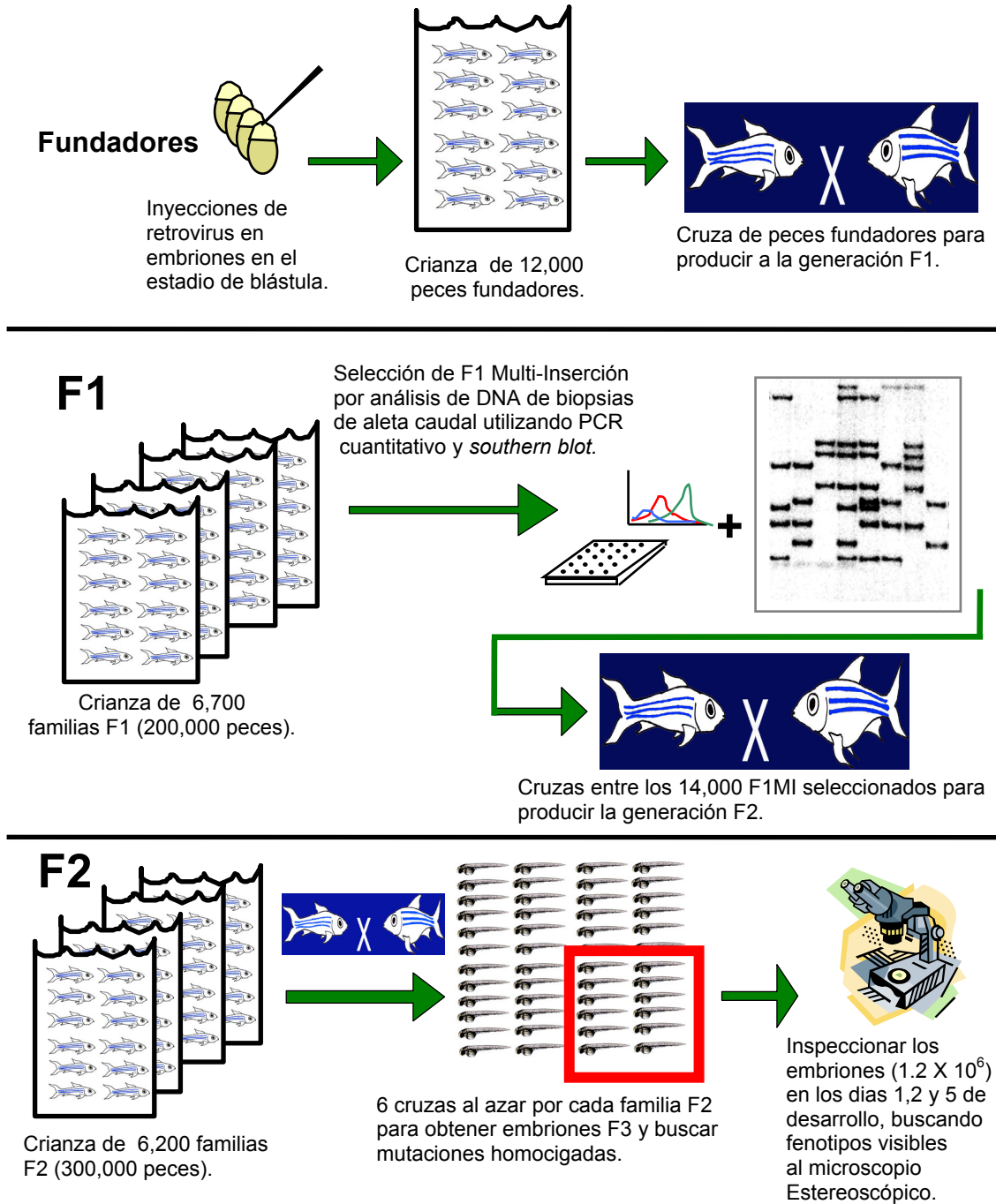


Figura 2. Diagrama de flujo de la mutagénesis insercional en gran escala. Los embriones en el estadio de blástula son inyectados con el retrovirus y después se crían hasta la madurez sexual. Estos peces fundadores se cruzan entre sí dando lugar a la generación F1. Entre los peces F1 se seleccionan aquellos con mayor número de inserciones, para ello se utiliza la técnica de PCR cuantitativo y *southern blot*. Estos peces con alta densidad de inserciones se denominaron F1MI (F1 Multi-Inserción). Se hacen cruzas entre los F1MI y por cada cruce se cría a una familia F2. Se seleccionan parejas al azar por familia F2 y se llevan a cabo cruces para obtener embriones F3, que son inspeccionados en busca de las mutaciones que se han homocigado.

Este proyecto consistió en la inyección de un retrovirus pseudotipificado de alto título a 250,000 embriones en el estadio de blástula (figura 2). Después de 4 horas se seleccionaron los embriones con mayor número de eventos de inserción retroviral y estos fueron criados hasta la etapa adulta (12,000 peces fundadores).

En los organismos diploides cada cromosoma está por duplicado, lo que significa que cada gen está representado dos veces. Para poder observar el efecto de una mutación es necesario homocigarla, es decir que ambas copias del gen estén afectadas. Para homocigar las mutaciones y para aumentar el número de inserciones por cada pez, se produjeron 2 generaciones consecutivas de peces (F1 y F2, respectivamente) de la siguiente manera: los 12,000 peces fundadores fueron cruzados entre ellos para producir 200,000 peces de la generación F1 (primera generación), los cuales son mosaicos para las inserciones (cada célula con inserciones distintas) (figura 2). Posteriormente y para simplificar el trabajo y maximizar el espacio fue necesario identificar a los peces F1 con el mayor número de inserciones (llamados F1MI o F1 Multi-Inserción). Los F1MI se identificaron por medio del análisis del DNA tomado de biopsias de la cola de peces adultos de 8 semanas de edad. El número de inserciones se determinó por PCR cuantitativo y análisis tipo "southern". Con este método se seleccionaron 14,000 peces F1MI, cada uno de los cuales con un promedio de 10 inserciones retrovirales. Las generaciones F1 y F2 ya no son mosaicos para las inserciones ya que todas las células cargan con las mismas inserciones.

Por cada pareja sexual de peces F1 se produjo una familia F2 de alrededor de 48 individuos. La generación F2 consistió de 6,200 familias (300,000 peces adultos). Debido a que tanto el macho como la hembra F1 aportan sus genes con inserciones al 50% de su descendencia F2, al llevar a cabo cruces al azar entre miembros de la familia F2, aumenta la probabilidad (86% con 6 cruces) de que se crucen dos peces con exactamente la misma inserción retroviral. De ocurrir esto, el 25% de la descendencia homocigará la inserción y de ser mutagénica (1 de cada 100 inserciones) se obtendría una mutación en algún gen involucrado en el desarrollo del pez.

Se realizaron 40,000 cruces entre peces F2 y se inspeccionaron cuidadosamente los embriones F3 (aproximadamente 1.2×10^6 individuos), mientras tanto, se mantuvo a cada pareja progenitora separada del resto de la familia hasta completar el análisis. Los embriones se mantuvieron a 28°C y las observaciones se realizaron en microscopios estereoscópicos en los días 1, 2 y 5 del desarrollo. Lo que se buscaba era cualquier alteración del desarrollo que estuviese presente en 25% de los embriones.

Por cada 12.6 familias analizadas se encontró una mutante insercional, dando un total de 489 mutante recesivas y letales en la embriogénesis, además de 4 mutantes dominantes (figura 3). Se encontraron mutantes afectadas en el desarrollo del cerebro, la notocorda, la cresta neural, la espina dorsal, los ojos, los oídos, y otros órganos sensoriales (como la línea lateral), la mandíbula, el tejido muscular, la pigmentación, los riñones, el páncreas, el hígado, el estómago, el intestino, el corazón, los vasos sanguíneos, además de mutantes en las que se encontró alterado el crecimiento, el comportamiento o la motilidad. También se obtuvieron mutantes con defectos tan severos y generales que los embriones no se desarrollaban o presentaban una necrosis general muy temprana (figura 3)

Algunas mutantes obtenidas en la mutagénesis insercional

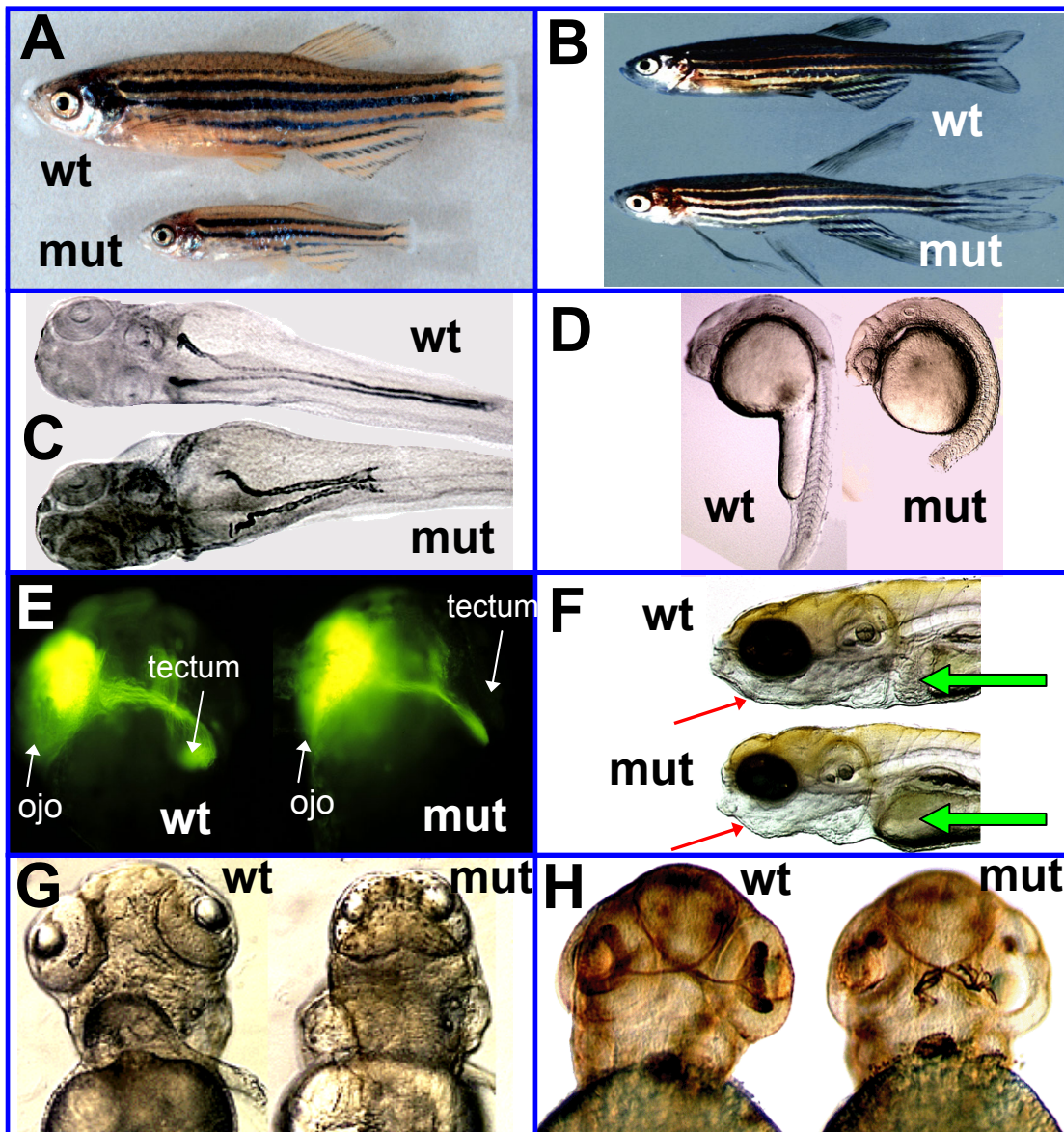


Figura 3. Se muestran algunos ejemplos de las mutantes obtenidas. (A) y (B) son mutantes dominantes para el gen *ef1A* (factor de elongación) y un canal rectificador de sodio-potasio, respectivamente. Los fenotipos observados corresponden a un menor crecimiento general (A) y un crecimiento exagerado de las aletas (B). En (C) se observan larvas de 3 días de edad en las que se aprecia una hibridación "in situ" que marca el pronefros (precursor del riñón en peces). El gen mutado corresponde a *HNF1β* y su mutación produce defectos en el desarrollo del pronefros. Esta preparación fue hecha por la Dra. Zhaoxia Sun. (D) Se observa el efecto de la mutación del factor transcripcional *caudal* en embriones de 24 horas de desarrollo. (E) La falta del gen *N-caderina* tiene efectos en la formación del cerebro del Pez-cebra, aquí se aprecia como los axones que van del ojo al tectum están alterados en la mutante, para apreciar esto se realizaron inyecciones del colorante DiO en el ojo izquierdo de larvas fijadas al quinto día de desarrollo. En (F) se observa una mutante con defectos en la formación de la mandíbula (flechas rojas) y en donde el hígado no se forma (flecha verde), el gen mutado es nuevo y no se ha estudiado con anterioridad. Una mutación en la subunidad Z del Complejo *Coatómero* produce una fusión de los ojos (G) y la inserción retroviral en el gen *neurogenina* produce que los axones que normalmente conectan el ojo y el tectum, ahora se conectan a músculos de la mandíbula (H) esto se aprecia con un marcaje de anticuerpo que revela a los axones en las larvas de 3 días de desarrollo. Esta preparación fue hecha por el Dr. Wenbiao Chen.

La metodología para identificar los genes mutados consiste en obtener DNA de los padres F2, de otros portadores F2 en la familia y de los embriones F3 que muestran el fenotipo. El DNA se corta con enzimas de restricción y se analiza con un ensayo tipo “*southern*”, utilizando como sonda a un fragmento complementario a cierto segmento del DNA de origen retroviral . El objetivo del experimento es identificar una banda del mismo peso molecular entre los padres y los embriones con el fenotipo (que suponemos que es la misma). Encontrar la misma banda en otros miembros de la familia F2 (portadores) nos permite, por medio de cruces, confirmar que esa banda representa a un fragmento de DNA que contiene a la inserción retroviral flanqueada por el gen interrumpido y mutado. Posteriormente se toman los fragmentos del DNA cortado por las enzimas de restricción y se ligan en cierto plásmido, se selecciona la construcción del tamaño predicho (la suma del peso molecular de nuestra banda de interés y el plásmido) y se amplifican las secuencias flanqueantes al inserto por PCR inverso. Los productos amplificados se secuencian y dicha información se compara contra bases de datos de los genomas de otros organismos (como la del NCBI) utilizando el programa BLAST, lo anterior con la intención de determinar la identidad del gen mutado por su similitud con homólogos de otras especies.

Entre los más de 300 genes que se clonaron, se encontraron varias enzimas del metabolismo anabólico y catabólico, también DNA polimerasas, RNA polimerasas, factores transcripcionales, proteínas que participan en la replicación del DNA, la traducción de la información genética, el tráfico vesicular o son componentes de la cromatina, diversas proteasas, chaperoninas, ATPasas, RNA helicasas, proteínas ribosomales, así como varios receptores y ligandos involucrados en transducción de señales, también canales iónicos, glicoproteínas y además toda una gama de proteínas cuya función es totalmente desconocida [15]

Conclusión

La *mutagénesis insercional* es una técnica novedosa que permite utilizar las poderosas herramientas de la genética molecular para encontrar y determinar la función de genes que participan durante el desarrollo de organismos vertebrados. El Pez-cebra es un modelo ideal para llevar a cabo proyectos ambiciosos con presupuestos moderados, además de poseer ventajas que lo hacen un gran modelo experimental.

Referencias

1. Streisinger, G., et al., *Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish*. Genetics, 1986. **112**(2): p. 311-9.
2. Talbot, W.S. and N. Hopkins, *Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome*. Genes Dev, 2000. **14**(7): p. 755-62.
3. Ingham, P.W., *Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(10): p. 1755-60.
4. Eisen, J.S., *Zebrafish make a big splash*. Cell, 1996. **87**(6): p. 969-77.
5. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
6. Nasevicius, A. and S.C. Ekker, *Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 216-20.
7. Amsterdam, A., et al., *Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 99-103.

8. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
9. Amsterdam, A., et al., *Retrovirus-mediated insertional mutagenesis in zebrafish and identification of a molecular marker for embryonic germ cells [In Process Citation]*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1997. **62**: p. 437-50.
10. Culp, P., C. Nusslein-Volhard, and N. Hopkins, *High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7953-7.
11. Gaiano, N., et al., *Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 829-32.
12. Lin, S., et al., *Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish*. Science, 1994. **265**(5172): p. 666-9.
13. Allende, M.L., et al., *Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development*. Genes Dev, 1996. **10**(24): p. 3141-55.
14. Amsterdam, A., et al., *A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish*. Genes Dev, 1999. **13**(20): p. 2713-24.
15. Golling, G., et al., *Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 135-40.

Semblanza del Dr. Ernesto Maldonado.



El Dr. Ernesto Maldonado realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias de la UNAM (1994) y de Doctorado en la Facultad de Química de la UNAM (1998). Realizó una estancia Postdoctoral en el laboratorio de la Dra, Nancy Hopkins en el "Center for Cancer Research" del Instituto Tecnológico de Massachussetts (1999-2000) como becario de la fundación norteamericana "PEW TRUST". Durante su estancia en el laboratorio de la Dra. Hopkins se entrenó en la utilización del Pez-cebra como modelo de Biología del desarrollo. Actualmente es Investigador Asociado C del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y miembro de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

EL NEMATODO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO DE ESTUDIO DEL DESARROLLO

Rosa Estela Navarro González

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-600
México DF 04510, MEXICO
navarro@ifisiol.unam.mx

Introducción

El nematodo *C. elegans* es fácil de manipular en el laboratorio, tiene un genoma pequeño, una anatomía simple y esto lo convierte en un organismo modelo muy atractivo para estudiar los mecanismos de acción de sus genes, su funcionamiento y regulación. En este organismo podemos estudiar preguntas tan diversas tales como: ¿Cómo se forma un organismo?, ¿Por qué envejecen los seres vivos?, ¿Cómo funcionan las neuronas?, ¿Cómo se diferencia una célula?, ¿Qué determina el comportamiento de un organismo? y muchas otras más.

El surgimiento del *C. elegans* como un organismo modelo

En su carta dirigida a Max Perutz en 1963, Sydney Brenner (uno de los fundadores de la Biología Molecular) comenta que después del descubrimiento de la estructura del DNA, él sentía que las preguntas clásicas más interesantes de la Biología Molecular ya habían sido o serían contestadas muy pronto. Él consideraba que la investigación en esta área debía ser dirigida hacia algo más biológico, como el estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan el desarrollo de un organismo y el funcionamiento del sistema nervioso [1]. Para estudiar el desarrollo, Brenner decidió elegir un animal pequeño en donde pudiera hacer análisis genéticos y bioquímicos y que presentara características parecidas a los microorganismos que se usaban en esa época. Las características que debía presentar este organismo modelo eran: ser multicelular, tener un ciclo de vida corto, fácil crecimiento en el laboratorio y con una numerosa descendencia para poder hacer estudios genéticos y estadísticos. Además, este organismo modelo debía presentar un número pequeño de células, que se diferenciarán en un patrón constante, para poder conocer el destino celular de cada una de ellas. Brenner se propuso trabajar con un nematodo pequeño, de tan solo 1 mm de largo, conocido como *Caenorhabditis elegans* que es de vida libre y se alimenta principalmente de bacterias. Este organismo que se encuentra principalmente en forma de hermafrodita, puede autofecundarse o cruzarse por reproducción sexual. Cada animal puede tener cerca de 200 embriones transparentes que se desarrollan fuera de la madre y que pueden ser observados fácilmente. El ciclo de vida de estos animales es muy corto, con un período de embriogénesis que dura aproximadamente 14 horas (Figura 1) y su crecimiento larvario que se completa en tan solo tres días. Cuando alcanza la madurez sexual tiene solo 959 células que están organizadas en epidermis, aparato digestivo, reproductor, nervioso y muscular (Figura 2). Brenner inició sus estudios identificando el destino celular de cada una de las células que componen a este organismo durante la embriogénesis, con el propósito de obtener un linaje celular. También se propuso aislar mutantes para hacer estudios genéticos. De este modo, Brenner y colaboradores publicaron en 1974 el primer artículo sobre el estudio del *C. elegans*, en donde se describe cómo cultivar a este organismo en el laboratorio, además de una colección de mutantes que sirven hasta la fecha como marcadores genéticos [2]. John Sulston y Robert Horvitz, convencidos por Brenner, se abocaron a la minuciosa tarea de observar en el microscopio cada una de las divisiones celulares que ocurren durante la embriogénesis del *C. elegans* (Figura 1) y determinar el linaje celular de este organismo, el cuál es el único que se ha completado hasta el momento. En 1977 y 1983 Sulston, Horvitz y colaboradores publicaron dos artículos en donde reportan el linaje celular del *C. elegans* durante la embriogénesis [3, 4]. En este trabajo, Sulston y Horvitz describieron cómo cada una de las células de este nematodo tiene un destino distinto, es decir, que puede diferenciarse en célula del aparato digestivo, en una neurona, en una célula germinal, etc.

Estos autores se sorprendieron al observar que algunas de las células de este organismo tenían como destino morir, y así fue como se descubrió por primera vez la muerte celular programada o apoptosis. Interesados en este fenómeno, Sulston y Horvitz realizaron una serie de mutaciones con el fin de encontrar a los genes involucrados en la muerte celular programada (Figura 3). Sus hallazgos fueron sorprendentes, ya que descubrieron a los genes que participan en la apoptosis de cualquier organismo vivo incluyendo a los humanos [5]. Debido a sus valiosas contribuciones en el campo de la Biología del Desarrollo y la Apoptosis, en el 2002 Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina. ¿Quién hubiera creído que estudiar el desarrollo de un organismo tan sencillo, y tan

poco parecido a un ser humano, iba a conducir al descubrimiento de mecanismos básicos del funcionamiento de los seres vivos?

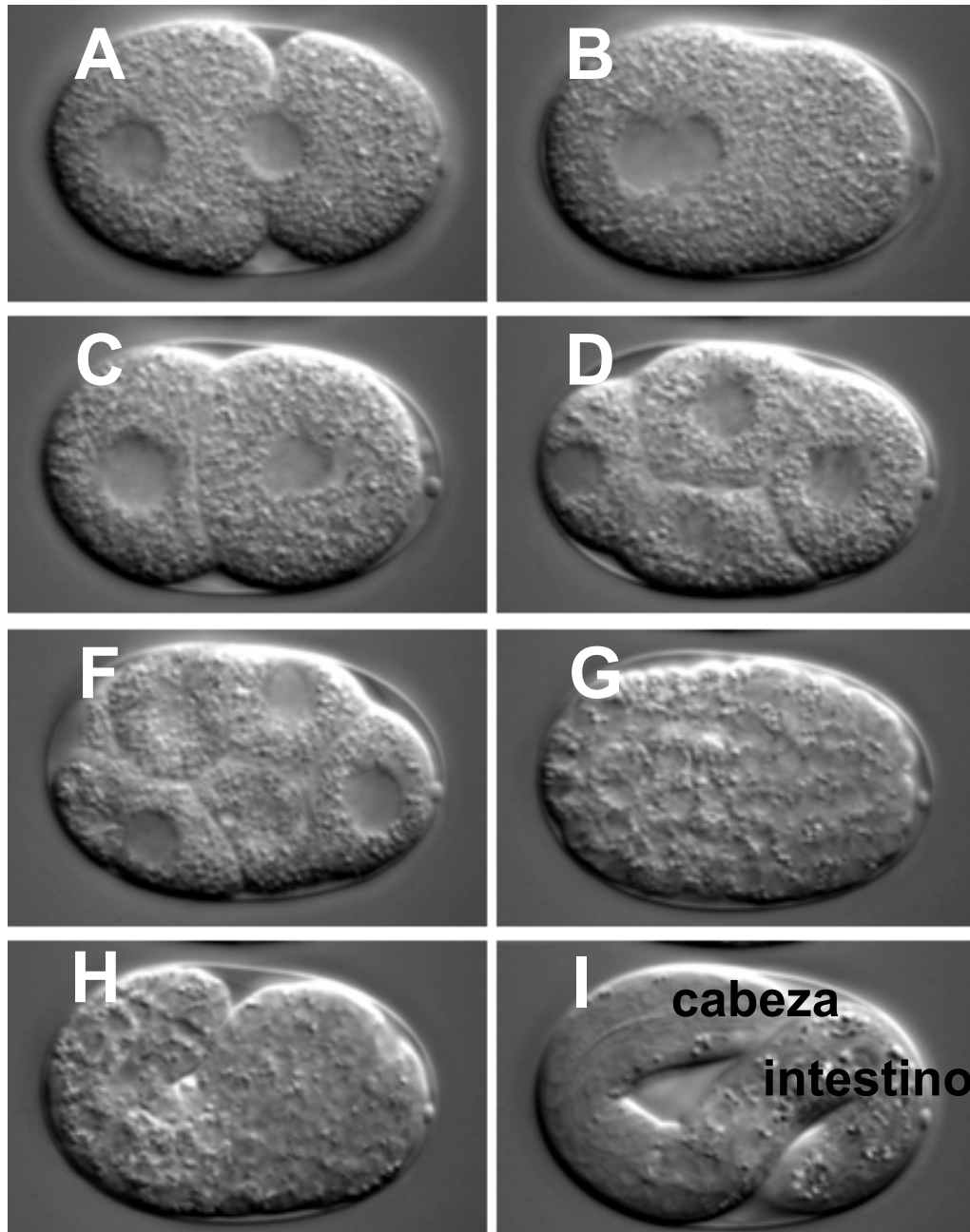


Figura 1. Desarrollo embrionario del *C. elegans*. Los embriones son transparentes lo que facilita su observación y aquí se muestran en microscopía tipo Nomarski. Se muestran embriones de una (A y B), dos (C), cuatro (D), siete (E) y aproximadamente 100 células (F). En H se muestra a un embrión en gastrulación y en I a un animal totalmente formado y a punto de salir del huevo. En A y B se puede apreciar la migración de núcleo paterno y materno para fusionarse antes de llevarse a cabo la primera división. La embriogénesis se completa en 14 horas.

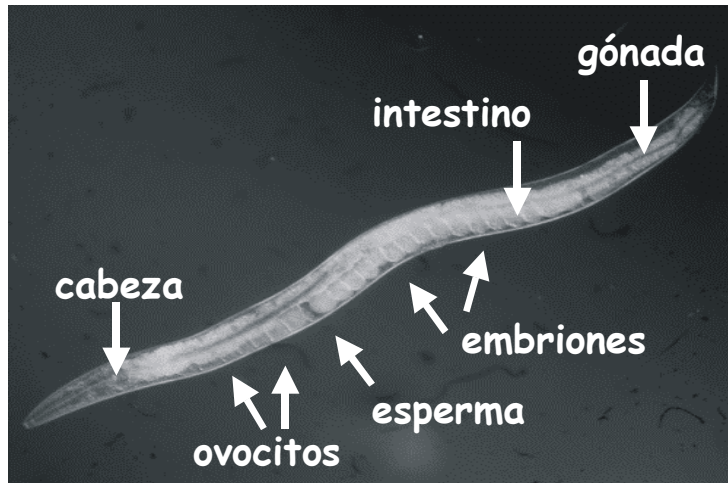


Figura 2. *C. elegans* adulto. Se puede apreciar la transparencia del animal y las estructuras que lo componen.

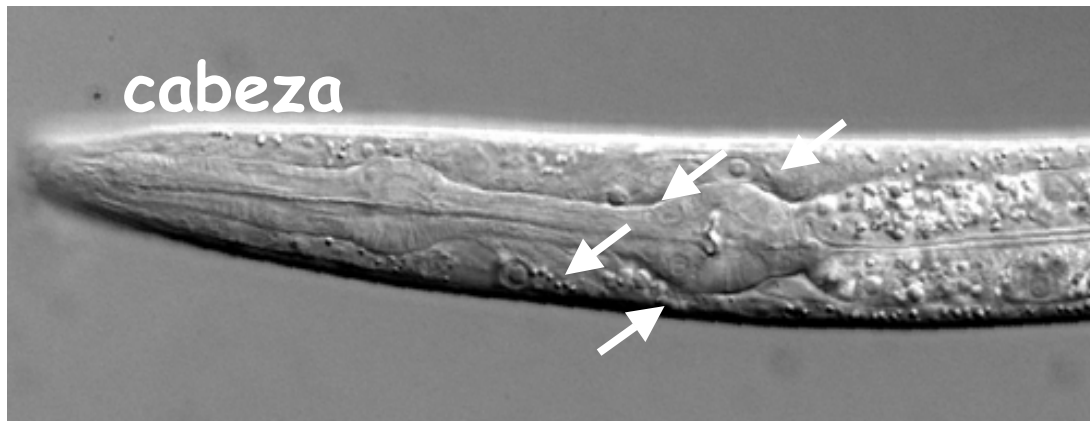


Figura 3. Muerte celular programada en *C. elegans*. Durante la embriogénesis y la primera etapa larvaria, 131 células mueren después de realizar su función. Las flechas blancas indican células en apoptosis en la cabeza de una larva L1 (primera etapa larvaria de cuatro).

Actualmente conocemos la secuencia completa de su genoma y sabemos que para formar a este pequeño organismo se requieren cerca de 19,000 genes. Ahora tenemos la enorme e interesante labor de estudiar cómo es que estos genes funcionan y cómo es que se relacionan entre ellos. Actualmente para responder estas preguntas, la comunidad de científicos que usan a *C. elegans* como organismo modelo, cuenta con numerosas herramientas que se describen a continuación.

El nematodo *C. elegans* en la era de la Genómica

Hasta hace menos de cinco años el enfoque clásico en la investigación genética era encontrar una mutante con un fenotipo interesante y tratar de encontrar el gen que estaba afectado, lo cuál implicaba varios años de estudio. Ahora la ciencia esta avanzando rápidamente gracias a que conocemos la secuencia completa de los genes de varios organismos y podemos hacer "Genética Reversa". ¿En qué consiste esto? Bueno, ahora podemos comenzar por elegir nuestro gen preferido de las secuencias genómicas disponibles, hacer una mutante dirigida, estudiar su fenotipo, aislar genes que participan en la misma vía y comenzar el ciclo de nuevo. Todo esto se puede hacer a un ritmo acelerado gracias al desarrollo de nuevas tecnologías que revisaremos en este apartado.

Mutagénesis e Interferencia de ARN (RNAi)

Ahora que conocemos la secuencia completa del genoma del *C. elegans*, una de las prioridades de la comunidad científica, es mutar todos y cada uno de los genes de este nematodo y determinar su repercusión en el desarrollo y sobrevivencia del organismo. En este sentido se formó un Consorcio para mutagenizar todos los genes del *C. elegans* que está formado por tres laboratorios independientes, localizados en EUA, Canadá e Inglaterra. Hasta la fecha se han generado más de 200 mutantes y cada día se están obteniendo más. La técnica que se utiliza para aislar a las mutantes está basada en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Figura 4). Primero se genera una colección de animales mutagenizados con el compuesto químico (conocido como etil metano sulfanato, EMS) (Figura 4A). Estos animales se separan en dos grupos (Figura 4B); una parte sirve para preservar a los animales y la otra para extraer al DNA que será utilizado en la reacciones de PCR. Para localizar a los genes se diseñan secuencias de DNA que flanquean cada gen y que se utilizan en la reacción de PCR (Figura 4C). El químico utilizado para producir a las mutantes, fragmenta los genes al azar de tal forma que, cuando se realiza la reacción de PCR se pueden identificar los genes mutados porque ahora son más pequeños que el original (Figura 4D). Una vez identificada la población de animales mutados, se crece a los animales vivos que se guardaron y se separan en poblaciones más pequeñas con las cuales se repite el procedimiento (Figura 4E). De tal forma que la población de animales portadora de la mutación se va separando hasta aislar el animal que tiene mutado el gen que se busca. Una vez aislada la mutación (Figura 4F) se puede estudiar su fenotipo por medio de microscopia y realizando pruebas específicas para el tipo de mutación.

Otra manera de estudiar el fenotipo causado por la alteración de un gen es conocido como interferencia de ARN o RNAi (por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en el reciente descubrimiento de que en los organismos vivos, se puede apagar la expresión de un gen específico en respuesta a la introducción a la célula de su propio ARN [6]. El ARN tiene que estar en forma de una cadena doble y complementaria al gen que se desee estudiar. La cadena de ARN doble (Figura 5A), se introduce al animal por medio de inyecciones (Figura 5B). Al entrar a la célula, este ARN es degradado en moléculas de RNA de aproximadamente 21 nucleótidos que, mediante un mecanismo aún desconocido, apagan la expresión únicamente del gen en estudio (Figura 5C). El silenciamiento en la expresión de este gen es transitorio y solo puede observarse por una o dos generaciones, tiempo suficiente para estudiar el fenotipo. Este mecanismo de silenciamiento de genes que fue descubierto en el *C. elegans* y ahora se sabe que está conservado en varios organismos, y podría ser utilizado como un mecanismo de terapia

génica en el futuro. Es decir, si sabemos que en cierta enfermedad existe un aumento en la expresión de un gen específico y conocemos su identidad, podríamos apagar su expresión por medio de inyecciones de ARN de doble cadena y curar así la enfermedad.

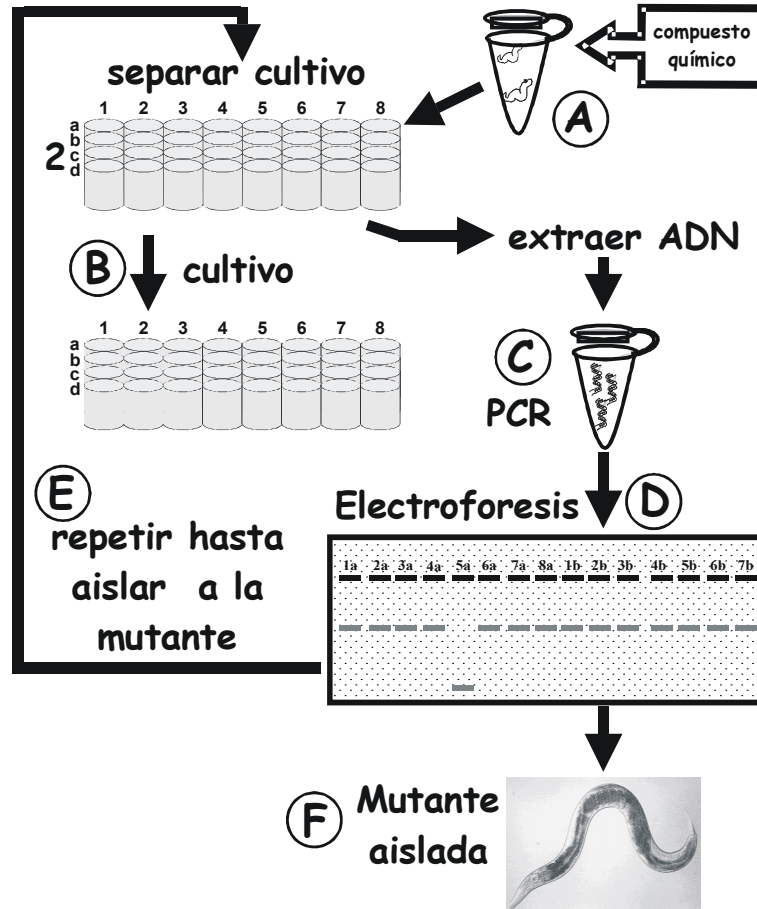


Figura 4. Aislamiento de mutantes en *C. elegans*. Un compuesto químico que provoca deleciones en el genoma es utilizado para aislar mutantes de este organismo. Las mutaciones son identificadas mediante PCR. Un producto de PCR de menor peso molecular del esperado indica que hubo una deleción en el gen. Los pasos del procedimiento son: A) Mutagénesis. B) Separación de la muestra en: cultivos para preservar a los animales y muestras para extraer DNA. C) reacción de PCR. D) Las muestras de PCR se separan en una electroforesis y se visualiza la mutante (carril 5a). E) Se repite el procedimiento hasta aislar la mutante (F).

Una vez que se hace RNAi del gen que se desea, el procedimiento para estudiar el fenotipo causado por la falta de expresión del gen es el mismo que se sigue en mutantes. La ventaja de este método es que es relativamente rápido y en tres días (tiempo de generación del *C. elegans*) podemos conocer el resultado. Los grupos de Julie Ahringer y Tomy Iman, de manera independiente, han llevado a cabo un análisis sistemático de RNAi y han apagado la expresión de 4590 genes que se encuentran en los cromosoma I y III, respectivamente [7, 8]. Estos estudios se han realizado en gran escala gracias a otra ventaja del *C. elegans*. El ARN de

doble cadena también puede ser producido dentro de una bacteria, que es lo que come *C. elegans*, así que si los animales son alimentados con bacterias que están produciendo ARN de doble cadena, el efecto de RNAi puede ser también observado. Actualmente existen bibliotecas de bacterias que producen ARN de doble cadena de todos y cada uno de los genes del *C. elegans*, de tal suerte que podemos buscar un fenotipo específico usando esta herramienta. Más grupos en el mundo están actualmente llevando a cabo ensayos de este estilo, con la idea de apagar la expresión de todos los genes del *C. elegans* y estudiar su fenotipo.

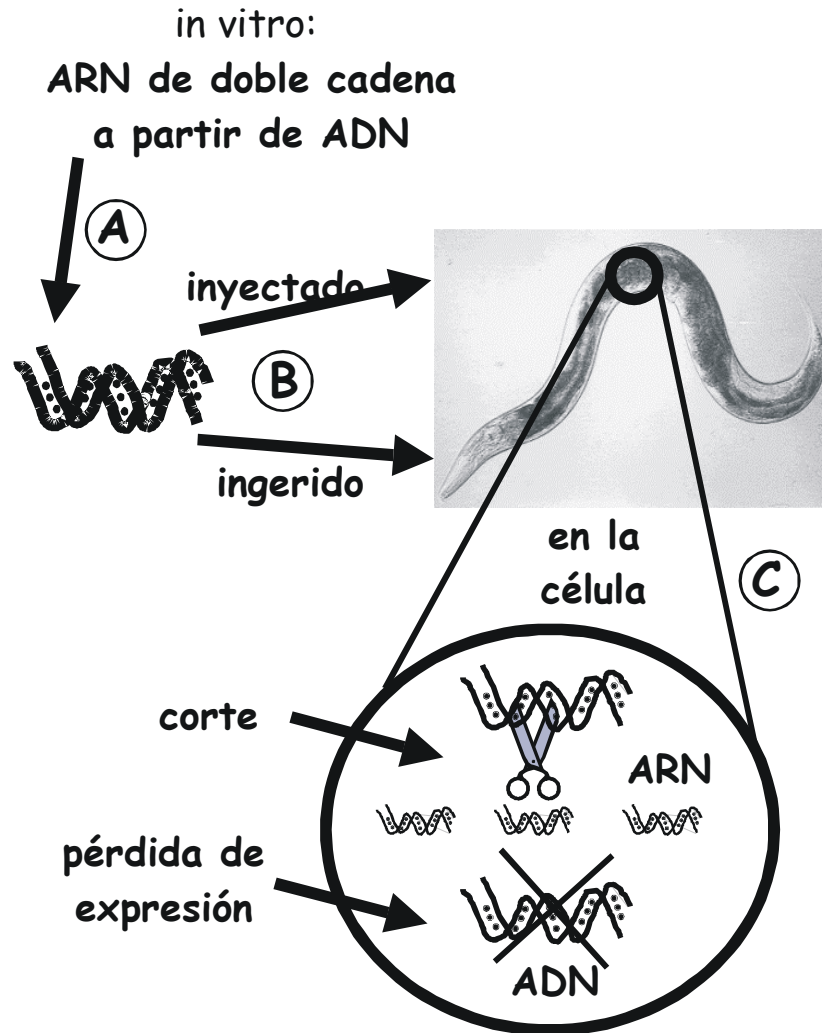


Figura 5. Interferencia de RNA (RNAi). La introducción de RNA de cadena doble al *C. elegans* provoca la pérdida específica y de manera transitoria. A) Hibridación tipo Northern Blot, B) Hibridación tipo *in situ* y C) Fusión con la proteína verde fluorescente.

Expresión genética

Para estudiar la expresión de un gen se pueden utilizar el método clásico de hibridización tipo Northern Blot (Figura 6A), en donde se extrae ARN del individuo y se visualiza en un gel usando una sonda radioactiva. Otra técnica se conoce como hibridización *in situ* (Figura 6B) y consiste en fijar la muestra y utilizar una sonda marcada con un colorante para revelar la localización del ARN en el organismo. En Japón, en el laboratorio de Dr. Yuji Kohara, se ha utilizado la técnica de hibridización *in situ* y actualmente se conoce el patrón de expresión de cerca de 500 genes y esa información está disponible para todo el público.

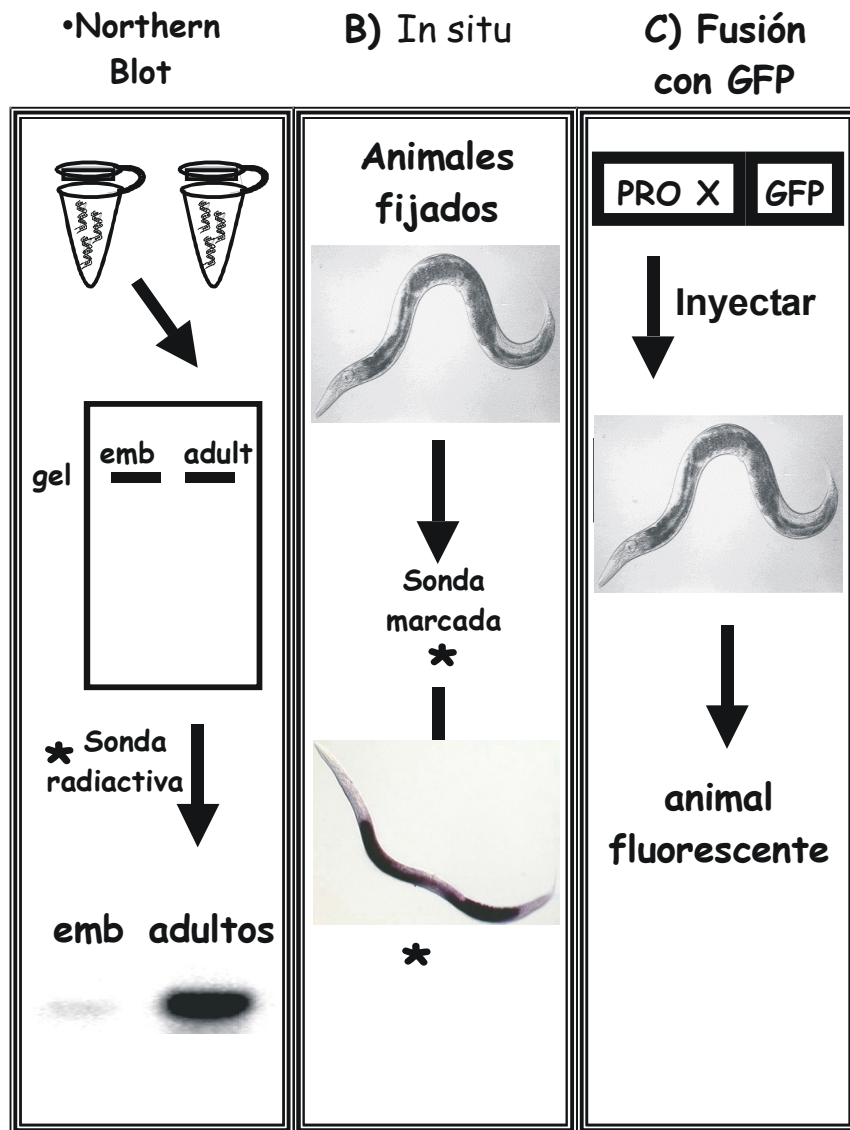


Figura 6. Estudios de expresión genética. Para estudiar la expresión de un gen se puede realizar cualquiera de las siguientes técnicas. A) Hibridización tipo Northern Blot. B) Hibridización *in situ* y C) Fusiones con una proteína reportera.

Recientemente, se ha incorporado una nueva técnica en la que se puede observar la localización de una proteína en un animal vivo. Esto se hace por medio de introducir en el animal la fusión de la proteína de interés con otra proteína, esta última proveniente de medusas de mar, que emite una fluorescencia de color verde (Figura 6C).

Para saber qué genes se expresan en un tejido particular o en una condición metabólica especial, se pueden utilizar microarreglos de ADN (Figura 7). (En este volumen se puede revisar un artículo que trata a profundidad el tema de los microarreglos de DNA, escrito por J. Ramírez y cols). Gracias a que conocemos la secuencia genómica del *C. elegans* se pueden poner todos los genes del organismo en una laminilla especial y arreglados de tal forma que sabemos la identidad de cada uno de ellos (Figura 7A). Esta laminilla es incubada con una muestra de ADN complementario (ARN que fue transferido a su secuencia correspondiente de ADN en el laboratorio) proveniente de la condición que deseamos conocer (Figura 7B) y por medio del análisis computacional de la fluorescencia asociada a la expresión de los genes podemos saber qué genes se expresan en ese tejido o condición fisiológica (Figura 7C). Los microarreglos han sido utilizados de una manera exitosa y un ejemplo de ello es que se ha encontrado que 2171 genes del *C. elegans* son los responsables de las diferencias entre un animal hermafrodita y un macho [9]. En otro estudio se observó que cerca de 1416 genes son necesarios para formar la gónada de este organismo, de los cuáles 650 se utilizan para formar a los espermatozoides y 250 se especializan en formar ovocitos [10]. Actualmente se estima que en el mundo se están llevando a cabo cerca de mil ensayos de microarreglos que incluyen estudios de genes involucrados con el envejecimiento, el desarrollo neuronal, la formación y funcionamiento del músculo, etc.

Interacciones entre proteínas

Para estudiar interacciones entre cualquier proteína se puede utilizar el sistema de “Dos híbridos” (Figura 8). Este método se basa en las propiedades de la proteína Gal4 de levadura. Una parte de esta proteína se activa en respuesta a condiciones especiales y permite que la otra parte de ella pueda unirse a una secuencia específica de ADN. Para realizar el ensayo, el gen Gal4 se divide en dos pedazos, la parte que codifica para la activación de Gal4 se fusiona a la proteína de interés, mientras que la parte de unión a ADN se fusiona a una biblioteca de genes que codifican para todas las proteínas del gusano (Figura 8A). Estas dos fusiones se transforman en las levaduras y se espera que cuando la proteína de interés se una a otra proteína, la secuencia de Gal4 sea “reconstituida” y ahora pueda hacer su función (Figura 8B). Gal4 “reconstituida” activa la expresión de un gen reportero que tiñe de azul a las levaduras y de esta forma podemos identificar interacciones entre la proteína de interés y una proteína desconocida. Una vez identificada una interacción positiva, la fusión se extrae de la levadura para determinar su identidad. Con el uso de este método se pueden aislar proteínas que funcionan en la misma vía del gen de interés y esto nos ayuda a conocer la función del mismo. Actualmente el grupo de Marc Vidal en Boston, EUA, está descifrando la interacción de todas y cada una de las proteínas del *C. elegans* utilizando esta técnica

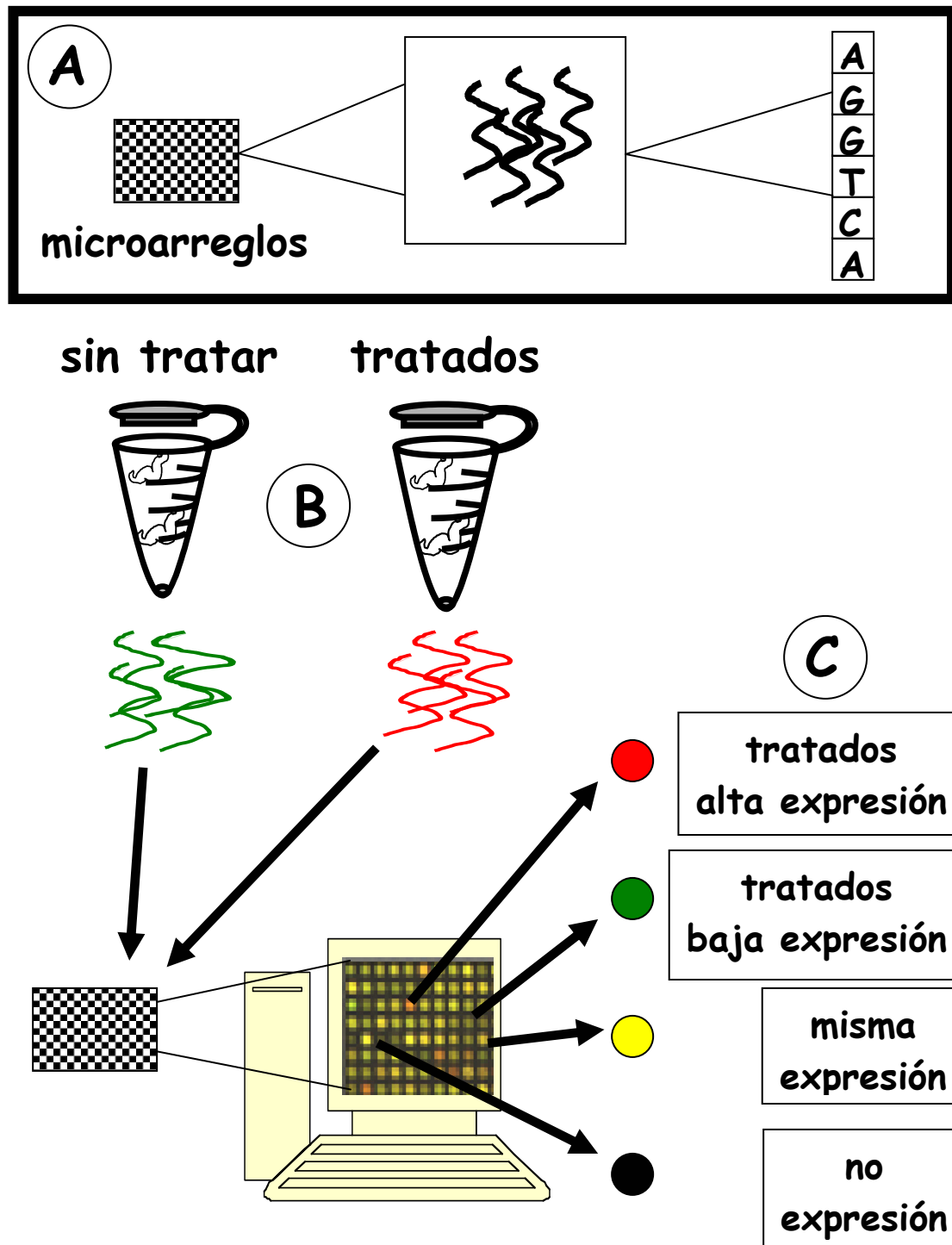


Figura 7. Microarreglos de ADN. Otra forma de estudiar la expresión genética es haciendo microarreglos de ADN. En A se muestra como se coloca el ADN en una laminilla. En B se trata una población de animales y un control que se utilizan para hacer la hibridación del ADN adherido a la laminilla y los resultados se observan por fluorescencia (C).

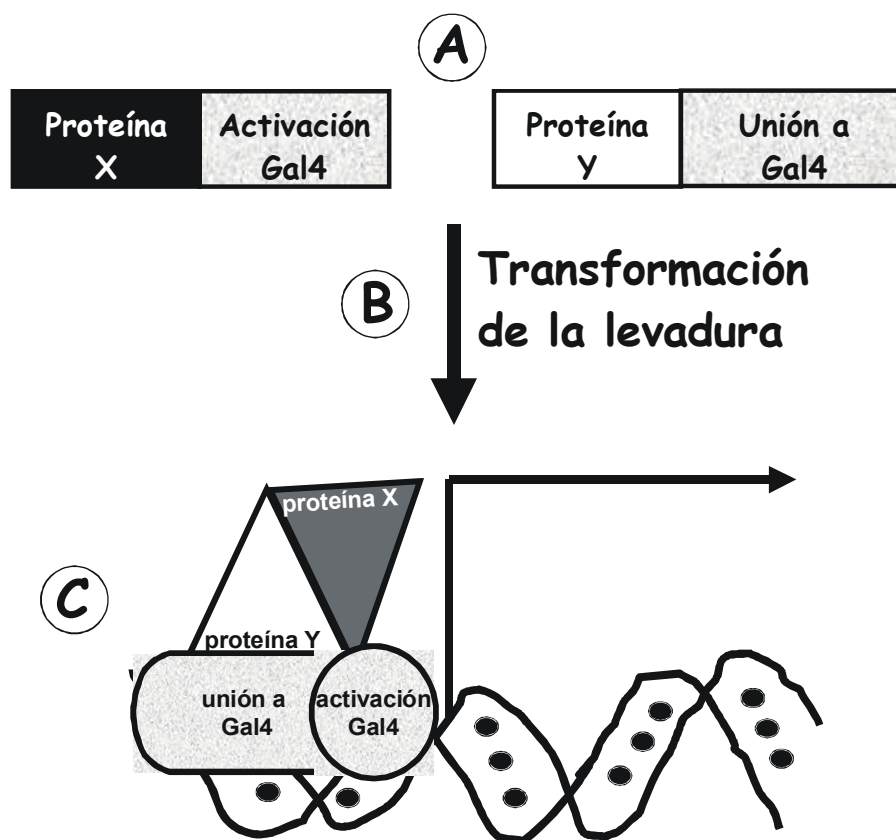


Figura 8. Interacción entre proteínas. La proteína de interés se une al dominio de activación de Gal4 de levadura mientras que una biblioteca de DNA complementario se fusiona al dominio de unión a ADN de Gal4 (A). Estas fusiones se transforman en levadura (B) y cuando la proteína de interés se une a una proteína desconocida, la proteína Gal4 es reconstituida y se activa la transcripción de un gen reportero que nos permite visualizar esta interacción.

Referencias

1. Wood, W.B.a.t.c.o.C.e.r., *The nematode Caerhabditis elegans*, ed. W.B. Wood. 1988, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 667 p.
2. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
3. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
4. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
5. Hedgecock, E.M., J.E. Sulston, and J.N. Thomson, *Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1983. **220**(4603): p. 1277-9.
6. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
7. Gonczy, P., et al., *Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 331-6.

8. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-30.
9. Jiang, M., et al., *Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 218-23.
10. Kim, S.K., [Http://C.elegans](http://C.elegans): mining the functional genomic landscape. Nat Rev Genet, 2001. **2**(9): p. 681-9.
11. Walhout, A.J., et al., *Protein interaction mapping in C. elegans using proteins involved in vulval development*. Science, 2000. **287**(5450): p. 116-22.

Semblanza de la Dra. Rosa Navarro González.



Bióloga por la Facultad de Ciencias (1995) y Doctora en Ciencias Bioquímicas por la Facultad de Química de la UNAM (1998). Realizó Estudios Postdoctorales en la escuela de Medicina de Harvard en donde adquirió experiencia en la línea germinal del nemátodo *C. elegans* (1998-2002). Desde el 2002 es Investigadora Asociada "C" en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

NEUROBIOLOGÍA DE LA TOMA DE DECISIONES

Ranulfo Romo

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

rromo@ifc.unam.mx

RESUMEN

Estudios recientes que combinan experimentos psicofísicos y neurofisiológicos del comportamiento de monos, han revelado nuevos aspectos de la participación de múltiples áreas de la corteza cerebral, en la resolución de una tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles. En particular, estos estudios han explorado cómo los códigos neurales se relacionan con la percepción, la memoria de trabajo y la toma de decisiones. La corteza somatosensorial primaria provee de información sensorial a regiones más centrales de la corteza cerebral; donde se combinan la información sensorial retenida en la memoria de trabajo con la información sensorial reciente, de tal manera que una comparación entre ellas se encamina hacia una decisión. Al parecer, éste es un proceso ampliamente distribuido que avanza en forma continua por un espectro sensoriomotor.

INTRODUCCIÓN

El problema de la codificación neural ha estimulado numerosas investigaciones en neurofisiología. La creencia que subyace a estos trabajos, es que el entendimiento de las representaciones neurales de los estímulos sensoriales en las etapas tempranas del procesamiento, es una de las claves para entender la percepción sensorial. Las investigaciones sobre este problema, han mostrado cómo la actividad neural representa los parámetros físicos de los estímulos sensoriales, tanto en la periferia como en las áreas sensoriales primarias de la corteza cerebral. Estos hallazgos han preparado el camino para nuevas interrogantes, más bien relacionadas con el procesamiento cognoscitivo. Por ejemplo, ¿cómo se relacionan las representaciones neurales de los estímulos sensoriales con la toma de decisiones? Para entender la dinámica neuronal de la toma de decisiones, necesitamos conocer, primero, cómo se codifican los atributos físicos de los estímulos sensoriales en que se basa la decisión; éste es un eslabón crucial. Uno de los principales retos de este estudio, sin embargo, es que incluso las tareas cognoscitivas más simples, involucran múltiples regiones de la corteza cerebral, cada una de las cuales quizá proporcione información sensorial de manera distinta, o se combine con otros tipos de señales almacenadas que representan, digamos, experiencias del pasado o acciones futuras. Los estudios recientes que combinan experimentos psicofísicos y neurofisiológicos de la conducta de monos han arrojado nuevos datos sobre este problema. En particular, hemos explorado cómo los códigos neurales se relacionan con la percepción y la toma de decisiones en el sistema somatosensorial. Nuestro trabajo ha consistido en estudiar una tarea cognoscitiva no trivial (la discriminación sensorial) usando estímulos muy simplificados que permiten examinar la actividad neural de diversas áreas de la corteza cerebral durante un mismo acto conductual. La propuesta es que si podemos identificar la codificación de los estímulos sensoriales, entonces la determinación de los papeles funcionales propios de estas áreas debe ser menos difícil.

CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EXPLORAR LOS CÓDIGOS NEURALES

En la actualidad, son relativamente comunes los experimentos que combinan registros neurofisiológicos con mediciones psicofísicas. Mountcastle y sus colaboradores fueron pioneros en esta investigación cuando hicieron una serie de importantes observaciones en una submodalidad sensorial conocida como la sensación de *flutter* (1, 2, 3). La sensación de *flutter* es producida cuando un sujeto toca un objeto que vibra a una frecuencia entre aproximadamente 5 y 50 Hz. Mountcastle y colaboradores mostraron que esta vibración es mediada principalmente por los mecanorreceptores cutáneos de adaptación rápida (AR) (1, 3). Encontraron que los humanos y los monos tienen la misma capacidad para detectar y discriminar las frecuencias de las vibraciones mecánicas que se aplican a sus manos (3, 4, 5). También intentaron determinar cómo se relaciona la actividad neural desencadenada por el estímulo vibratorio con el desempeño psicofísico (3, 5). En la tarea de discriminación (5), los animales tenían que reportar si la frecuencia de un estímulo de comparación era más baja o más alta que la de un estímulo base aplicado unos segundos antes (Figura 1).

En principio, esta tarea puede conceptualizarse como una cadena de operaciones neurales o de pasos cognoscitivos: codificar la frecuencia del primer estímulo, conservarla en la memoria de trabajo, codificar la segunda frecuencia, compararla con la huella en la memoria de trabajo que dejó el primero, y comunicar el resultado de la comparación al aparato motor. Como un modelo del procesamiento sensorial en el cerebro, la tarea vibrotáctil tiene varias ventajas (6):

no sólo actúan de manera parecida los humanos y los monos, sino los elementos que se desean comparar se extienden en el tiempo y siempre activan la misma, bien definida, población de receptores primarios (2, 3, 7, 8, 9), de modo que se elimina en buena medida el análisis de las variaciones espaciales. Aunque sin duda, la integración espacial-temporal de la información táctil es un problema interesante (10, 11, 12), complica considerablemente los códigos neurales (13, 14, 15, 16) sin necesariamente añadir algún elemento esencial a la memoria o a los pasos de la toma de decisiones de un proceso de discriminación. Sin embargo, para que la tarea vibrotáctil sea un modelo útil es esencial que ésta genere una secuencia confiable de eventos cognoscitivos como el que acabamos de mencionar. ¿Cómo sabemos que esto es cierto?

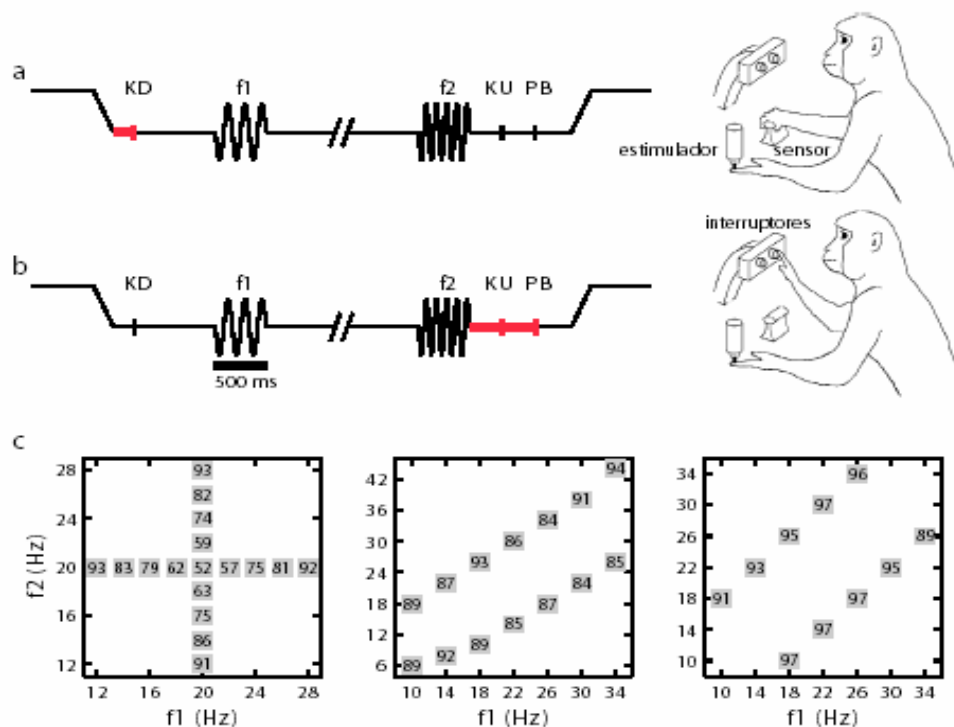


Figura 1. La tarea de discriminación vibrotáctil. a, b, La secuencia de eventos durante los ensayos de discriminación. Se baja la punta de prueba hasta presionar la yema del dedo de un dígito de la mano a la que se restringe el movimiento; el mono coloca su mano libre sobre un sensor inamovible (a, línea roja; KD); la punta de prueba oscila verticalmente a la frecuencia de estimulación base (f_1); después de un lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , se aplica una segunda vibración mecánica a la frecuencia de comparación (f_2); el mono suelta el sensor (b, línea roja KU) y presiona el botón medial o lateral (b, línea roja; PB) para indicar si la frecuencia de comparación fue más baja o más alta que la de base. c, Los conjuntos de estímulos usados en las sesiones. Cada caja indica un par de frecuencias de base/comparación, con números en su interior que indican el porcentaje general de discriminaciones correctas. Se usaron los conjuntos de estímulos mostrados para determinar los umbrales de discriminación (izquierda), para estudiar la memoria de trabajo (centro), y los procesos de comparación (derecha) durante la tarea. A menudo se usaron los tres conjuntos durante la sesión.

Un paso crucial consiste en escudriñar el aspecto psicofísico (17). Es importante notar que en el paradigma original, la frecuencia base no varió de un ensayo a otro durante una misma serie de ensayos (5). Cuando volvimos a estudiar la tarea de discriminación vibrotáctil, encontramos que el paradigma era ambiguo: cuando se mantiene constante la frecuencia del estímulo base, se puede resolver la tarea al comparar los dos estímulos, o bien al clasificar el segundo estímulo como “alto” o “bajo”, sin referencia alguna al estímulo base. ¿Qué fue, en efecto, lo que los monos hacían? Al mantener la frecuencia base constante por largas series de ensayos, como se hizo originalmente, los umbrales de discriminación medidos fueron parecidos a los que se habían reportado anteriormente. Si los monos realmente estaban discriminando la diferencia de frecuencia entre los dos estímulos, entonces también serían capaces de hacerlo aunque se cambiara la frecuencia base de un ensayo a otro. Empero, esto no fue el caso, pues su desempeño cayó al nivel del azar (18). Parecía que los monos prestaban atención sólo al segundo estímulo, el cual clasificaban como bajo o alto con respecto a un referente interno, quizá la frecuencia base utilizada durante el periodo de entrenamiento. Para probar esta posibilidad, en series de ensayos por separado, el estímulo base fue eliminado y en cada ensayo se aplicó un solo estímulo. En esta nueva condición (18), se premiaba a los monos cuando clasificaban correctamente la frecuencia del estímulo por estar más baja o más alta que una referencia arbitraria (20, 30 o 40 Hz), la cual se mantuvo constante durante la sesión de discriminación. Los monos tuvieron que determinar la referencia usando el método de ensayo y error, pero aprendieron esta tarea rápidamente, y las curvas psicométricas tomadas en estas circunstancias (18) resultaron casi idénticas a las que se midieron durante la tarea de discriminación “clásica”.

Para estudiar la discriminación, los monos fueron re-entrenados utilizando múltiples pares de frecuencias de base y de comparación (18). La clave consistió en variar la frecuencia base en cada ensayo, pero de tal manera que cada una podía ser seguida por una frecuencia de comparación más alta o más baja (Figura 1c). Así, los sujetos fueron obligados a comparar las dos frecuencias. Después del re-entrenamiento, que duró varios meses, el desempeño en esta situación resultó similar al de la tarea de discriminación “clásica”. Con base en estos resultados, parece casi seguro que los animales realmente aprendieron a discriminar entre las frecuencias durante una serie de ensayos.

La lección aquí es que, aunque los monos quizá aprenden a discriminar, también son capaces de desarrollar estrategias alternativas para resolver una tarea (19). En particular, en la tarea de discriminación vibrotáctil diseñada por Mountcastle y colaboradores (5), los monos tienden a *no* comparar los dos estímulos en cada ensayo. En su lugar, clasifican el segundo estímulo, posiblemente después de establecer los límites de cada categoría en los primeros ensayos de la serie (18). Cuando suponemos que los animales están discriminando, no debemos subestimar este problema, independientemente de la modalidad sensorial (20, 21).

Aunque ésta parezca una observación sencilla, quizá refleje los efectos de mecanismos fundamentalmente diferentes. Consideremos, por ejemplo, una tarea que incluye variaciones en un solo elemento durante varios ensayos. Para identificar o clasificar un estímulo sensorial, es preciso compararlo con un referente almacenado en la memoria de largo plazo. Sin embargo, no está claro cómo el proceso de comparación podría estudiarse en esta situación. ¿Cómo se recupera la información guardada en la memoria de largo plazo para poderla comparar con un evento sensorial? ¿Dónde se almacena esta información, y cómo difiere de la actividad original evocada sensorialmente? En contraste, en las tareas de discriminación en que se aplican los dos

estímulos secuencialmente en cada ensayo, se hace una comparación con la huella dejada en la memoria de corto plazo por el primer estímulo. Esto significa que si podemos identificar la correlación neural del componente de la memoria de trabajo, podría ser estudiado la comparación o los mecanismos de la toma de decisiones subyacentes al desempeño de la tarea. En efecto, dicha correlación neural ha sido reportada recientemente (22). Antes de entrar en esta materia, empero, primero debemos discutir cómo se codifican los estímulos vibrotáctiles.

CODIFICACIÓN NEURAL DE LOS ESTÍMULOS VIBROTÁCTILES

¿Cómo se representa neuronalmente la frecuencia de los estímulos vibrotáctiles? ¿Es la actividad neural desencadenada por estos estímulos, la que transmite la información sobre su frecuencia?, ¿Reflejan las fluctuaciones en estos códigos neurales fluctuaciones en el comportamiento? Estas interrogantes han provocado una discusión concerniente a la función de la frecuencia de disparo de las neuronas, como una forma de codificación de la información sensorial; un tema amplio que se debate intensamente en el contexto de varios sistemas sensoriales (23, 24, 25). Los primeros trabajos (1, 2, 3) mostraron que al estimular las fibras nerviosas aferentes primarias AR mediante trenes de estímulos vibrotáctiles, había cierta probabilidad de que dispararan en cada ciclo y que cuando lo hacían, el pico de actividad evocado ocurriera en una fase de la onda senoidal. Esto sucede con un alto grado de precisión, del orden de una milésima de segundo. En general, las poblaciones de aferentes primarias son capaces de representar complejos patrones espacio-temporales con una alta fidelidad (26, 27). También se mostró, que a diferencia de las respuestas de otras fibras que son activadas mediante frecuencias más altas, el índice de disparo de los receptores AR —es decir, la cantidad promedio de potenciales de acción evocada durante un número de ciclos determinado— mostró poca modulación en función de la frecuencia del estímulo. Esto condujo a la idea de que, debido a que el índice de disparo no llevaba información sobre la frecuencia, alguna estructura más central tendría que extraer dicha información mediante la lectura de los intervalos entre los disparos de las aferentes. La posibilidad de que las neuronas de la corteza cerebral fueran sensibles a pequeñas diferencias de tiempo entre los intervalos de disparo era muy atractiva (2, 28, 29). Trabajos teóricos han indicado su factibilidad. Experimentos adicionales sugirieron que el supuesto mecanismo sensible al tiempo entre los intervalos de disparo debió ubicarse en algún sitio más central que la corteza somatosensorial primaria (S1), ya que en esta área, las características de las neuronas activadas por la vibración eran parecidas a las de las aferentes primarias: es decir, de adaptación rápida con poca modulación del índice de disparo como una función de la frecuencia y, aunque sus disparos no estaban tan claramente relacionados con la fase del estímulo como los de la periferia, aún mostraba un alto grado de exactitud temporal (2, 28, 29). Se puede apreciar esto en la Figura 2a.

A pesar de algunas observaciones (7), estos resultados permanecieron algunos años sin ser cuestionados. Sin embargo, trabajos más recientes (30) han mostrado que variaciones en el índice de disparo sí ocurren al nivel de S1 durante la tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles, y que transmiten información sobre la frecuencia del estímulo. Esto es lo que sabemos.

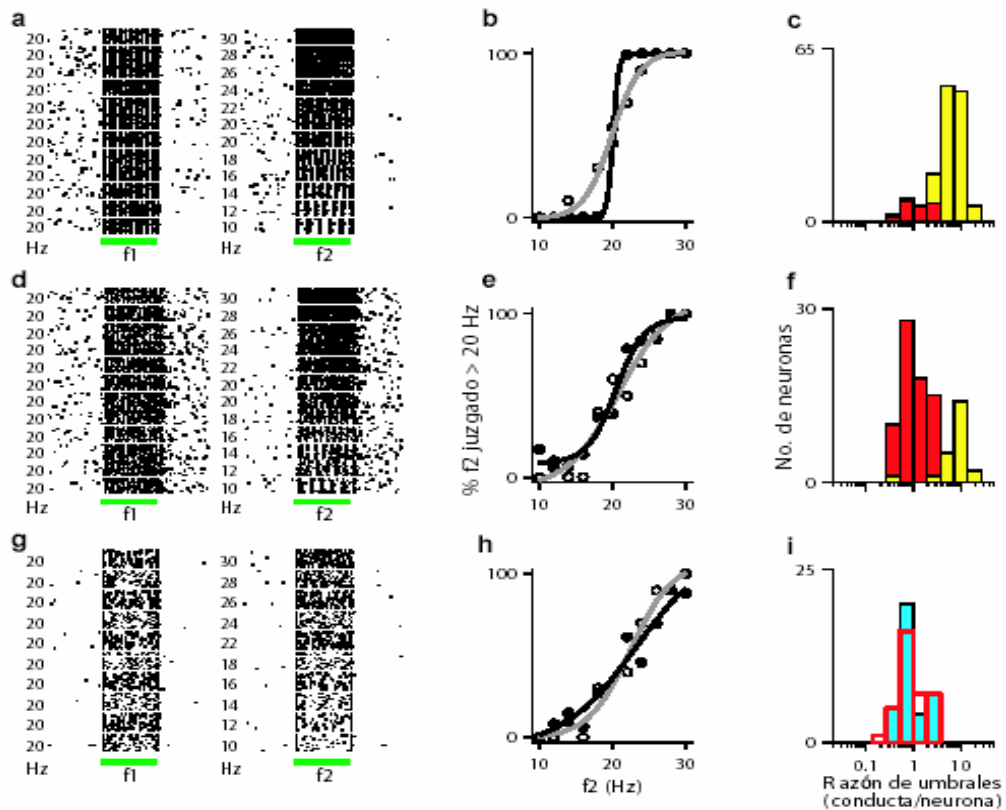


Figura 2. La comparación entre la actividad de las neuronas de la corteza somatosensorial primaria (S1) y el desempeño psicofísico. **a, d, g,** Respuestas de tres neuronas del área 1 de S1 registradas durante la discriminación. Cada línea representa un ensayo y cada punto un potencial de acción. Los ensayos fueron aplicados al azar. Las líneas verdes indican los periodos de estimulación; indicando la primera (f1) y segunda (f2) frecuencia de estimulación. **a,** Respuestas que muestran poca modulación del índice de frecuencia de disparo, pero reflejan fielmente la periodicidad de los estímulos. **d,** Respuestas que reflejan un fuerte modulación del índice de disparo, pero poca capacidad para replicar la regularidad de los estímulos periódicos. **g,** Respuestas a los estímulos aperiódicos. **b, e, h,** Las curvas psicométricas y neurométricas. El eje 'y' representa el porcentaje de ensayos donde se indicó que f2 era mayor que f1, cuando f1 era de 20 Hz. Los círculos abiertos y las curvas grises corresponden al desempeño del mono. Los círculos rellenos y las curvas negras indican el desempeño de un observador ideal que basaba sus decisiones en las respuestas de una sola neurona. Las líneas continuas son ajustes sigmoideales a los datos; el umbral de discriminación es inversamente proporcional a la inclinación máxima de la curva. **b,** El desempeño del observador ideal basado en la periodicidad de la neurona en **a.** **e, h,** El desempeño del observador ideal basado en los índices de disparo de las neuronas en **d** y **g,** respectivamente. **c, f, g,** El número de neuronas S1 que tienen las proporciones de umbral indicadas. En **c** y **f,** los umbrales neurométricos basados en la periodicidad del tren de espigas (barras amarillas) fueron mucho más pequeños que los que se basaron en la modulación promedio del índice de disparo (barras rojas) correspondientes a los umbrales conductuales. **i,** Las proporciones de umbral basadas en los índices promedio de disparo evocados por los estímulos aperiódicos (barras azul cian) fueron parecidas a las que se obtuvieron con los estímulos periódicos (barras abiertas). (Reproducido de 42).

Primero, ¿cómo cambian los índices de disparo de las neuronas de S1 durante la discriminación vibrotáctil?. En el rango de discriminación (5-50 Hz), las respuestas promedio de disparo incrementan monótonamente de acuerdo con la frecuencia del estímulo (30), y pueden ser descritas razonablemente bien como funciones lineales. Por ejemplo, durante el primer periodo de estimulación, el índice de disparo = $a_1 \times f_1 + b$, donde f_1 es la frecuencia base y b y a_1 son constantes. El coeficiente a_1 representa la pendiente de la función índice de disparo-vs-frecuencia, y mide que tan fuertemente una neurona varía su frecuencia de disparo en función de los cambios de la frecuencia del estímulo. En S1, la gran mayoría de los gradientes son positivos, y muchas se aproximan a cero (30). Esto significa que los índices de disparo de las neuronas de S1 normalmente aumentan cuando se incrementa la frecuencia del estímulo (28, 5, 29), y que sólo una fracción de todas las neuronas que responden muestran una pronunciada modulación de frecuencia. Esto quizá explique por qué estudios anteriores, basados en muestras pequeñas o con un limitado rango de frecuencia, no detectaron variaciones significativas en el índice de disparo de las neuronas de S1. La Figura 5a muestra las distribuciones de los gradientes derivadas de las respuestas de las neuronas de S1; los dos valores — a_1 y a_2 — indican qué tan fuertemente las neuronas son moduladas en su frecuencia de disparo por las frecuencias base y comparación, respectivamente (véase el pie de figura). Para tener una idea de la fuerza de la modulación, un valor de 1 (muy típico) significa que el índice de disparo de la neurona aumenta en 1 unidad el potencial de acción por un incremento de la frecuencia de 1 Hz.

Segundo, ¿cómo cambian los índices de disparo de las neuronas localizadas centralmente a S1? En la Figura 5a, la actividad en S1 es fácil de interpretar: las neuronas responden a f_1 durante el primer periodo de estimulación y a f_2 en el segundo periodo de estimulación (30, 31). Empero, las áreas más centrales muestran patrones más complejos (véase abajo). Variaciones parecidas en el índice de disparo también son observadas en las neuronas del área somatosensorial secundaria (S2), la cual recibe proyecciones directas desde S1 (32, 33, 34). Sin embargo, hay algunas diferencias entre la actividad de las neuronas de S1 y de S2. Respecto del código neural de frecuencia, sobresalen dos de ellas. Primero, casi la mitad de las neuronas en S2 (cerca del 40%) tienen gradientes negativos (Figura 5b). Estas unidades reducen sus índices de disparo como función de los incrementos en la frecuencia de estimulación, con una dependencia que es, una vez más, aproximadamente lineal (30, 31). Todas las áreas centrales a S1 que se han examinado hasta ahora y que son activadas durante la discriminación vibrotáctil muestran respuestas monótonas parecidas y con proporciones similares de neuronas que muestran gradientes positivos y negativos (22, 30, 31, 35). La Figura 4c muestra las respuestas de una neurona de S2 que reaccionó con mayor intensidad a las frecuencias bajas del estímulo. Es interesante hacer notar que se han observado en S2 poblaciones de neuronas con gradientes positivas y negativas en trabajos donde se utilizaron otros estímulos táctiles. En estos trabajos, también se encontraron neuronas en S1 con gradientes negativos (36, 37). La segunda diferencia importante entre S1 y las áreas subsiguientes, es que estas últimas muestran sólo huellas mínimas de actividad periódica —o quizá nada— a pesar de la periodicidad del estímulo y de las descargas periódicas evocadas en S1 (22, 30, 31, 35).

Tercero, ¿hay alguna indicación de que las modulaciones del índice de disparo de las neuronas de S1, estén relacionadas directamente con la conducta? Hay tres líneas de evidencia que apoyan una representación del índice de disparo promedio. Por una parte, detectamos covariaciones significativas entre las respuestas neuronales y psicofísicas en pruebas sencillas (30), que son consistentes con los estudios en la modalidad visual (38). Esto quiere decir que la

actividad de algunas neuronas de S1 predecía de manera significativa si el mono discriminaría correctamente o incorrectamente en un ensayo. Se observaron covariaciones semejantes pero más pronunciadas también en S2 (30, 31). En contraste, no se encontró ninguna asociación de este tipo entre el tiempo de los intervalos de los disparos —cuantificado de varias maneras— y la conducta (30). En otras palabras, aunque los intervalos entre los disparos evocados (o, más preciso, sus fases en un ciclo senoidal), también fluctuaron de un ensayo a otro, estas variaciones no predecían la conducta del mono. Esto sugiere que el número total de disparos de potenciales de acción por una neurona de S1 durante el periodo de estimulación es más importante que el tiempo exacto en que se disparan los potenciales de acción.

Otra manera de comparar la conducta de un sujeto con la actividad de una neurona consiste en construir una curva neurométrica (39, 40, 41, 42) la cual refleja la conducta psicofísica de un observador ideal que ejecuta la tarea discriminatoria sólo con base en las respuestas a la neurona seleccionada. Este observador ideal utiliza una estrategia óptima para generar sus decisiones, de tal manera que la conducta concreta de un sujeto pueda compararse con la mejor conducta posible con base a la actividad de una sola célula. Las curvas neurométricas pueden construirse a partir de cualquier cantidad considerada como una respuesta (42). Nuestro análisis consistió en calcular dos tipos de curvas neurométricas; una basada en el índice de disparo y otra en la periodicidad (o la diferencia de fase entre los intervalos de los potenciales de acción evocados) de una neurona. Ejemplos de estas curvas son mostrados en las Figuras 2b y 2e. Lo que encontramos fue que las curvas neurométricas basadas en el índice de disparo típicamente correspondieron a los datos conductuales o psicométricos, mientras que las curvas basadas en la periodicidad no; estas últimas típicamente predecían un desempeño mucho más exacto (Figs. 2c, 2f). Esto confirma que, en efecto, el tiempo entre los intervalos de los potenciales de acción de las neuronas de S1 es muy preciso, pero sugiere que esta regularidad no es aprovechada por los circuitos de la corteza, o al menos no en un grado que se aproxima a su plena capacidad. Se llegó a esta misma conclusión mediante un análisis empleando la teoría de la información (30). Finalmente, otra observación adicional también sugiere que las neuronas codifican la frecuencia del estímulo en los índices de disparo. Se basó esta observación en el uso de estímulos aperiódicos, que no generan intervalos regulares entre los potenciales de acción (43, 30). La Figura 2g muestra un ejemplo de los trenes de potenciales de acción evocadas en estas condiciones. Allí, el estímulo consiste en una serie de pulsos mecánicos separados por intervalos al azar, y se define la frecuencia de estímulo como un promedio, basado en el número total de pulsos aplicados durante un lapso fijo de tiempo de estimulación. Aunque esta manipulación eliminó toda regularidad en el tiempo de los intervalos entre los potenciales de acción entre un ensayo y el siguiente, los monos fueron capaces de adaptarse a estos estímulos muy rápidamente, ya que después de unas cuantas pruebas su desempeño alcanzó el mismo nivel de consistencia que con las vibraciones periódicas; un resultado considerado notable. Además, tanto los estímulos periódicos como los aperiódicos suscitaban prácticamente las mismas modulaciones en el índice de disparo y (30), por consiguiente, las correspondientes curvas neurométricas también resultaron parecidas (Figs. 2e, 2h). Lo anterior es consistente con la idea de que en ambos casos la frecuencia del estímulo es codificada mediante un código de índice de disparo promedio.

En resumen, los índices de disparo que varían como funciones de la frecuencia del estímulo son detectados en varias áreas que son activadas durante la tarea —en particular, en S1— y hay evidencia de que estas variaciones en el índice de disparo tienen un impacto significativo en la conducta. Está claro que el cerebro debe poder extraer al menos alguna

información del tiempo tan preciso de los disparos de las neuronas de S1 evocados en la tarea. Por ejemplo, los humanos pueden distinguir fácilmente entre estímulos periódicos y aperiódicos. Sin embargo, no encontramos ninguna pista de que la periodicidad encontrada en S1 contribuya a la discriminación de frecuencia, aunque es difícil descartar esta posibilidad totalmente.

LA BÚSQUEDA DE UNA RELACIÓN CAUSAL ENTRE LA ACTIVIDAD NEURONAL Y LA PERCEPCIÓN

¿Cómo podemos estar seguros que la actividad registrada en alguna área de la corteza está realmente relacionada con la percepción y el comportamiento? La estimulación intracortical constituye una técnica poderosa, capaz de establecer un vínculo causal —y no sólo una correlación— entre la actividad de poblaciones de neuronas y las funciones cognoscitivas (44, 45, 43, 46, 47). Para la discriminación vibrotáctil, esta estrategia ha producido la evidencia más convincente de que todos los procesos cognoscitivos de la tarea quizá sean desencadenados directamente por la activación de las neuronas AR de S1, además de permitirnos explorar cuestiones relacionadas al código neural de los estímulos vibratorios.

La Figura 3 resume los resultados de varios experimentos con microestimulación eléctrica (43, 46, 48). Al principio, la idea era variar sólo el estímulo de comparación (Figs. 3a, 3b). Primero, los monos aprendieron a discriminar las frecuencias de dos vibraciones senoidales aplicadas sucesivamente a las yemas de sus dedos. Una vez que dominaban esta tarea, se tomaron registros neurofisiológicos en S1 que permitieron identificar agrupaciones de neuronas AR. La microestimulación se extiende sobre un área de la corteza y activa muchas unidades adyacentes (49). Entonces, una clave para el éxito de los experimentos con microestimulación consiste en ubicar el microelectrodo en el centro de una agrupación de neuronas funcionalmente homogéneas. Afortunadamente, el área 3b de S1 está organizada en módulos de neuronas —o columnas— con propiedades similares (50, 51, 52, 53). Así, tras identificar un conjunto de neuronas AR, el estímulo de comparación fue substituido por la microestimulación en la mitad de los ensayos (Fig. 3a). Los estímulos artificiales consistentes en pulsos periódicos fueron aplicados con las mismas frecuencias de comparación como con los estímulos mecánicos. Los sitios de microestimulación en S1 fueron seleccionados de tal manea que tuvieran neuronas AR con campos receptores en la yema donde la estimulación mecánica es aplicada. De manera notable, los monos discriminaron las señales mecánicas (de base) y eléctricas (de comparación) con perfiles de desempeño indistinguibles de los que se obtuvieron sólo con estímulos naturales (Fig. 3a). Entonces, es probable que las sensaciones inducidas artificialmente fueron muy parecidas a las inducidas por los estímulos vibratorios (43).

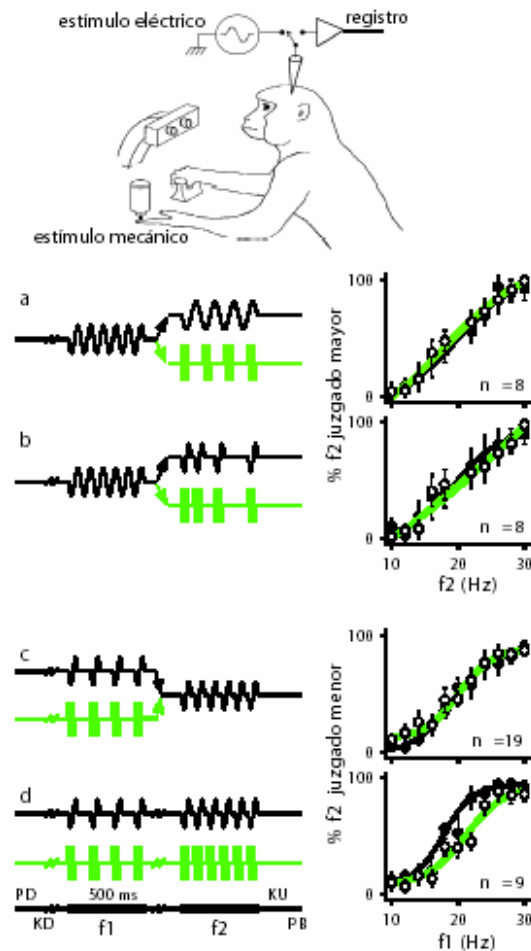


Figura 3. El desempeño psicofísico en la discriminación de frecuencia con estímulos mecánicos naturales aplicados sobre la yema de un dedo, y con estímulos eléctricos artificiales aplicados directamente a las neuronas de S1. Primero, se entrenaron a los monos a comparar dos estímulos mecánicos presentados secuencialmente en las yemas de sus dedos (Fig. 1). Luego, algunos de los estímulos mecánicos fueron reemplazados por trenes de descargas eléctricas microinyectadas en agrupaciones de neuronas AR en el área 3b de S1. Cada descarga consistió en dos pulsos de corriente bifásica (líneas verdes). Las descargas aplicadas fueron de las mismas frecuencias de comparación de los estímulos naturales (líneas negras). En la mitad de los ensayos, los monos compararon dos vibraciones mecánicas aplicadas en la piel; en la otra mitad uno de los estímulos, o ambos, fueron reemplazados por microestimulación. Los dos tipos de ensayos fueron intercalados, y las frecuencias siempre cambiaron de un ensayo a otro. Los diagramas del lado izquierdo muestran los cuatro protocolos usados. Las curvas en el lado derecho muestran el desempeño de los animales para las situaciones ilustradas en el lado izquierdo. Los círculos rellenos y abiertos indican los estímulos mecánicos y eléctricos, respectivamente. Las líneas continuas son ajustes sobre los datos. **a**, Todos los estímulos fueron periódicos, pero el estímulo de comparación podía ser mecánico o eléctrico. **b**, El estímulo base fue periódico y la de comparación aperiódico; el estímulo de comparación podía ser mecánico o eléctrico. **c**, Todos los estímulos fueron periódicos; el estímulo base podía ser mecánico o eléctrico. **d**, Todos los estímulos fueron periódicos; en las pruebas con microestimulación, tanto los estímulos de base como los de comparación fueron artificiales. Los estímulos vibrotáctiles fueron senosoides o trenes de pulsos mecánicos aislados, cada uno de los cuales consistió en pulso senoidal que duró 20 ms. El desempeño de los monos fue casi igual con los estímulos naturales y los artificiales. (Reproducido de 22 y 43).

Se observó un efecto interesante conforme se variaba la intensidad de la corriente de microestimulación (43). A intensidades muy bajas, los monos no detectaron los estímulos artificiales; simplemente siguieron esperando el estímulo. A intensidades intermedias, los monos detectaron los estímulos —es decir, reaccionaron y presionaron un botón con el cual reportan la discriminación— pero su comportamiento psicofísico sólo alcanzó el nivel del azar, como si lograban detectar la presencia pero no la frecuencia de los estímulos artificiales. A intensidades más altas, los animales discriminaron normalmente. Estas transiciones son paralelas a las que se observaron al aumentar paulatinamente la amplitud de las vibraciones mecánicas; hay un 'intervalo atonal' donde los monos detectan los estímulos pero no pueden determinar la frecuencia.

Por el diseño de la tarea de discriminación, se compara el segundo estímulo con la huella en memoria del primero (18). Habiendo mostrado que los monos podían usar un estímulo artificial durante la comparación, nos preguntamos si serían capaces de memorizar y usar un estímulo eléctrico aplicado durante el periodo base. En este caso, en la mitad de los ensayos el estímulo base consistió de una microestimulación eléctrica a una frecuencia igual a f_1 (Fig. 3c). De nuevo, la corriente eléctrica fue inyectada en neuronas tipo AR (46). Los pares de frecuencia y la secuencia de los eventos durante esta tarea fueron los mismos que en los experimentos anteriores con estímulos naturales. Enfatizamos este punto porque el cuidadoso diseño de los conjuntos de estímulos fue particularmente importante aquí, para asegurar que los monos prestaran atención al estímulo base y lo guardaran en su memoria de trabajo. Nuevamente, su conducta psicofísica resultó indistinguible de la que se observó al usar sólo estímulos naturales (Fig. 3c), lo que muestra que las señales evocadas por los estímulos tanto mecánicos como artificiales podían guardarse en la memoria y luego recuperarse con casi la misma fidelidad (46). Finalmente, investigamos si los monos podían desempeñar toda la tarea con base en la aplicación de estímulos puramente artificiales. En la mayoría de las sesiones en que los dos estímulos mecánicos fueron reemplazados por patrones de microestimulación, los monos fueron capaces de alcanzar niveles de discriminación cercanas a los que se obtuvieron al aplicar estímulos mecánicos a las yemas de sus dedos (Fig. 3d). Esto demuestra que la activación de las neuronas AR es suficiente para generar todos los procesos cognoscitivos implicados en la tarea, con sólo un ligero descenso en el desempeño (46).

Cabe señalar dos observaciones adicionales que surgen de estos experimentos. Primero, los experimentos con aferentes primarias habían demostrado que la sensación de vibración es mediada específicamente por las fibras AR (3, 7, 9), pero era más difícil probar esto al nivel de S1. Cuando se aplicó la microestimulación a agrupaciones de neuronas identificadas como de adaptación lenta (AS), los monos apenas podían discriminar o, de hecho, no lograban hacerlo. Conforme se recorrió el electrodo hacia el borde entre las agrupaciones de neuronas AS y AR, el desempeño se mejoraba ligeramente, llegando a su usual grado de exactitud cuando las propiedades AR se hicieron más evidentes en los registros (46). Esto demuestra que las unidades AR y AS, están funcionalmente segregadas en la corteza primaria, confirmando observaciones anteriores (50, 51, 52, 53). Finalmente, al regresar a la cuestión de si la periodicidad es crucial para discriminar la frecuencia, aplicamos patrones de microestimulación aperiódicas que imitaron las series de pulsos mecánicos al azar mencionados arriba (Fig. 3b). Se usaron las mismas frecuencias medias en estas condiciones —20 Hz aún correspondían a 10 descargas aplicadas en 500 ms— pero los pulsos fueron separados por intervalos de tiempo al azar. Todo lo demás siguió igual que antes, alternando pruebas mecánicas y de estimulación, como muestra la Figura 3b. Desde las primeras pruebas, los animales pudieron discriminar tanto

las señales aperiódicas mecánicas como las eléctricas, y con casi el mismo nivel de desempeño que alcanzaron en las pruebas con vibraciones periódicas naturales (43).

Salvo la pequeña disminución en el desempeño notada cuando usamos la estimulación puramente artificial (Fig. 4d), todos los experimentos con microestimulación resultaron plenamente consistentes con la fisiología de S1, y refuerza la idea de que la actividad provocada en las neuronas AR en S1, inician la serie de eventos que conducen a la discriminación de la vibración.

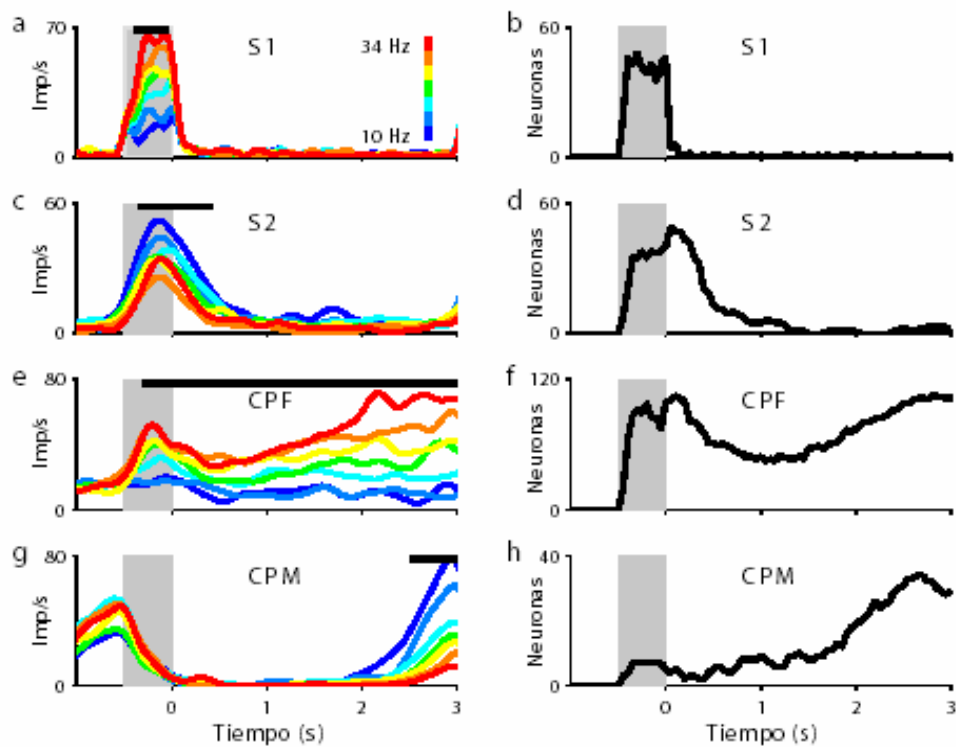


Figura 4. Las respuestas neuronales observadas durante el lapso de tiempo entre f1 y f2 en cuatro áreas corticales. **a, c, e y g.** Funciones de densidad de espigas de cuatro neuronas. Las barras oscuras arriba de cada gráfica indican los periodos en que el índice de disparo de la neurona contenía una señal monótona significativa ($P < 0.01$) acerca del estímulo base. Se usa la intensidad del color para organizar las respuestas según la frecuencia base, como indica el gradiente de la escala. **a, y e,** Estas neuronas dispararon más fuertemente con frecuencias altas. **c y g,** Estas neuronas dispararon más fuertemente con frecuencias bajas. **b, d, f y h,** El número de neuronas registradas que mantuvieron una señal significativa sobre el estímulo base, para algún periodo durante el lapso de tiempo entre f1 y f2; sólo se incluyen los datos recolectados en ensayos con lapso de tiempo fijo de 3 s entre f1 y f2. S1, corteza somatosensorial primaria; S2, corteza somatosensorial secundaria; CPM, corteza premotora medial; CPF, corteza prefrontal.

LA ACTIVIDAD SENSORIAL VS. LA MNEMÓNICA RELATIVA A LA MEMORIA

Una de las características claves de la tarea vibrotáctil es que se requiere el almacenamiento a corto plazo de la información del primer estímulo. Pero, ¿dónde y cómo ocurre esto?. Hasta ahora, la correlación neural (22) más clara del componente de la memoria de trabajo de esta tarea se ha encontrado en la corteza prefrontal (CPF), un área asociada en varios paradigmas con la memoria de trabajo (54, 55, 56, 57, 58). La convexidad inferior de la CPF contiene neuronas que aumentan su actividad según la frecuencia del primer estímulo durante el lapso de tiempo entre el estímulo base (f_1) y el estímulo de comparación (f_2). Al igual que en S2 (30, 31), la dependencia del índice de disparo en la frecuencia base es monótona; poco menos de la mitad de las neuronas tienen gradientes negativos (disparan con mayor intensidad con frecuencias bajas de estimulación), mientras que el resto tiene gradientes positivos (disparan más fuertemente con frecuencias altas de estimulación (22); Fig. 5c). La Figura 4e muestra un ejemplo en forma de una gráfica que representa la media del índice de disparo de una neurona que prefiere frecuencias altas como una función de tiempo para varias frecuencias base.

Esta representación mnemónica no es estática, ya que la intensidad de la actividad persistente varía durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (22). Esto se observa de dos maneras. Primero, no todas las neuronas son activadas al mismo tiempo; algunas simplemente prolongan las respuestas evocadas durante el estímulo base hacia el inicio del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , para luego quedar inactivas antes de la comparación (neuronas tempranas); otras hacen lo contrario: están inactivas al inicio, pero aumentan su actividad hacia el final del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (neuronas tardías); aunque algunas otras —como la de la Figura 4e— abarcan todo el intervalo entre los estímulos (neuronas persistentes).

Como resultado de esta diversidad, el número total de neuronas activadas cambia con el tiempo, como lo muestra la Figura 4f. En todos estos casos, el índice de disparo depende de la frecuencia base, como lo indica la separación entre las huellas en la Figura 4e. Desde la perspectiva de una sola neurona, la representación de frecuencia es claramente dinámica, porque el grado de separación —la fuerza de la señal, cuantificada por la magnitud del coeficiente a_1 — cambia con el tiempo. El segundo fenómeno que enfatiza la flexibilidad de la actividad de la CPF es su capacidad de adaptarse a cambios en la duración del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Cuando se incrementa el intervalo entre los estímulos de 3 a 6 s, los perfiles de activación de las neuronas tardías cambian en forma proporcional a ese lapso. Por lo tanto, estas unidades siempre empiezan a disparar hacia el final del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , independientemente de su duración. Esto es consistente con observaciones anteriores basadas en la utilización de estímulos visuales (59).

Una pregunta clave aquí —especialmente para aquellas unidades que se activan tardíamente durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 — es si la actividad persistente codifica, en efecto, f_1 o si más bien refleja la actividad preparatoria relacionada con la inminente conducta motora. Esta cuestión entra en escena siempre que existe una actividad sostenida que está desacoplada hasta cierto punto de los eventos sensoriales o motores; a menudo la actividad registrada durante las tareas con respuestas motoras diferidas puede ser interpretada como sensorial-dependiente o motor-dependiente; es decir, como mnemónica o preparación para el movimiento (54, 60, 61, 62, 58). En la tarea de discriminación vibrotáctil se puede pensar que la actividad graduada está relacionada con la probabilidad de la ejecución de un movimiento específico, digamos hacia el botón izquierdo. Por ejemplo, con el estímulo establecido en la

Figura 1c, izq., esta probabilidad varía monótonamente según f_1 . Esta interpretación parece poco probable (22), sin embargo, porque se observa el mismo repertorio de respuestas graduadas incluso al tratarse de conjuntos de estímulos en los cuales, para cada frecuencia base, la probabilidad de ejecutar un movimiento particular se mantiene constante en 0.5, como en la Figura 1c (centro). Así, la actividad presente entre estímulos en la CPF luce básicamente como una copia, o extensión, de la actividad desencadenada sensorialmente en S2 durante la estimulación; y parece mantener 'en línea' la información de f_1 .

Aunque la CPF muestra la correlación neural más clara de la memoria de trabajo durante la tarea de discriminación vibratoria, casi estamos seguros que no es la única región cortical implicada en esta función; ya que se ha detectado actividad durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 tanto en áreas más cercanas a la periferia como en otras más cercanas de la salida motora. En S2, aproximadamente un tercio de las neuronas que son moduladas significativamente por la frecuencia del estímulo prolongan sus respuestas al menos unos cuantos cientos de milisegundos más allá del final del primer periodo de estimulación (30, 31). La neurona ilustrada en la Figura 4c es un ejemplo. Su respuesta se deteriora a lo largo de una escala de tiempo relativamente larga; lo cual se hace evidente al compararla con la neurona S1 en la Figura 4a. Las Figuras 4b y 4d muestran el mismo contraste al nivel de la población. La mayoría de las neuronas de S2 con actividad sostenida se vuelven inactivas en el primer segundo del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Estas unidades se parecen a las neuronas tempranas encontradas en la CPF, que también tienen respuestas de relativamente corta duración. Al otro extremo del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , se encontraron respuestas parecidas a las de las neuronas tardías de la CPF, en la corteza premotora medial (CPM), también conocida como las áreas motoras suplementarias y pre-suplementarias (63, 64). Estas unidades también empiezan a disparar hacia el final del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 e incrementan su intensidad paulatinamente. Sus índices de disparo son funciones monótonas de f_1 , con gradientes positivas y negativas (Fig. 5d), y su entrada cambia como una función de la duración del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , al igual que en CPF (35). La Figura 4g muestra las respuestas de una neurona CPM que prefiere frecuencias bajas y que mostró actividad en el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Como se puede observar en la Figura 4h, algunas neuronas de la CPM están activas durante todo el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , pero la actividad de la población aumenta más bien hacia el final. La comparación de diferentes áreas (Fig. 5) muestra que, aún cuando cada una parece contar con su propia identidad funcional, hay un traslape importante en los tipos de respuestas encontradas, lo cual posiblemente refleje una cercana interconectividad dinámica entre ellas (65, 66, 67, 68, 69, 70).

Respecto de la organización de las redes de memoria, hay evidencia de la participación de áreas sensoriales primarias (71, 72), tanto en la modalidad visual como en la somatosensorial (73, 74). En particular, un estudio de Harris y colegas (75), es muy relevante para nuestro trabajo porque usaron un paradigma de discriminación vibrotáctil muy parecido al nuestro. Su experimento es sencillo e ingenioso: en diferentes momentos durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , aplicaron un pulso de estimulación magnética transcranial (TMS) en S1 de sujetos humanos que realizaban la tarea. Estos pulsos interfirieron con la actividad neuronal de S1 durante unos 200 ms. Encontraron que la TMS redujo el desempeño conductual significativamente al aplicarse a S1 en forma contralateral al estímulo y al principio del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (300 o 600 ms después de f_1), pero no tuvo efecto alguno cuando se aplicó más tarde o en S1 ipsilateral. La interpretación es que algo sucede que contribuye a la retención del estímulo en S1 contralateral al inicio del lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Esto ocurre porque S1 es estrictamente contralateral,

mientras que todas las áreas más centrales a S1 tienen campos receptores bilaterales. Por eso, todo efecto lateral se debe a la actividad de S1. Pero, al parecer esto no concuerda con nuestros registros de S1 (30), los cuales no muestran actividad mnemónica significativa (Fig. 5a). Como Harris *et al.* (75) han sugerido, esto podría resultar del sobreentrenamiento de los monos en esta tarea, comparado con los humanos (75). Sin embargo, también contemplamos otra posibilidad: después del estímulo base, es posible que las unidades AR en S1 aumenten o disminuyan sus niveles basales de disparo, o su responsividad, como resultado de la adaptación o de cambios semejantes de excitabilidad. En general, este efecto podría ser muy fuerte, ya que una gran población de neuronas de S1 responde durante la estimulación con aproximadamente la misma intensidad para todos los valores f_1 . Este cambio pequeño y no selectivo en los disparos de muchas neuronas no transmitiría información sobre f_1 , pero podría tener un fuerte impacto funcional sobre las redes de neuronas centrales a S1 (76). Experimentos son necesarios para probar esta hipótesis.

LA EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL PROCESO DE COMPARACIÓN

La componente central de las tareas de discriminación es la comparación de f_2 contra f_1 . Las respuestas observadas durante el periodo de comparación suelen ser complejas, pero en general, reflejan un proceso activo en el cual la actividad neural evocada termina codificando la diferencia f_2-f_1 . Observe que la tarea discriminatoria puede concebirse como un proceso mediante el cual se calcula el signo de esta cantidad. No se observa evidencia de este cálculo en S1, donde las neuronas simplemente responden como funciones de f_2 durante la comparación (Fig. 5a, der.), aunque ya existe en S2 una versión completa del proceso de comparación (30; 31). Para cuantificar la dependencia simultánea de los índices de disparo en f_1 y f_2 , se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de disparo} = a_1 x f_1 + a_2 x f_2 + b$$

Donde b es una constante arbitraria, en tanto que a_1 y a_2 son los coeficientes que miden la fuerza con que f_1 y f_2 modulan la respuesta de las neuronas para un periodo determinado. Al transcurrir el periodo de comparación, a_1 y a_2 pueden cambiar. Por ejemplo, si se calculan los coeficientes de a_1 y a_2 para una sola neurona de S2 en diferentes intervalos, se observa lo siguiente (31). Inicialmente, durante los primeros 100 ms aproximadamente, la neurona responde como una función de f_2 ; es decir, en esta ventana sólo el coeficiente a_2 es significativamente diferente a cero. En los siguientes 100 ms, la respuesta desarrolla una dependencia de f_1 , de tal manera que a_1 se vuelve significativo. A los 200-300 ms después del inicio de la estimulación, a_1 y a_2 tienen aproximadamente la misma magnitud, pero signos opuestos, lo cual significa que la neurona está respondiendo como una función de f_2-f_1 . Este ejemplo es relativamente común, pero hay múltiples variantes. Por ejemplo, podría ser que inicialmente sólo el coeficiente a_1 es significativo —la neurona recuerda la frecuencia aplicada tres segundos antes— y la dependencia en f_2 se desarrolla más tarde. Además, algunas neuronas terminan disparando más fuertemente cuando f_2-f_1 es mayor, mientras que otras lo hacen cuando f_1-f_2 es mayor. Además, las neuronas muestran diferentes trayectorias en el espacio de los valores (a_1 , a_2), y algunas sólo responden a f_2 durante todo el periodo (31).

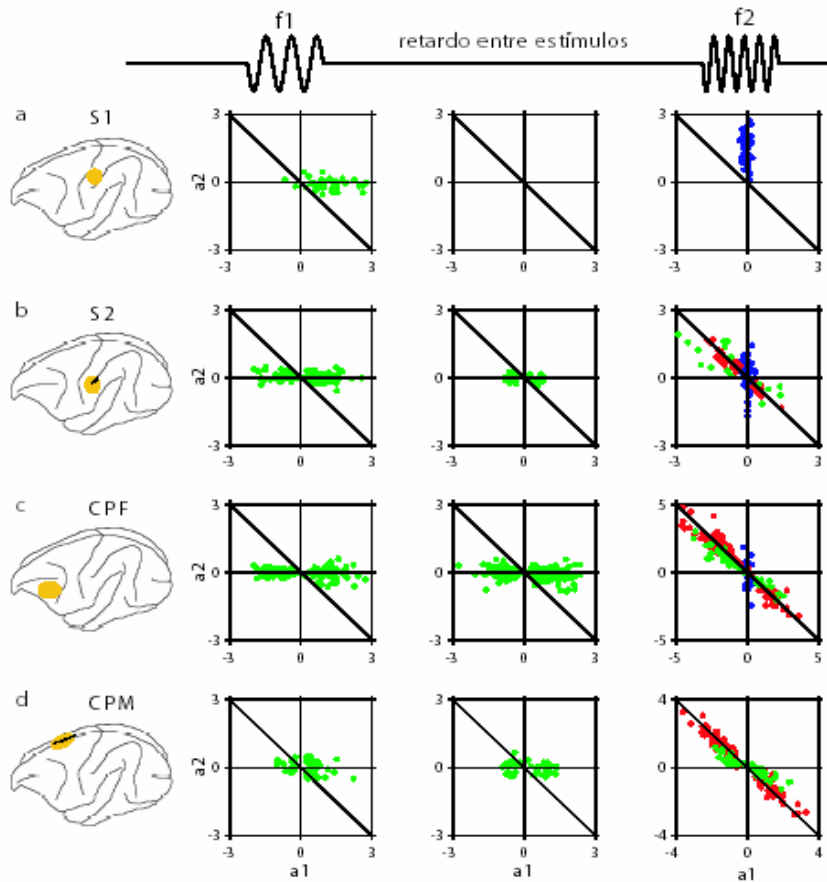


Figura 5. Las dinámicas de población en diferentes áreas corticales durante la tarea de discriminación vibrotáctil. Cada punto representa una sola neurona. Para cada una de ellas, las respuestas fueron adaptadas a la ecuación: $\text{índice de disparo} = a_1x_{f1} + a_2x_{f2} + b$. Los coeficientes a_1 y a_2 fueron calculados a partir de las respuestas en diferentes momentos de la tarea. Los puntos que caen en el eje $a_1 = 0$, representan respuestas que dependen sólo de f_2 (puntos azules); los puntos que caen en el eje $a_2 = 0$ representan respuestas que dependen sólo de f_1 (puntos verdes); los puntos que caen en la línea $a_2 = -a_1$ (línea diagonal) representan respuestas que son funciones de $f_2 - f_1$ (puntos rojos). Los datos mostrados fueron significativamente diferentes de (0,0) en al menos uno de los periodos analizados. **a**, Las respuestas en S1 durante el primer periodo de estimulación (f_1 ; izquierda), durante el periodo entre los estímulos (centro), y durante el segundo periodo de estimulación (f_2 ; derecha). Estas neuronas estuvieron activas sólo durante la estimulación, y la mayoría aumentó sus índices al incrementar la frecuencia (a_1 y a_2 positivos). **b**, Las neuronas S2 responden a f_1 (izquierda) y exhiben una actividad modesta pero significativa durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (centro). Los coeficientes positivos y negativos indican índices que aumentan y decrecen como funciones de la frecuencia, respectivamente. Durante la primera parte de f_2 (derecha), las neuronas pueden tener coeficientes a_1 significativos (puntos verdes) o pueden responder exclusivamente a f_2 (puntos azules), de acuerdo al análisis sobre los primeros 200 ms después del inicio del estímulo. Más tarde, los coeficientes se agrupan alrededor de la línea $a_2 = -a_1$ (puntos rojos), de acuerdo con el análisis sobre los últimos 300 ms antes del final del estímulo. El diagrama del cerebro muestra la región de aproximación a S2, que está oculta en el sulcus lateral. **c**, Datos de CPF. Los coeficientes son calculados como en **b**. **d**, Datos de la CPM. Los coeficientes son calculados como en **b**. (Reproducido de 22, 30, 31, 35, 42).

La Figura 5b (recuadro de la derecha) resume estos resultados aplicando el análisis sobre dos ventanas de tiempo. Los puntos azules y verdes muestran los valores de a_1 y a_2 calculados a partir de las respuestas durante los primeros 200 ms del periodo de comparación (f_2). Los puntos azules corresponden a neuronas que sólo tuvieron una dependencia significativa en f_2 , mientras que los puntos verdes representan las que dependían significativamente de f_1 (independientemente de la sensibilidad a f_2). Está claro que al principio las neuronas S2 respondieron como funciones de f_2 , o que combinaron f_1 y f_2 de varias maneras. Los puntos rojos, en contraste, muestran los valores para a_1 y a_2 calculados a partir de las mismas neuronas, pero utilizando las respuestas de los últimos 300 ms del periodo de comparación; puntos que se agrupan sobre el diagonal $a_2 = -a_1$. Esto significa que en ese momento las neuronas responden como funciones de f_2-f_1 . Así, el repertorio de respuestas en S2 es muy extenso, pero la tendencia general consiste en pasar de codificar f_1 o f_2 hacia la codificación de f_2-f_1 (31).

Este patrón de actividad sugiere que se está combinando las representaciones neurales de f_1 y f_2 con el fin de generar una señal de comparación —la actividad que codifica f_2-f_1 — en que se basa la acción motora usada para indicar el resultado de la discriminación. Si esta interpretación es correcta, las neuronas que codifican la diferencia entre las frecuencias deben ejercer un impacto notable sobre la capacidad de los monos para tomar decisiones (40, 77, 78). Esto fue probado mediante el análisis de los ensayos correctos contra incorrectos y el cálculo, para cada neurona, de un índice que medía la probabilidad de predecir la elección del mono en cualquier ensayo con base en la respuesta de la neurona (31). Estas probabilidades de elección aumentaron a lo largo del periodo de comparación, y los valores más altos fueron generados por las neuronas cuyas respuestas dependieron más fuertemente de f_2-f_1 . Así, consistente con análisis anteriores (30), hubo una asociación cuantificable entre los disparos de una sola neurona y la conducta psicofísica. La fuerza de esta asociación era comparable a la que se reportó en las cortezas prefrontal (79, 80) y en el colículo superior (81), en un paradigma de discriminación de movimiento visual.

Una pregunta central respecto de esta actividad que depende de f_2-f_1 es si esta actividad es producida en las áreas motoras para generar el movimiento que muestra la elección del mono, o si sólo refleja una copia eferente del comando motor asociado. Esto se investigó al medir las latencias de las respuestas de las neuronas de S2 que durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 dependieron de f_2-f_1 , y su comparación con las latencias de las neuronas de la corteza motora primaria (M1) que respondieron de manera distinta durante la tarea (31). Se registraron y analizaron estas neuronas de M1 usando los mismos monos y mediante métodos idénticos. Sus respuestas también pudieron ser entendidas como funciones de f_2-f_1 , porque el signo de esta diferencia determina el movimiento hacia uno u otro de los dos botones, y ambos movimientos generan actividad motora diferenciada. El análisis mostró (82, 83, 84) que las neuronas en S2 disparan significativamente antes que las de M1 (236 ± 21 y 295 ± 20 ms, respectivamente; media \pm DE), con relativamente poco traslape entre las distribuciones de latencia (31).

Por lo tanto, la señal observada en S2 hacia el final del periodo de comparación es consistente con la generación de un proceso que compara f_2 y f_1 mediante el cómputo de la diferencia entre ellas. ¿qué sucede en las otras áreas?

LAS CORRELACIONES NEURALES DE UNA DECISIÓN Y SU EXPRESIÓN MOTORA

S2 no es la única parte de la corteza que muestra los cambios dinámicos que acabamos de comentar. Al igual que el componente de la memoria de trabajo de la tarea, existe un considerable traslape funcional entre las áreas. Esto se puede apreciar al comparar las Figuras 5b-5d (recuadros a la derecha). Unas pocas neuronas en la CPF también responden como funciones de f_2 durante la parte inicial del periodo de comparación (Fig. 5c, puntos azules) y, como comentamos arriba, muchas neuronas de CPF muestran actividad dependiente de f_1 tanto antes del segundo estímulo como a su inicio. La Figura 5c, derecha, muestra que se combina esta información rápidamente con datos de f_2 (recuerda que los puntos azules y verdes fueron computados con base en los primeros 200 ms del periodo de comparación). Al igual que en S2, en la última parte de la comparación las respuestas de las neuronas de CPF llegaron a alinearse con el diagonal $a_2 = -a_1$, consistente con la codificación de f_2 - f_1 . Como lo muestra la figura 5d (derecha), se observa una tendencia similar en la CPM, salvo que aquí las respuestas tempranas parecen acercarse más a la línea $a_2 = -a_1$, que es el caso de S2. La actividad de las neuronas de la CPM durante la tarea ha sido analizada detalladamente, revelando algunas diferencias y similitudes con respecto de las demás estructuras.

Debido a sus proyecciones hacia M1 y a la médula espinal, la CPM ha sido considerada tradicionalmente como una área motora, aunque estudios recientes han demostrado una estrecha participación en procesos que requieren no sólo conducta motora sino que incluyen complejos componentes cognoscitivos, tales como las asociaciones sensorio-motoras, la práctica de memorias motoras y el tiempo de acciones motoras secuenciales (85, 86, 87). Durante la discriminación vibrotáctil, un número significativo de neuronas de la CPM responde al estímulo base (Fig. 5d, izquierda), así que está claro que allí se recibe alguna información sensorial. Al igual que en otras áreas, la dependencia en f_1 es aproximadamente lineal, con gradientes positivas y negativas. Como comentamos arriba, también existe actividad dependiente de f_1 durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (Fig. 5d, centro), la mayor parte de la cual aumenta de intensidad hacia su parte final (Fig. 4h). Como en S2 y la CPF, las respuestas durante el periodo de comparación llegan a alinearse con el diagonal $a_2 = -a_1$, lo cual indica una dependencia de f_2 - f_1 (Fig. 5d, derecha).

La evolución de la actividad de la CPM que codifica f_2 - f_1 se muestra en un formato distinto en la Figura 6. Los trazos verde y azul corresponden a los números de neuronas con coeficientes a_1 significativos o coeficientes a_2 significativos, respectivamente, como funciones del tiempo. Los trazos rojos (d) indican el número de neuronas con a_1 significativo y/o a_2 significativo, cuyos coeficientes son de magnitud similar pero con signos opuestos. Entonces, si las tres curvas se enciman, quiere decir que todas las neuronas respondían como funciones de f_2 - f_1 . La Figura 6a presenta estas cantidades para las neuronas que tuvieron una actividad significativa durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , y la Figura 6b las presenta para las neuronas sin actividad en el mismo periodo, que respondieron más fuertemente durante la comparación. La Figura 6c corresponde a las neuronas sin actividad durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , y que respondieron más fuertemente después de la comparación; es decir, durante el tiempo de reacción. Las señales diferenciales de las neuronas con, y sin, actividad durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (Figs. 5a y 5b, respectivamente) difirieron en su inicio por unos 40 ms; las neuronas con actividad durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 dispararon primero. Las neuronas que llegaron a su punto máximo después del inicio del periodo de comparación mostraron latencias mayores (Fig. 5c). Mientras que las neuronas con actividad durante el lapso

de tiempo entre f_1 y f_2 parecían combinar activamente la información de f_1 y f_2 , ninguna de las neuronas sin actividad en el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 fueron sensibles sólo a f_1 o a f_2 , de manera que sus respuestas podrían relacionarse con el resultado final del proceso de comparación o bien con el comando motor asociado con los movimientos del brazo (35).

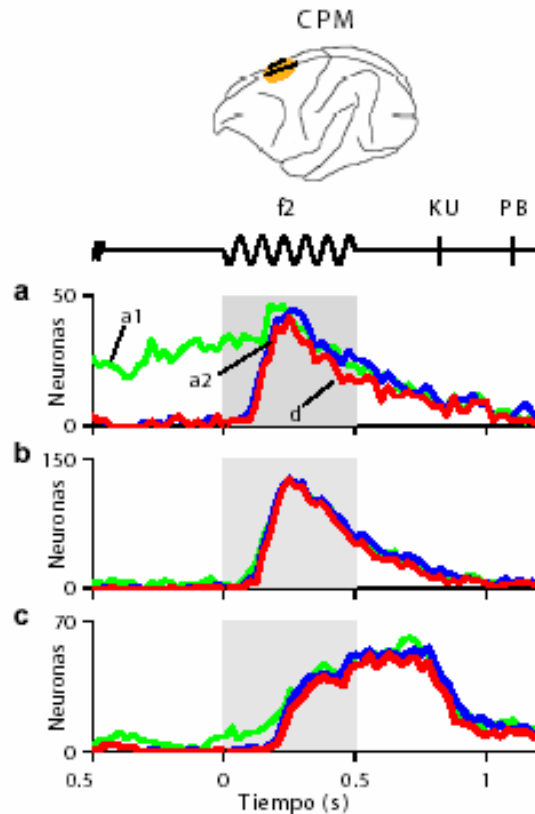


Figura 6. Temporalidad de la actividad diferencial en la CPM. **a**, El número de neuronas con coeficientes a_1 (verde) y a_2 (azul), como funciones del tiempo; d (azul) indica casos en que a_1 y a_2 tuvieron magnitudes similares pero signos opuestos (los puntos cerca del diagonal en la Fig. 5d). **a**, Los datos son de neuronas que mantuvieron una cantidad de información significativa acerca de f_1 durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . **b**, Igual que en **a**, pero para las neuronas sin actividad significativa durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 y que dispararon más fuertemente en el periodo de comparación. La respuesta diferencial (d) está ligeramente retrasada con respecto a **a**. **c**, Igual que en **b**, pero para las neuronas que dispararon más fuertemente después de la comparación, en el periodo de reacción. La respuesta diferencial (d) está retrasada con respecto a **b**. (Reproducido de 35).

Es difícil distinguir entre estas dos posibilidades, y podría ser que en no existe distinción real entre ellas. Esto lo sugiere un reciente estudio con microestimulación que usa un paradigma de discriminación de estímulos visuales, lo cual revela que en el campo visual, la acumulación de la evidencia sensorial equivale al proceso de preparar una respuesta motora (88). En este experimento los monos determinaron la dirección de estímulos dinámicos de puntos al azar e indicaron sus decisiones al mover sus ojos hacia uno u otro de dos blancos. La percepción del movimiento fue interrumpida por pulsos de microestimulación eléctrica que, sin un estímulo sensorial, desencadenaron movimientos de los ojos hacia un sitio determinado. Durante la discriminación, estos movimientos evocados eléctricamente se desviaron hacia un sitio diferente. La magnitud de la desviación dependió de la fuerza del movimiento y del tiempo de percepción, y reflejó la acumulación de información del movimiento visual. Ya que las desviaciones iban hacia un sitio particular, el grado de acumulación equivalió al grado de actividad motora preparatoria de una población de neuronas que generaba un desplazamiento rápido de la mirada hacia ese sitio (88).

Esta equivalencia es consistente con dos análisis complementarios de la actividad de la CPM en la tarea vibratoria (35). Por una parte, como mencionamos arriba, las unidades con actividad en el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 parecen transportar una señal sensorial. Más importantes aun, parecen reflejar el proceso de comparación en sí, ya que la fuerza de su actividad diferencial varía de manera graduada con $f_2 - f_1$. En otras palabras, estas células codifican no sólo el signo de $f_2 - f_1$ —que equivale a la respuesta motora hacia uno u otro de los dos botones— sino la magnitud de la diferencia entre $f_2 - f_1$. Esto puede apreciarse en la Figura 7. La cantidad en el eje Y representa el índice promedio ROC, que es una medida de la diferencia entre dos conjuntos de respuestas neuronales bajo dos condiciones de interés [$f_2 - f_1$]; por ejemplo, las respuestas a los pares (f_1 , f_2) de (28, 20) y de (12, 20) Hz. Este valor no depende de que una neurona prefiera $f_2 > f_1$ o $f_2 < f_1$, y su escala es tal que 0.5 representa una nula diferencia estadística entre las respuestas. Uno significa respuestas totalmente no traslapadas. Los diferentes trazos en la Figura 7 corresponden a [$f_2 - f_1$] igual a 0 (amarillo), 2, 4 y 8 Hz (rojo). La Figura 7a muestra datos de las neuronas de la CPM con una actividad significativa en el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 (como en la Fig. 6a). La separación de las curvas significa que los índices de disparo son afectados por la magnitud de $f_2 - f_1$, y no por su signo. En otras palabras, la diferencia en la actividad entre las pruebas que resultó en un movimiento del brazo u otro depende de la información sensorial. También es interesante notar que el índice ROC se incrementa mucho antes para grandes diferencias entre f_1 y f_2 . La Figura 6b muestra datos de las neuronas de la CPM sin actividad durante el lapso de tiempo entre f_2 y f_2 (como en la Fig. 6b). Su índice ROC tiene una latencia mucho más larga, y son mucho menos sensibles a la magnitud de $f_2 - f_1$; respondiendo esencialmente a su signo. Estos resultados sugieren una verdadera comparación de f_2 y f_1 en las neuronas con actividad durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 , así como una señal motora o preparatoria en las neuronas sin esta actividad.

Por otra parte, el análisis de los ensayos que el sujeto discriminó erróneamente sugiere una respuesta predominantemente motora (41, 35). La Figura 8 muestra evidencia que apoya esta afirmación (35). Sus respuestas se parecen a las de la Figura 7, para neuronas que tienen —Fig. 8a— y que no tienen —Fig. 8b— una actividad significativa durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Se muestran índices de disparo promedio normalizado como funciones del tiempo. Las curvas continuas y punteadas corresponden a discriminaciones correctas e incorrectas, y los trazos naranjas y de color azul cian indican respuestas preferidas y no-preferidas, respectivamente ($f_2 > f_1$ o $f_2 < f_1$, según la neurona). Todos los resultados reflejan diferencias de

± 4 Hz entre f_1 y f_2 . Lo que estas gráficas enseñan es que las respuestas en los ensayos erróneos para la condición correcta son muy parecidas a las respuestas de las pruebas correctas para la condición no-preferida, y *viceversa*. Así, las respuestas asociadas con un determinado movimiento del brazo —digamos, hacia el botón lateral— fueron aproximadamente iguales independientemente de si la discriminación fuera, o no, atinada (35). Esto parecería indicar que la actividad de las neuronas de la CPM codificó la respuesta motora.

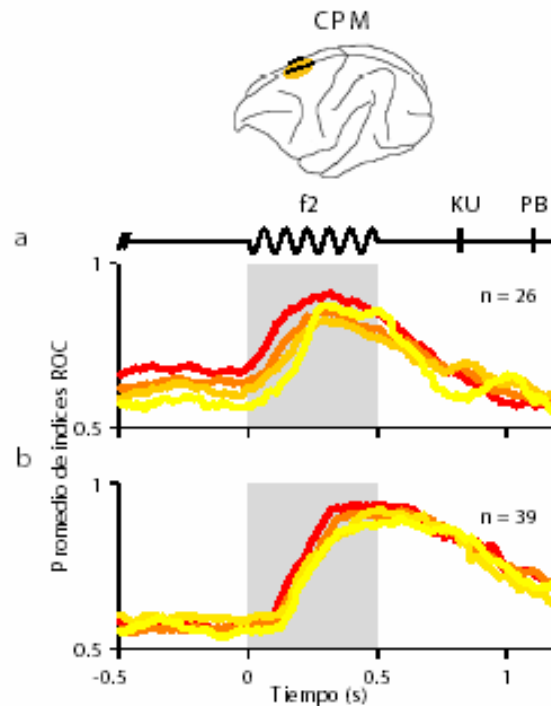


Figura 7. La capacidad discriminatoria de las neuronas de la CPM. Los ejes verticales muestran el índice ROC promedio, para medir la actividad promedio de la respuesta diferencial (es decir, un movimiento del brazo en una dirección o la otra), independientemente de si corresponde a $f_2 > f_1$ o $f_2 < f_1$. Esta cantidad se muestra como una función de tiempo. Las diferencias entre f_1 y f_2 son indicadas por los niveles rojo-a-amarillo, desde 0 Hz (línea amarilla) hasta 2, 4 y 8 Hz (línea roja). Los trazos fueron computados a partir de ensayos con diferentes f_1 pero con un f_2 fijo (Fig. 1c, izq.). **a**, Los índices ROC calculados con base en las neuronas que mantuvieron una señal significativa respecto de f_1 durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Note que la actividad diferencial aumenta durante el periodo de comparación (f_2), y que aumenta con mayor anticipación conforme incrementa la diferencia entre f_1 y f_2 . **b**, Los índices ROC para las neuronas MPC que no mantuvieron una señal significativa respecto de f_1 durante el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . Estas neuronas no muestran índices ROC significativos en el lapso de tiempo entre f_1 y f_2 . La actividad diferencial se desarrolla durante la comparación, pero más tarde que en **a**, y con una magnitud comparable para varias diferencias de frecuencia. (Reproducido de 35).

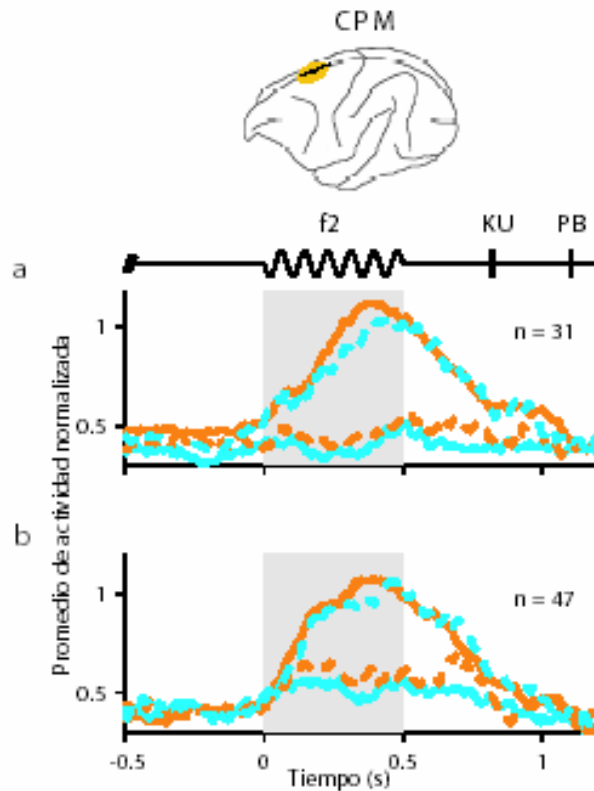


Figura 8. El análisis de ensayos erróneos para las neuronas de la CPM. Las curvas muestran respuestas promedio normalizadas como funciones de tiempo para neuronas con (a) y sin (b) actividad significativa en los lapsos de tiempo entre f_1 y f_2 . Se muestran trazos separados para los ensayos que culminaron en acierto en la condición preferida (línea naranja continua) y no-preferida (línea azul cian continua). Las líneas punteadas corresponden a los ensayos erróneos. La condición preferida es $f_2 > f_1$ o bien $f_2 < f_1$, cualquier de las dos que produce una respuesta más fuerte para una determinada neurona. Los trazos fueron calculados a partir de ensayos con diferencias de 4 Hz entre f_1 y f_2 . La actividad fue normalizada con respecto al índice de disparo más alto. (Reproducido de 35).

Sin embargo, esta interpretación contiene un matiz interesante. Varias neuronas de la CPM fueron examinadas también en un experimento de control en que se usaron los mismos estímulos táctiles —con la misma secuencia de eventos, y pares idénticos de frecuencias— pero se agregó un estímulo visual que indicaba a los monos cuál de los botones era el correcto (35). En esta situación los animales tuvieron que ignorar el estímulo táctil y simplemente seguir el indicador visual. La clave aquí es que el estímulo vibratorio y los movimientos de brazo fueron los mismos que en las pruebas de discriminación normales, pero los procesos cognoscitivos, de la memoria de trabajo y de la comparación de estímulos fueron distintos. Bajo estas condiciones de control, la actividad diferencial desapareció casi por completo. Entonces, la actividad diferencial evocada durante la discriminación no se relaciona sólo con una acción motora, sino

que refleja el resultado final de la comparación de las frecuencias ($f_2 > f_1$ o $f_2 < f_1$), o bien representa un plan motor plenamente canalizado por el contexto conductual de la tarea discriminatoria.

LA UBICUIDAD DE LAS RESPUESTAS SENSORIO-MOTORAS

Shalden y Newsome (41) han presentado una analogía llamativa entre las deliberaciones del jurado en un juicio y la toma de decisiones motoras basada en información sensorial: la evidencia es presentada por testigos, los integrantes del jurado la examinan para llegar a una decisión, que un juez luego ejecuta. Aunque la metáfora llama nuestra atención, nos preguntamos si en realidad las fronteras entre las etapas: sensorial, decisión y motora están trazadas con esta claridad en el cerebro del primate. En la tarea discriminatoria la distinción está más bien borrosa, como muestra el alto grado de traslape entre los tres tipos de actividad: sensorial, decisión y motora (Figura 5). Se ha observado respuestas en el periodo de estimulación base —posiblemente la más sensorial— en todas las áreas examinadas hasta la fecha, incluida M1 (observaciones aún no publicadas; 31). Además, las respuestas correlacionadas con los movimientos del brazo después del final del estímulo de comparación —probablemente relacionados con la ejecución motora— han sido observadas en todas las áreas salvo S1. Esto no quiere decir que todas las áreas sean iguales; las respuestas a f_1 no abundan en M1, de la misma manera que la actividad aparentemente motora después del final de f_2 no es tan fuerte en S2. Empero, existe un traslape claro y extenso entre las características de las respuestas, especialmente para las áreas de la corteza centrales a S1 y M1. Estas diferencias pueden caracterizarse mejor como cambios en las distribuciones de los tipos de respuesta.

A este respecto, es interesante notar que las técnicas de generación de imágenes (89, 90, 91) — tan comunes hoy en día y potencialmente capaces de producir ‘fotografías’ completas de la activación de la corteza— probablemente subestimarían este traslape funcional, debido a su baja resolución temporal y a los procedimientos de umbral usados para determinar patrones de activación estadísticamente significativos. También es probable que estas técnicas subestimarían o, incluso, perderían de vista totalmente, las respuestas diferenciales mencionadas aquí, porque las neuronas diferenciales con gradientes o preferencias de respuesta opuestas son encontradas típicamente al azar a lo largo de alguna penetración, de tal manera que no parecen estar segregadas espacialmente (35). Entonces, es probable que la actividad media de un circuito local, que es más o menos lo que reporta un elemento de imagen, será igual en todas las condiciones de estimulación ($f_2 > f_1$ o $f_2 < f_1$, en nuestra tarea), ya que es probable que incluyen ambos tipos de respuestas.

También hemos observado un alto traslape funcional en una tarea más simple en la cual se tenía que clasificar como ‘rápido’ o ‘lento’ ciertos estímulos táctiles de movimiento. En este caso, encontramos dos tipos de respuestas monótonas que variaban —con gradientes positivas o negativas— como funciones de la velocidad del estímulo. Estas respuestas diferenciales podrían interpretarse como específicas para la categoría del estímulo o específicas para la dirección del movimiento del brazo, pero no era posible trazar una distinción clara en ninguna de las áreas donde se encontraron, incluidas la CPM (92, 93, 83), el putamen (94) y M1 (83, 95). Los patrones de respuestas correctas e incorrectas (83, 84) sugieren una participación a la vez sensorial y motora. La actividad diferencial desapareció casi totalmente en los experimentos de control en los cuales los mismos movimientos de brazo, ejecutados durante la clasificación,

fueron guiados por indicadores visuales. Así, o la actividad diferencial reflejaba el resultado del proceso de clasificación, o correspondía a los comandos motores canalizados por el contexto conductual; es decir, se presenta la misma ambigüedad encontrada en la tarea discriminatoria.

Parece, entonces, que no hay una sola estructura propia que corresponde al estrado del jurado de la analogía jurídica mencionada arriba. Además, las respuestas que mejor se correlacionan con lo que pudiera considerarse una decisión son difíciles de desacoplar de las características sensoriales o motoras. Durante la discriminación de vibración, los elementos que tienen mayores probabilidades de servir en las respuestas relacionadas a la toma de decisiones son las que representan una versión procesada de f_1 y f_2 , pero que no covarían totalmente con las acciones motoras. Las neuronas que transportan información de f_1 justo antes del inicio del estímulo de comparación y que luego responden como funciones de f_2-f_1 (Fig. 6a) parecen reflejar la evolución de un proceso comparativo, ya que prefieren uno de los resultados motores al otro ($f_2 > f_1$ vs. $f_2 < f_1$), aunque de una manera que es sensible a la fuerza de la evidencia sensorial (Figs. 7a, 8a). Se aplican interpretaciones parecidas a la discriminación en su modalidad visual, salvo que en este caso las decisiones conductuales típicamente son indicadas por movimientos oculares. Al igual que en la tarea vibratoria, la actividad que predice hasta cierto punto la decisión del mono, pero que al mismo tiempo refleja la información sensorial, ha sido notada en áreas sensoriales (40, 78) en regiones oculomotoras de la CPF (79), y en estructuras tradicionalmente asociadas con el control oculomotor, tales como la corteza intraparietal lateral (96), en los campos oculo-motores frontales (88) y en el colículo superior (81). ¡Al parecer, el jurado está en todas partes!

¿UN PLAN MOTOR MODULADO POR LA INFORMACIÓN SENSORIAL?

Muchos estudios del control motor han utilizado circuitos relativamente pequeños pero capaces de generar conductas completas, tales como caminar, volar, respirar y masticar (97, 98). Muchos de estos generadores de patrones centrales (CPGs) han sido descritos para los invertebrados, pero algunos circuitos de ese tipo en vertebrados también han sido investigados a detalle. En este contexto, el estímulo sensorial típicamente sirve para cambiar las conductas, para iniciarlas o terminarlas, o bien para acelerarlas o frenarlas; es decir, para modularlas. Esto sugiere que el problema con la anterior analogía del *jurado* es que presupone implícitamente que cuando la evidencia es ambigua —o que por alguna otra razón el jurado no puede llegar a una decisión— no se hace acción alguna. Entonces, la generación de una acción se entiende como un proceso secuencial, en el cual la evaluación de la evidencia sensorial constituye un paso esencial intermedio.

Desde la perspectiva de la literatura sobre los CPGs, la generación de una conducta motora ha sido ilustrada detalladamente en trabajos recientes llevados a cabo en sanguijuelas. En el laboratorio de Bill Kristan, Esch y colegas (99) identificaron una interneurona de la sanguijuela que, al estimularse, desencadena una de dos conductas locomotoras: arrastrar o nadar. La conducta producida depende del nivel de agua alrededor del animal y, por ende, de las neuronas sensoriales que transportan esta información. Aunque la interneurona da el comando “moverse”, el tipo de movimiento en sí se determina más adelante. Estos autores sugieren que estas decisiones quizá procedan de manera jerárquica, en que primero se fija una meta general (por ejemplo, ir de vacaciones) y luego se determinan en forma secuencial los aspectos complementarios (por ejemplo, ¿adónde?, ¿en qué transporte?, ¿por cuánto tiempo?, etcétera).

En el contexto de la tarea de discriminación vibratoria, esta idea significa que en primer lugar se establece un plan para hacer un movimiento del brazo, pero que posteriormente este plan se modifica según la información sensorial y de la memoria. Quizá la actividad neural subyacente se parezca a la de un tren que se encamina hacia una intersección 'Y'. En esta analogía, las vías corresponden a las neuronas y la palanca es controlada por la actividad sensorial y mnemónica. Si la información sensorial no existe o es insuficiente para accionar la palanca —i.e. cuando $f_1 = f_2$ — el tren procede según lo planeado, de un sitio al siguiente, etcétera, y una de las dos vías es seleccionada al azar. Ya que el tren es largo y los caminos se separan sólo paulatinamente, se da un enorme traslape temporal y funcional en la actividad neural observada.

Esta caricatura corresponde en cierto grado a los experimentos de discriminación y a dos importantes resultados. Por una parte, un estudio de lesiones indagó en los efectos de extirpar S1 a monos entrenados para categorizar la velocidad de estímulos táctiles aplicados en la mano (100). Después de sufrir la lesión, los animales realizaron la tarea y se mostraron capaces todavía de detectar los estímulos. Presionaron los botones después de terminado el estímulo y sus tiempos de reacción fueron notablemente normales, como antes de la cirugía. Sin embargo, su capacidad de clasificar cayó casi a niveles del azar. Parecía que el plan motor (desencadenado, se supone, por los mecanismos de detección que retenían) seguía de acuerdo con el programa, pero que la palanca en la intersección 'Y' no funcionaba. El segundo resultado que surge de esta analogía proviene de la tarea de discriminación visual basada en el movimiento de puntos aleatorios. Seidemann y colegas (101) aplicaron una microestimulación intracortical mientras los monos observaban la pantalla. Cuando la microestimulación coincidía con los estímulos visuales, sesgaba las respuestas de los monos, como se había observado anteriormente (44). Sin embargo, cuando fue aplicada un poco tarde o temprano relativo al estímulo visual, no surgió efecto alguno (101). Parecía que la tarea procedió según un programa interno y que la información sensorial fuera de una cierta ventana temporal era bloqueada o ignorada. Retomando la analogía del tren, este resultado equivale a accionar la palanca sin que el tren esté en movimiento.

Las tareas de tiempo de reacción nos dan un acercamiento complementario al problema de cómo caracterizar una población neural en el espectro sensorio-motor (102). Hace poco, Cook y Maunsell (103) realizaron registros de actividad neural en monos mientras realizaban una tarea de detección en que la aplicación de un estímulo visual desencadenaba una reacción motora. Midieron el grado en que las respuestas neuronales covariaron con el tiempo de reacción de los monos. Esta medida quizá pueda usarse como un indicador de *que tan 'motora'* es una cierta área del cerebro. Encontraron que la covariación fue significativamente más fuerte en el área de la corteza intraparietal ventral (VIP), que en la corteza medio temporal (MT), consistente con sus caracterizaciones convencionales de lo motor y lo sensorial, respectivamente. Estos resultados sugieren otra extensión de la analogía del tren: puede haber ciertos mecanismos motoras que aceleran o desaceleran al tren, independientemente de la posición de la palanca. Aunque dichos mecanismos afectarían los tiempos de reacción directamente, sólo afectarían la ejecución indirectamente, quizá al limitar el tiempo de integración sensorial. En contraste, los mecanismos preceptuales deben ejercer un fuerte impacto sobre el desempeño (es decir, sobre cuál de las dos vías sea escogida), pero sólo un efecto menor sobre el tiempo de reacción. Esto es consistente con estudios que sugieren que los procesos motores —y no los preceptuales— constituyen la principal fuente de variación del tiempo de reacción

(104, 105). La analogía del tren tiene algunas características en común con los modelos de la reacción motora en que la actividad aumenta linealmente hasta alcanzar un umbral, donde ya no es posible detener la acción motora. Este aumento lineal se parece a la marcha del tren por las vías (106, 107, 108). Manipular la relación entre exactitud y tiempo de respuesta, o introducir un indicador adicional de tipo 'siga/detente' en diferentes momentos, quizá representarán intentos fructíferos en estudios futuros de los mecanismos neurales subyacentes a la discriminación somatosensorial y a la toma de decisiones.

Vale la pena enfatizar este punto. La dificultad para desenredar los mecanismos biofísicos que subyacen a la discriminación sensorial —por ejemplo, ¿cómo se realiza la comparación exactamente?— no consiste tanto en diseñar un circuito capaz de comparar dos señales, por que la conducta del tipo “*el ganador se lo lleva todo*” está ya bien documentada en varios modelos (109, 110, 111). Un estudio reciente (112) ha llevado esta aproximación a un muy alto nivel de realismo: dos poblaciones neurales, cada una caracterizada por una excitación lenta y recurrente e información sensorial independiente, se inhiben mutuamente y generan una elección binaria que se desarrolla paulatinamente. Cuando se aplica este modelo a los datos de las tareas visuales de discriminación de movimiento, explica bien las curvas psicométricas, las distribuciones de reacción-tiempo y algunas diferencias entre los ensayos acertados y fallidos. Un problema mayor, sin embargo, es cómo captar la flexibilidad de las asociaciones sensorio-motoras en un sistema altamente distribuido (113). ¿Cómo cambia el circuito que subyace a la discriminación de vibración cuando la información sensorial debe ignorarse, como en el caso de la tarea del control de la instrucción visual (76, 35, 31)? ¿Por qué la actividad de la CPM evocada en el periodo de estimulación base no genera movimientos del brazo (35)? ¿Cómo se demora o acelera la respuesta (108)? ¿Qué ocurre al invertir — o de alguna otra manera desasociar— la relación entre los productos de la discriminación y la acción motora de presionar los interruptores (114, 115, 113)? Es probable que para responder estas interrogantes requerirán no sólo experimentos adicionales, sino también trabajos teóricos y de computación neural.

COMENTARIOS FINALES

Los registros obtenidos en varias áreas han proporcionado un panorama bastante completo de la actividad neural que subyace a la discriminación en la discriminación vibrotáctil. Parece que la comparación entre la información sensorial almacenada y la actual es un proceso ampliamente distribuido en el cerebro; ninguna área por sí sola puede ser considerada como el sitio 'único' donde se toman las decisiones. De manera similar, parece haber un *continuum* entre la actividad sensorial y la motora. Puede ser que el plan motor establecido para indicar la respuesta durante la discriminación ya tiene dos posibles resultados, y que la información sensorial ayuda a seleccionar uno de ellos. Estudios futuros desarrollarán y probarán esta idea más rigurosamente.

Referencias

1. Werner G y Mountcastle VB (1965). Neural activity in mechanoreceptive cutaneous afferents: stimulus-response relations, Weber functions, and information transmission. *J Neurophysiol* 28:359–397.
2. Mountcastle VB, Talbot WH, Darian-Smith I y Kornhuber HH (1967). Neural basis of the sense of flutter-vibration. *Science* 155:597–600.

3. Talbot WH, Darian-Smith I, Kornhuber HH y Mountcastle VB (1968). The sense of flutter-vibration: comparison of the human capacity with response patterns of mechanoreceptive afferents from the monkey hand. *J Neurophysiol* 31:301–334.
4. LaMotte RH y Mountcastle VB (1975). The capacities of humans and monkeys to discriminate between vibratory stimuli of different frequency and amplitude: a correlation between neural events and psychological measurements. *J Neurophysiol* 38:539–559.
5. Mountcastle VB, Steinmetz MA y Romo R (1990). Frequency discrimination in the sense of flutter: psychophysical measurements correlated with postcentral events in behaving monkeys. *J Neurosci* 10:3032–3044.
6. Romo R y Salinas E (2001). Touch and go: decision mechanisms in somatosensation. *Annu Rev Neurosci* 24:107–137.
7. Ochoa J y Torebjörk E (1983). Sensations evoked by intraneural microstimulation of single mechanoreceptor units innervating the human hand. *J Physiol* 42:633–654.
8. Macefield G, Gandevia SC y Burke D (1990). Perceptual responses to microstimulation of single afferents innervating joints, muscles and skin of the human hand. *J Physiol* 429:113–129.
9. Vallbo AB (1995). Single-afferent neurons and somatic sensation in humans. En: *The Cognitive Neurosciences*. Gazzaniga MS (Editor). MIT Press. Cambridge, Massachusetts. pp. 237–252.
10. DiCarlo JJ, Johnson KO y Hsiao SS (1998). Structure of receptive fields in area 3b of primary somatosensory cortex in the alert monkey. *J Neurosci* 18:2626–2645.
11. DiCarlo JJ y Johnson KO (1999). Velocity invariance of receptive field structure in somatosensory cortical area 3b of the alert monkey. *J Neurosci* 19:401–419.
12. DiCarlo JJ y Johnson KO (2000). Spatial and temporal structure of receptive fields in primate somatosensory area 3b: effects of stimulus scanning direction and orientation. *J Neurosci* 20:495–510.
13. Connor CE, Hsiao SS, Phillips JR y Johnson KO (1990). Tactile roughness: neural codes that account for psychophysical magnitude estimates. *J Neurosci* 10:3823–3836.
14. Connor CE y Johnson KO (1992). Neural coding of tactile texture: comparisons of spatial and temporal mechanisms for roughness perception. *J Neurosci* 12:3414–3426.
15. Johnson KO, Hsiao SS y Blake DT (1996). Linearity as the basic law of psychophysics: evidence from studies of the neural mechanisms of roughness magnitude estimation. En: *Somesthesia and neurobiology of the somatosensory system*. Franzen O, Johansson RS y Terenius L. (Editores). Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. pp. 213–228
16. Blake DT, Hsiao SS y Johnson KO (1997). Neural coding mechanisms in tactile pattern recognition: the relative contributions of slowly and rapidly adapting mechanoreceptors to perceived roughness. *J Neurosci* 17:7480–7489.
17. Werner G (1980). The study of sensation in physiology. En: *Medical Physiology*, Vol. I. Mountcastle VB. Mosby. St. Louis. pp. 605–628.
18. Hernández H, Salinas E, García R y Romo R (1997). Discrimination in the sense of flutter: new psychophysical measurements in monkeys. *J Neurosci* 17:6391–6400.
19. Johnson KO (1980). Sensory discrimination: neural processes preceding discrimination decision. *J Neurophysiol* 43:1793–1815.
20. Vogels R y Orban G (1990). How well do response changes of striate neurons signal differences in orientation: a study in the discriminating monkey. *J Neurosci* 10:3543–3558.
21. Vázquez P, Cano M y Acuña C (2000). Discrimination of line orientation in humans and monkeys. *J Neurophysiol* 83:2639–2648.
22. Romo R, Brody CD, Hernández A y Lemus L (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* 339:470–473.
23. Gray CM (1999). The temporal correlation hypothesis of visual feature integration: still alive and well. *Neuron* 24:31–47.
24. Shadlen MN y Movshon JA (1999). Synchrony unbound: a critical evaluation of the temporal binding hypothesis. *Neuron* 24:67–77.
25. Salinas E y Sejnowski TJ (2001). Correlated neuronal activity and the flow of neural information. *Nat Rev Neurosci* 2:539–550.

26. Phillips JR, Johansson RS y Johnson KO (1992). Responses of human mechanoreceptive afferents to embossed dot arrays scanned across fingerpad skin. *J Neurosci* 12:827–839.
27. Johnson KO y Hsiao SS (1992). Neural mechanisms of tactual form and texture perception. *Annu Rev Neurosci* 15:227–250.
28. Mountcastle VB, Talbot WH, Sakata H y Hyvarinen J (1969). Cortical neuronal mechanisms in flutter vibration studied in unanesthetized monkeys. *J Neurophysiol* 32:453–484.
29. Recanzone GH, Merzenich MM y Schreiner CE (1992). Changes in the distributed temporal response properties of SI cortical neurons reflect improvements in performance on a temporally based tactile discrimination task. *J Neurophysiol* 67:1071–1091.
30. Salinas E, Hernández H, Zainos A y Romo R (2000). Periodicity and firing rate as candidate neural codes for the frequency of vibrotactile stimuli. *J Neurosci* 20:5503–5515.
31. Romo R, Hernández A, Zainos A, Lemus L y Brody CD (2002). Neuronal correlates of decision-making in secondary somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 5:1217–1225.
32. Pons TP, Garraghty PE, Friedman DP y Mishkin M (1987). Physiological evidence for serial processing in somatosensory cortex. *Science* 237:417–420.
33. Pons TP, Garraghty PE y Mishkin M (1992). Serial and parallel processing of tactual information in somatosensory cortex of rhesus monkeys. *J Neurophysiol* 68:518–527 (1992).
34. Burton H, Fabri M y Alloway K (1995). Cortical areas within the lateral sulcus connected to cutaneous representations in areas 3b and 1: a revisited interpretation of the second somatosensory area in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 355:539–562.
35. Hernández A, Zainos A y Romo R (2002). Temporal evolution of a decision-making process in medial premotor cortex. *Neuron* 33:959–97.
36. Sinclair RJ y Burton H (1993). Neuronal activity in the second somatosensory cortex of monkeys (*Macaca mulatta*) during active touch of gratings. *J Neurophysiol* 70:331–350.
37. Jiang W, Tremblay F y Chapman CE (1997). Neuronal encoding of texture changes in the primary and the secondary somatosensory cortical areas of monkeys during passive texture discrimination. *J Neurophysiol* 77:1656–1662.
38. Leopold DA y Logothetis NK (1996). Activity changes in early visual cortex reflect monkeys' percepts during binocular rivalry. *Nature* 379:549–553.
39. Green DM y Swets JA (1966). *Signal Detection Theory and Psychophysics*. Wiley. New York.
40. Britten KH, Shadlen MN, Newsome WT y Movshon JA (1992). The analysis of visual motion: a comparison of neuronal and psychophysical performance. *J Neurosci* 12:4745–4765.
41. Shadlen MN y Newsome WT (1996). Motion perception: seeing and deciding. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:628–633.
42. Hernández A, Zainos A y Romo R (2000). Neuronal correlates of sensory discrimination in the somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6191–6196.
43. Romo R, Hernández A, Zainos A y Salinas E (1998). Somatosensory discrimination based on cortical microstimulation. *Nature* 392:387–390.
44. Salzman CD, Murasugi CM, Britten KH y Newsome WT (1992). Microstimulation in visual area MT: effects on direction discrimination performance. *J Neurosci* 12:2331–2355.
45. Britten KH y van Wezel RJ (1998). Electrical microstimulation of cortical area MST biases heading perception in monkeys. *Nat Neurosci* 1:59–63.
46. Romo R, Hernández A, Zainos A, Brody CD y Lemus L (2000). Sensing without touching: psychophysical performance based on cortical microstimulation. *Neuron* 26:273–278.
47. Graziano MS, Taylor CS y Moore T (2002). Complex movements evoked by microstimulation of precentral cortex. *Neuron* 34:841–851.
48. Wickersham I y Groh JM (1998). Electrically evoking sensory experience. *Curr Biol* 8:412–414.
49. Seidemann E, Arieli A, Grinvald A y Slovin H (2002). Dynamics of depolarization and hyperpolarization in the frontal cortex and saccade goal. *Science* 295:862–865.
50. Mountcastle VB (1957). Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408–434.

51. Powell TPS y Mountcastle VB (1959). Some aspects of the functional organization of the cortex of the postcentral gyrus of the monkey: a correlation of findings obtained in a single unit analysis with cytoarchitecture. *Bull Johns Hopkins Hosp* 105:133–162.
52. Jones EG, Burton H y Porter R (1975). Commisural and cortico-cortical 'columns' in the somatic sensory cortex of primates. *Science* 190:572–574.
53. Sur M, Wall JT y Kaas JH (1984). Modular distribution of neurons with slowly adapting and rapidly adapting responses in area 3b of somatosensory cortex in monkeys. *J Neurophysiol* 51:724–744.
54. Fuster JM (1989). *The Prefrontal Cortex*. Raven. New York.
55. Funahashi S, Bruce CJ y Goldman-Rakic PS (1989). Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 61:331–349.
56. Miller EK, Erickson CA, y Desimone R (1996). Neural mechanisms of visual working memory in prefrontal cortex of the macaque. *J Neurosci* 16:5154–5167.
57. D'Esposito M, Ballard D, Zarahn E y Aguirre GK (2000). The role of prefrontal cortex in sensory memory and motor preparation: an event-related fMRI study. *Neuroimage* 11:400–408.
58. D'Esposito M, Postle BR y Rypma B (2000). Prefrontal cortical contributions to working memory: evidence from event-related fMRI studies. *Exp Brain Res* 133:3–11.
59. Kojima S y Goldman-Rakic PS (1982). Delay-related activity of prefrontal neurons in rhesus monkeys performing delayed response. *Brain Res* 248:43–49.
60. Bruce CJ y Goldberg ME (1985). Primate frontal eye fields. I. Single neurons discharging before saccades. *J Neurophysiol* 53:603–635.
61. Quintana J y Fuster JM (1992). Mnemonic and predictive functions of cortical neurons in a memory task. *Neuroreport* 3:721–724.
62. Asaad WF, Rainer G y Miller EK (1998). Neural activity in the primate prefrontal cortex during associative learning. *Neuron* 21:1399–1407.
63. Tanji J (1996). New concepts of the supplementary motor area. *Curr Opin Neurobiol* 6:782–787.
64. Luppino G y Rizzolatti G (2000). The organization of the frontal motor cortex. *News Physiol Sci* 15:219–224.
65. Jones EG y Powell TPS (1969). Connexions of the somatic sensory cortex of the rhesus monkey. II. Contralateral cortical connexions. *Brain* 92:717–730.
66. Jones EG y Powell TPS (1969). Connexions of the somatic sensory cortex of the rhesus monkey. I. Ipsilateral cortical connexions. *Brain* 92:477–502.
67. Jones EG, Coulter JD y Hendry SH (1978). Intracortical connectivity of architectonic fields in the somatic sensory, motor and parietal cortex of monkeys. *J Comp Neurol* 181:291–347.
68. Luppino G, Matelli M, Camarda R y Rizzolatti G (1993). Corticocortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (pre-SMA) in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 338:114–140.
69. Cipolloni PB y Pandya DN (1999). Cortical connections of the frontoparietal opercular areas in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 403:431–458.
70. Miller EK y Cohen JD (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202.
71. Kosslyn SM, Thompson WL, Kim IJ y Alpert NM (1995). Topographical representations of mental images in primary visual cortex. *Nature* 378:496–498.
72. Kosslyn SM, Pascual-Leone A, Felician O, Camposano S, Keenan JP, Thompson WL, Ganis G, Sukel KE y Alpert NM (1999). The role of area 17 in visual imagery: convergent evidence from PET and rTMS. *Science* 284:167–170.
73. Zhou YD y Fuster JM (1996). Mnemonic neuronal activity in somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10533–10537.
74. Zhou YD y Fuster JM (1997). Neuronal activity of somatosensory cortex in a cross-modal (visuo-haptic) memory task. *Exp Brain Res* 116:551–555.
75. Harris JA, Miniussi C, Harris IM y Diamond ME (2002). Transient storage of a tactile memory trace in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 22:8720–8725.
76. Salinas, E. Background synaptic activity as a switch between dynamical states in a network. *Neural Comput.* (in press).

77. Shadlen MN, Britten KH, Newsome WT y Movshon JA (1996). A computational analysis of the relationship between neuronal and behavioral responses to visual motion. *J Neurosci* 16:1486–1510.
78. Dodd JV, Krug K, Cumming BG y Parker AJ (2001). Perceptually bistable three-dimensional figures evoke high choice probabilities in cortical area MT. *J Neurosci* 21:4809–4821.
79. Kim JN y Shadlen MN (1999). Neural correlates of a decision in the dorsolateral prefrontal cortex of the macaque. *Nat Neurosci* 2:176–185.
80. Shadlen MN y Newsome WT (2001). Neural basis of a perceptual decision in the parietal cortex (area LIP) of the rhesus monkey. *J Neurophysiol* 86:1916–1936.
81. Horwitz GD y Newsome WT (2001). Target selection for saccadic eye movements: direction-selective visual responses in the superior colliculus. *J Neurophysiol* 86:2527–2542.
82. Mountcastle VB, Atluri P y Romo R (1992). Selective output-discriminative signals in the motor cortex of waking monkeys. *Cereb Cortex* 2:277–294.
83. Salinas E y Romo R (1998). Conversion of sensory signals into motor commands in primary motor cortex. *J Neurosci* 18:499–511.
84. Salinas E y Romo R (1998). Neuronal representations in categorization task: sensory to motor transformation. En: *Computational Neuroscience: Trends in Research 98*. Bower J. (Editor). Plenum. New York. pp. 599–604.
85. Tanji J (1994). The supplementary motor area in the cerebral cortex. *Neurosci Res* 19:251–268.
86. Picard N y Strick PL (1996). Medial wall motor areas: a review of their location and functional activation. *Cereb Cortex* 6:342–353.
87. Geyer S, Matelli M, Luppino G y Zilles K (2000). Functional neuroanatomy of the primate isocortical motor system. *Anat Embryol (Berl)* 202:443–474.
88. Gold JI y Shadlen MN (2000). Representation of a perceptual decision in developing oculomotor commands. *Nature* 404:390–394.
89. Bodegard A, Geyer S, Grefkes C, Zilles K, Roland PE (2001). Hierarchical processing of tactile shape in the human brain. *Neuron* 31:317–328.
90. Logothetis NK, Pauls J, Auggath M, Trinath T y Oeltermann A (2001). Neurophysiological basis of the fMRI signal. *Nature* 412:150–157.
91. Logothetis, N.K. The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. *Phil Trans R Soc Lond B* 357:1003–1037.
92. Romo R, Ruiz S, Crespo P, Zainos A y Merchant H (1992). Representation of tactile signals in primate supplementary motor area. *J Neurophysiol* 70:2690–2694.
93. Romo R, Merchant H, Zainos A y Hernández A (1997). Categorical perception of somesthetic stimuli: psychophysical measurements correlated with neuronal events in primate medial premotor cortex. *Cereb Cortex* 7:317–326.
94. Merchant H, Zainos A, Hernández A, Salinas E y Romo R (1997). Functional properties of primate putamen neurons during the categorization of tactile stimuli. *J Neurophysiol* 77:1132–1154.
95. Horwitz GD y Newsome WT (1998). Sensing and categorizing. *Curr Biol* 8:376–378.
96. Platt ML y Glimcher PW (1999). Neural correlates of decision variables in parietal cortex. *Nature* 400:233–238.
97. Marder E y Calabrese RL (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76:687–717.
98. Friesen WO y Cang J (2001). Sensory and central mechanisms control intersegmental coordination. *Curr Opin Neurobiol* 11:678–83.
99. Esch T, Mesce KA y Kristan WB (2002). Evidence for Sequential Decision Making in the Medicinal Leech. *J Neurosci* 22:11045–11054.
100. Zainos A, Merchant H, Hernández A, Salinas E y Romo R (1997). Role of primary somatic sensory cortex in the categorization of tactile stimuli: effects of lesions. *Exp Brain Res* 115:357–360.
101. Seidemann E, Zohary U y Newsome WT (1999). Temporal gating of neural signals during performance of a visual discrimination task. *Nature* 394:72–75.
102. Roitman JD y Shadlen MN (2002). Response of neurons in the lateral intraparietal area during a combined visual discrimination reaction time task. *J Neurosci* 22:9475–9489.

103. Cook EP y Maunsell JH (2002). Dynamics of neuronal responses in macaque MT and VIP during motion detection. *Nat Neurosci* 5:985–994.
104. Thompson KG, Hanes DP, Bichot NP y Schall JD (1996). Perceptual and motor processing stages identified in the activity of macaque frontal eye field neurons during visual search. *J Neurophysiol* 76:4040–4055.
105. Schall JD y Thompson KG (1999). Neural selection and control of visually guided eye movements. *Annu Rev Neurosci* 22:241–259.
106. Hanes DP y Schall JD (1996). Neural control of voluntary movement initiation. *Science* 274:427–430.
107. Hanes DP y Carpenter RH (1999). Countermanding saccades in humans. *Vision Res* 39:2777–2791.
108. Reddi BA y Carpenter RH (2000). The influence of urgency on decision time. *Nat Neurosci* 3:827–830.
109. Hertz J, Krogh A y Palmer RG (1991). *Introduction to the theory of neural computation*. Addison-Wesley. New York.
110. Salinas E y Abbott LF (1996). A model of multiplicative neural responses in parietal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11956–11961.
111. Gold JI y Shadlen MN (2001). Neural computations that underlie decisions about sensory stimuli. *Trends Cogn Sci* 5:10–16.
112. Wang XJ (2002). Probabilistic decision making by slow reverberation in cortical circuits. *Neuron* 36:955–968.
113. Murray EA, Bussey TJ y Wise SP (2002). Role of prefrontal cortex in a network for arbitrary visuomotor mapping. *Exp Brain Res* 133:114–129.
114. Olson CR y Gettner SN (1999). Macaque SEF neurons encode object-centered directions of eye movements regardless of the visual attributes of instructional cues. *J Neurophysiol* 81:2340–2346.
115. Wallis JD, Anderson KC y Miller EK (2001). Single neurons in prefrontal cortex encode abstract rules. *Nature* 411:953–956.

Semblanza del Dr. Ranulfo Romo Trujillo.



Nació el 28 de agosto de 1954. Es médico cirujano por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (1978) y doctor en Ciencias (doctorado de Estado) por la Universidad de París (1985). Entre sus numerosas distinciones cuenta con diversos reconocimientos por su trabajo en neurociencias, entre ellos la distinción Universidad Nacional a Jóvenes Académicos de la UNAM, el Premio Miguel Alemán Valdés y el Premio de Ciencia y Tecnología Manuel Noriega Morales que otorga la Organización de Estados Americanos (OEA). Sus investigaciones de frontera forma parte de los Proyectos del Milenio financiados por el Banco Mundial, la Fundación Howard Hughes y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

LA MIGRACIÓN DE GENES DE LA MITOCONDRIA AL NÚCLEO Y LA EVOLUCIÓN DE LOS GENOMAS MITOCONDRIALES.

Diego González-Halphen¹, Xochitl Pérez-Martínez², Soledad Funes³, Adrián Reyes-Prieto¹ y José Luis Santillán-Torres^{1,4}.

1. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (México)
2. Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca, New York 14853 (EEUU)
3. Institut für Physiologische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5, Munich 81377 (Alemania)
4. Unidad de Microarreglos, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (México)

dhalphen@ifc.unam.mx

Introducción

Las mitocondrias son organelos que se encuentran presentes en la gran mayoría de las células eucariontes y que tienen una participación fundamental en el metabolismo celular. Además de producir ATP mediante la fosforilación oxidativa, se relacionan con procesos de muerte celular, de envejecimiento, y con diversos procesos patológicos. En general las mitocondrias presentan una forma ovalada cuyo tamaño, estructura interna, y número por célula varía en los diferentes tipos

ABREVIATURAS: <H> hidrofobicidad local (local hydrophobicity); *mesoH* mesohidrofobicidad (mesohydrophobicity); ADNmt ADN mitocondrial (mtDNA: mitochondrial DNA); *ARNt* *ARN de transferencia*; *FOS-OX* *fosforilación oxidativa*

celulares. Están compuestas por dos membranas, una interna y una externa, que engloban una matriz densa que incluye a múltiples enzimas del metabolismo intermediario. Las mitocondrias también contienen varias copias de un genoma que codifica proteínas de la membrana interna, y algunos elementos necesarios para su traducción como RNAs ribosomales y de transferencia. Los otros cientos de proteínas que requiere la mitocondria para su funcionamiento se encuentran codificadas en el genoma nuclear y son sintetizadas en el citosol.

¿Cuál es la explicación de que las mitocondrias tengan su genoma propio? ¿Qué ha favorecido que en el interior de las mitocondrias se conserve un complejo mecanismo de replicación y transcripción para la producción de unas cuantas proteínas? En esta revisión, se discuten algunas de las teorías que se han propuesto para explicar la presencia y conservación de los genomas mitocondriales, así como las tendencias evolutivas que se han observado en estas moléculas.

EL ORIGEN ENDOSIMBIÓTICO DE LAS MITOCONDRIAS

La explicación más aceptada del origen de las mitocondrias se conoce como la teoría de la endosimbiosis. Sin embargo, no existe aún total acuerdo sobre quienes fueron los protagonistas involucrados en este proceso de endosimbiosis, por lo que se han planteado varias alternativas. Una de las más aceptadas, propone que estos organelos son descendientes de un endosimbionte bacteriano (una α -proteobacteria) que se estableció en el citosol de un protoeucariote en una etapa temprana de la evolución (1). Las secuencias de genes mitocondriales han permitido rastrear los orígenes de las mitocondrias hacia un ancestro de los miembros de la subdivisión de los rickettsiales, a la cual pertenecen parásitos intracelulares obligados de los géneros *Rickettsia*, *Anaplasma* y *Ehrlichia* (2,3). Una hipótesis alternativa, la hipótesis del hidrógeno, sugiere que los eucariontes se originaron por la asociación metabólica entre una α -proteobacteria anaeróbica facultativa que generaba hidrógeno y bióxido de carbono como productos de desecho, y una archaea metanógena anaeróbica estricta y autotrófica cuyo metabolismo dependía del hidrógeno. Esta propuesta explica las posibles presiones evolutivas que favorecieron el establecimiento de la endosimbiosis (4, 5). Esta hipótesis también sugiere que el origen de las mitocondrias y de las células eucariontes ocurrió de manera simultánea. Una tercera hipótesis, la hipótesis de la sintrofia, sugiere que la fusión inicial entre una archaia y una α -proteobacteria dió lugar al primer protoeucariote. Este proceso fue seguido por la endosimbiosis de una α -proteobacteria, la cual dió origen a las mitocondrias (6). Sea cuales fueren los protagonistas involucrados, se piensa que la endosimbiosis que dio origen a las mitocondrias ocurrió en una sola ocasión (7), por lo que se dice que estos organelos tienen un origen monofilético (es decir, derivan de un ancestro común).

La endosimbiosis no es un fenómeno raro en la naturaleza. Existen varias especies de bacterias que coexisten con un hospedero eucariote (8) o bacterias que habitan en el interior de otras bacterias (9). Incluso, el fenómeno de simbiosis intracelular ha sido reproducido en el laboratorio, al introducir ciertas cepas bacterianas en algunas amibas y formar endosimbiontes estables (10).

Actualmente, las mitocondrias conservan varias características similares a células procariontes: se dividen mediante un mecanismo similar a la fisión binaria; los procesos respiratorios que suceden en su interior son muy similares a los que ocurren en las bacterias aeróbicas actuales; y en la matriz mitocondrial es posible encontrar varias copias de un genoma

mitocondrial (11) así como ARNs y ribosomas de tipo bacteriano que participan en la síntesis de proteínas.

Recientemente, Karlberg y col. (12) realizaron un análisis de las más de 400 proteínas que se predice son funcionales en la mitocondria de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y encontraron que la mayoría de los genes provenientes de la α -proteobacteria que dió origen a la mitocondria se han perdido en el transcurso de la evolución del organelo. Así mismo, resulta interesante que no todas las proteínas mitocondriales tienen su origen en el endosimbionte bacteriano, muchas de ellas provienen del hospedero, tal es el caso del translocador de adenín nucleótidos, por lo tanto el proteoma mitocondrial actual es un mosaico de proteínas de origen eubacteriano y arqueobacteriano. De tal suerte que sólo un grupo pequeño de proteínas se codifica en el genoma mitocondrial y se sintetiza utilizando la maquinaria traduccional del organelo. Sin embargo, la mayor parte de los componentes del proteoma mitocondrial (más del 97%) son sintetizados en el citosol, ya sea en ribosomas que se encuentran libres o en polisomas que se encuentran adyacentes a la membrana externa mitocondrial. Se ha planteado que el reclutamiento de ribosomas por la membrana externa sucede exclusivamente para la síntesis de las proteínas codificadas por los genes provenientes del ancestro premitocondrial (13).

LA DIVERSIDAD DE LOS GENOMAS MITOCONDRIALES

Los genomas mitocondriales actuales son el resultado de una reducción del genoma bacteriano del endosimbionte original, y a pesar de que en principio todos los genomas mitocondriales son derivados de un mismo ancestro común, cada grupo particular de organismos ha evolucionado de manera distinta. Actualmente los genomas mitocondriales presentan una gran diversidad en tamaño, organización, y complejidad génica. Existen genomas mitocondriales circulares o lineales; el tamaño puede variar desde un poco menos de 6 kb en *Plasmodium falciparum* (14) hasta más de 2000 kb en algunas plantas cucurbitáceas (15) (Figura 1). Las diferencias tan notables en los tamaños de las moléculas obedecen fundamentalmente a diferencias en el contenido de regiones intergénicas no codificantes. Por ejemplo, en plantas, sólo entre el 10 y el 20 % del ADN mitocondrial (ADNmt) contiene genes estructurales (2), el resto son regiones intergénicas no codificantes. En contraste, algunos genomas mitocondriales en protozoarios, más del 90% de su ADNmt corresponde a genes estructurales.

A pesar de la enorme diversidad de los genomas mitocondriales, en general todos ellos presentan genes que codifican para ARNs ribosomales (ARNr), ARNs de transferencia (ARNt), un conjunto variable de proteínas involucradas en la síntesis de proteínas, y un conjunto limitado de subunidades polipeptídicas de los complejos membranales translocadores de protones de la fosforilación oxidativa (FOS-OX) (7). Algunos genomas mitocondriales presentan incluso variaciones en el código genético universal. Por ejemplo, las mitocondrias de mamíferos reconocen el codón UGA como codificador del triptofano en lugar de codón de término, y a los codones AGA y AGG como señales de terminación en lugar de codificar una arginina. En las mitocondrias de algunos hongos, de mamíferos, y de *Drosophila*, el codón AUU es reconocido como codificador de metionina en lugar de isoleucina, como sucede en el código genético universal.

Cuando pensamos en la complejidad génica y no en el tamaño (es decir, cuando pensamos en el genoma mitocondrial que contiene el mayor número de genes funcionales), nos encontramos con el ADNmt de 69 kb del protista *Reclinomonas americana* (16). La mitocondria de este flagelado se conoce como “la mitocondria que el tiempo olvidó”, ya que la estructura y organización de su genoma se asemeja mucho al de un genoma bacteriano reducido. El genoma mitocondrial de *R. americana* es el que contiene el mayor número de genes, los cuales codifican 24 proteínas que participan en la FOS-OX, y 38 proteínas involucradas en la transcripción, la traducción, la importación, y la maduración de proteínas. La comparación del genoma mitocondrial de *R. americana* con el genoma completo de *Rickettsia prowazekii* (el genoma bacteriano más parecido a un genoma mitocondrial) (3) muestran semejanzas tanto en las secuencias como en la organización y disposición de sus genes.

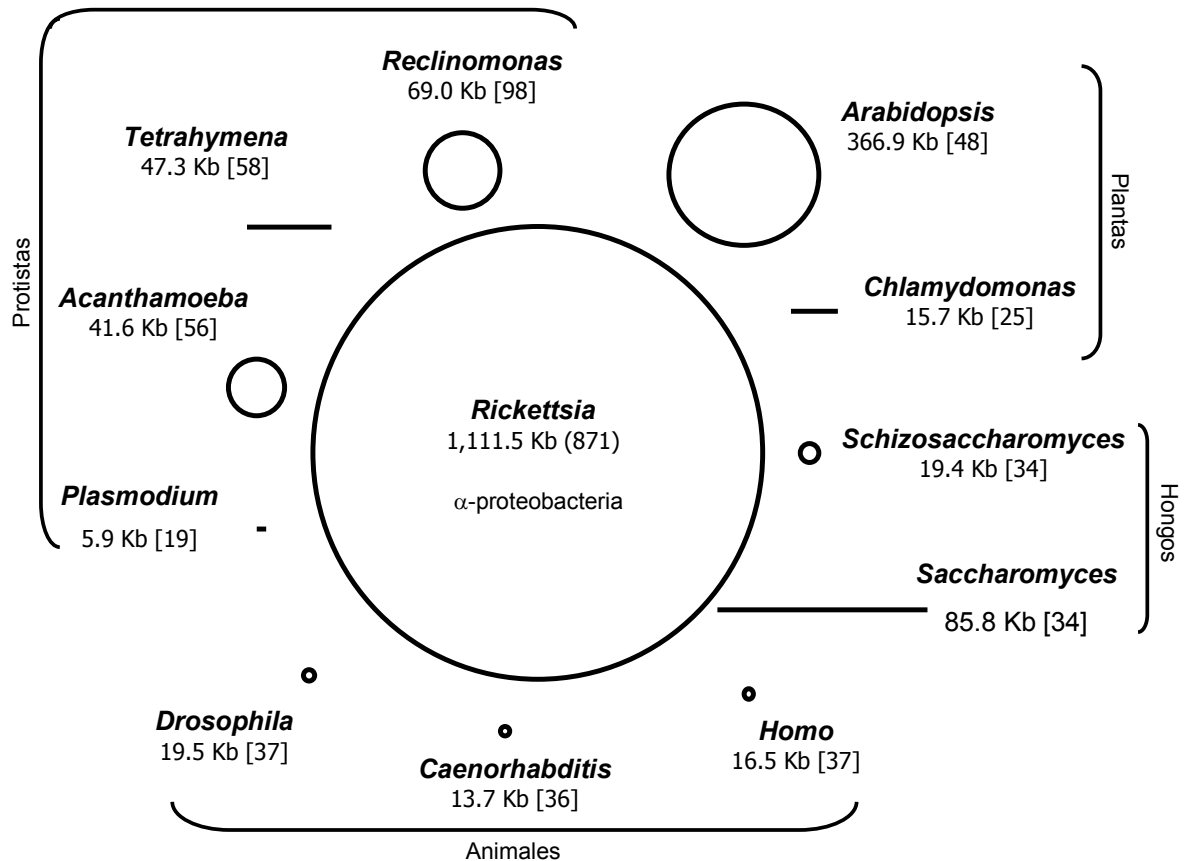


Figura 1. Tamaño relativo de diversos genomas mitocondriales, comparado al de la bacteria *Rickettsia prowazekii*. El tamaño de cada genoma mitocondrial se indica en kilobases (kb), y el número de genes codificados entre paréntesis cuadrados. La línea o el círculo, indican si se trata de un genoma lineal o circular, respectivamente.

En el otro extremo del espectro de complejidad génica se encuentran los genomas mitocondriales extremadamente reducidos de los parásitos apicomplejos *Plasmodium falciparum* y *Theileria parva*; el primero corresponde al agente responsable de la malaria, y el segundo, es el causante de la enfermedad conocida como “fiebre de la Costa del Este” en el ganado vacuno. Estos ADNmt contienen únicamente tres genes que codifican para componentes de la cadena respiratoria *cob*, *cox1*, y *cox3* (14), que codifican al citocromo *b* y a las subunidades I y III de la citocromo *c* oxidasa respectivamente.

Entre los genomas mitocondriales de tamaño medio, encontramos los ADNmt de vertebrados y hongos. En mamíferos encontramos un conjunto casi invariable de 13 genes que codifican para componentes clásicos de la FOS-OX (probablemente los componentes ancestrales, es decir, aquellas subunidades que se encontraban presentes en los complejos de la bacteria endosimbionte): *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6* (subunidades del complejo I o NADH:ubiquinona oxidorreductasa), *cob* (el citocromo *b* del complejo III o ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa), *cox1*, *cox2*, *cox3* (subunidades del complejo IV o citocromo *c* oxidasa), *atp6*, *atp8* y *atp9* (subunidades de la F_1F_0 -ATP sintetasa) (17).

INTERNALIZACIÓN EN LA MITOCONDRIA DE LAS PROTEÍNAS SINTETIZADAS EN EL CITOPLASMA

Aunque la contribución del ADNmt es esencial, la mayor parte de la información para la función y biogénesis mitocondrial se encuentra en el genoma nuclear. Estos genes, que en el caso de la levadura se estima en poco más de 400 (18), son transcritos y eventualmente traducidos en el citosol. Las proteínas resultantes son posteriormente transportadas al compartimento mitocondrial. Uno de los requerimientos para la importación exitosa de la mayoría de proteínas, es la presencia de un péptido señal o presecuencia mitocondrial, es decir, una extensión polipeptídica en el extremo amino terminal de la proteína que dirige a la proteína recién sintetizada hacia la mitocondria. Esta presecuencia es generalmente pequeña (de 20 a 60 residuos de aminoácidos), capaz de formar una alfa-hélice anfifílica, que puede ser reconocida por la maquinaria de importación mitocondrial.

El tránsito de las proteínas desde el citoplasma hasta su destino final en alguno de los compartimentos mitocondriales requiere, además de las presecuencias mitocondriales, a chaperonas citosólicas y de la matriz mitocondrial, receptores localizados en la superficie mitocondrial, proteínas que rodean los canales de paso y proteínas de maduración (19) (Figura 2). La inserción de las presecuencias en la membrana interna requiere además, en la mayoría de los casos, que la mitocondria esté energizada, es decir, que exista un potencial electroquímico ($\Delta\Psi$), probablemente para promover el movimiento electroforético de cargas positivas a través del aparato importador. Finalmente, una proteasa de la matriz mitocondrial cataliza (MPP) la remoción proteolítica de la presecuencia mitocondrial, obteniéndose así, una proteína madura. Las proteínas cuya localización funcional se restringe a la membrana externa mitocondrial, suelen no presentar presecuencia. Al ser reconocidas por los receptores mitocondriales de la membrana externa, son transportadas a su destino final en la membrana externa o en el espacio intermembranal (20).

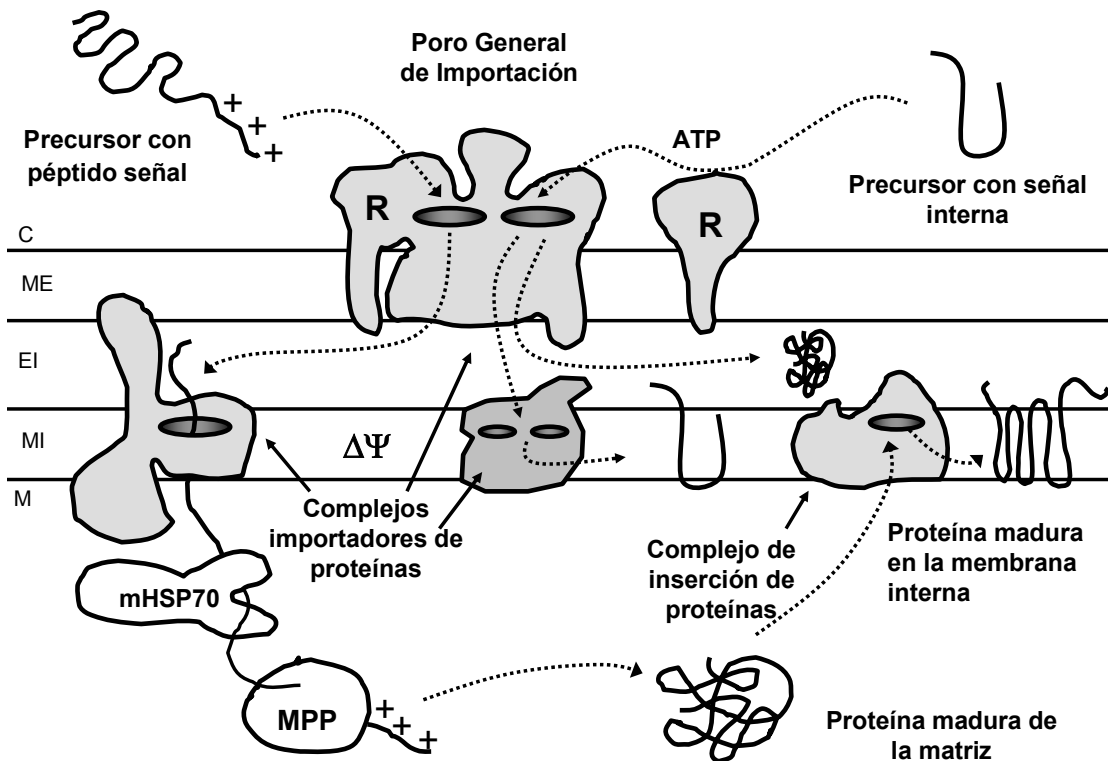


Figura 2. Importación de proteínas al interior de la mitocondria. En el esquema se muestran los diferentes compartimentos mitocondriales: ME, membrana externa (arriba); MI, membrana interna (abajo); C, citosol; EI, espacio intermembranal; M, matriz mitocondrial. Las proteínas que poseen presecuencia o señales, interaccionan con la superficie externa mitocondrial a través de receptores (R). Aquellas proteínas que se localizan en la matriz o membrana interna se translocan a través de complejos en la membrana interna. En la matriz mitocondrial, estas proteínas interaccionan con la chaperona mitocondrial (heat shock protein mHSP70) y la proteasa (MPP). Esta última corta específicamente a las presecuencias o péptido señal, para generar a las proteínas maduras; que posteriormente entran en contacto con las proteínas involucradas en la inserción de proteínas para su correcta localización en la membrana interna. Aquellas proteínas que carecen de presecuencia, pero que putativamente contienen una secuencia señal interna (una secuencia de la propia proteína madura), ingresan a través de un camino distinto sin llegar a la matriz mitocondrial. La importación de proteínas requiere la presencia de un gradiente electroquímico ($\Delta\Psi$) en la membrana interna mitocondrial.

LA MIGRACIÓN DE GENES Y LA EVOLUCIÓN DE LOS GENOMAS MITOCONDRIALES

A partir del conjunto de 1000 genes o más que debieron encontrarse en el genoma del ancestro premitocondrial, la tendencia general de la naturaleza ha sido la de reducir el contenido génico de las mitocondrias. De esta manera, los genomas mitocondriales actuales representan

solo una fracción de aquellos genes que estaban presentes en el endosimbionte. La mayor parte de esta pérdida de material genético debe haber sucedido durante el establecimiento de la endosimbiosis, y en principio puede ser el resultado de dos fenómenos distintos: *i*) la eliminación de genes no esenciales o redundantes, cuya función pudo ser substituida por los genes nucleares del hospedero, y *ii*) la exportación de material genético desde la protomitocondria hacia el núcleo celular (3,21).

En los últimos años el estudio de genes que han cambiado su localización del genoma mitocondrial al nuclear ha permitido identificar pasos intermedios del fenómeno de migración de genes. Entre ellos, destacan los resultados obtenidos con los genes: *i*) *cox2*, *ii*) *rps12*, y *iii*) *rpl2*:

i) En el grupo de las plantas leguminosas es posible observar la coexistencia de dos copias diferentes del gen *cox2* (el gen que codifica para la subunidad II de la citocromo c oxidasa). Se determinó que al menos en cinco géneros de leguminosas el gen *cox2* se encuentra presente tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear, y que ambas copias son transcritas y editadas (22). También en este grupo de plantas es posible observar pasos intermedios en la evolución de la migración del gen *cox2* al núcleo: en el chícharo, una copia del gen se encuentra en la mitocondria y otra en el núcleo, sin embargo la copia nuclear no es funcional (ya hubo migración, pero no una activación exitosa). En el caso de la soya, la copia mitocondrial se encuentra intacta, sin embargo no es posible detectar ningún transcrito en la mitocondria, por lo que no se trata de un gen activo. En cambio, el gen nuclear si se expresa (migración, integración, y activación exitosas, seguidas del silenciamiento del gen mitocondrial original). En el género *Dumasia*, se observan transcritos tanto del gen *cox2* mitocondrial como de su copia nuclear (coexistencia de dos genes activos provenientes de diferentes compartimentos celulares). Finalmente, en el caso del frijol mungo, la copia mitocondrial ha sido alterada por mutaciones y pérdida de algunos de sus fragmentos, de manera que es inactivo y apenas reconocible, mientras que sólo la copia nuclear es activa (migración exitosa hacia el núcleo con el gen mitocondrial original en vías de extinción).

ii) El gen *rps12* de *Oenothera* (que codifica a la proteína ribosomal mitocondrial S12) migró al genoma nuclear y dos terceras partes del gen mitocondrial original han sido eliminadas (23).

iii) En el grupo de las plantas angiospermas se ha identificado que el gen *rpl2* (que codifica a la proteína ribosomal L12) ha sufrido diversas modificaciones, y actualmente se puede encontrar en cuatro diferentes versiones: *a*) el gen funcional está en el ADNmt; *b*) el gen funcional está en el genoma nuclear; *c*) el gen se encuentra fragmentado en dos, la región 5' se encuentra en la mitocondria y la región 3' se encuentra en el núcleo; o bien *d*) el gen se encuentra fragmentado en dos y ambas regiones se encuentran en el núcleo (24). Estas observaciones indican que la fragmentación de genes en dos genes funcionales, es un factor que contribuye a la migración génica.

La migración de genes desde la mitocondria al núcleo es un proceso que puede dividirse en varios pasos: en primer lugar, el material genético debe atravesar las membranas mitocondriales e ingresar al núcleo a través de los poros de la membrana nuclear. Posteriormente, debe integrarse en el genoma y adquirir elementos de regulación y expresión nucleares. Después de un cierto período durante el cual tanto el gen mitocondrial como la copia nuclear son funcionales, cualquiera de las dos copias puede ser silenciada y eventualmente eliminada (Figura 3). Se han estudiado diversos modelos en los que se observan etapas

intermedias de la relocalización, lo que nos permite conocer algunos de los patrones que rigen este fenómeno.

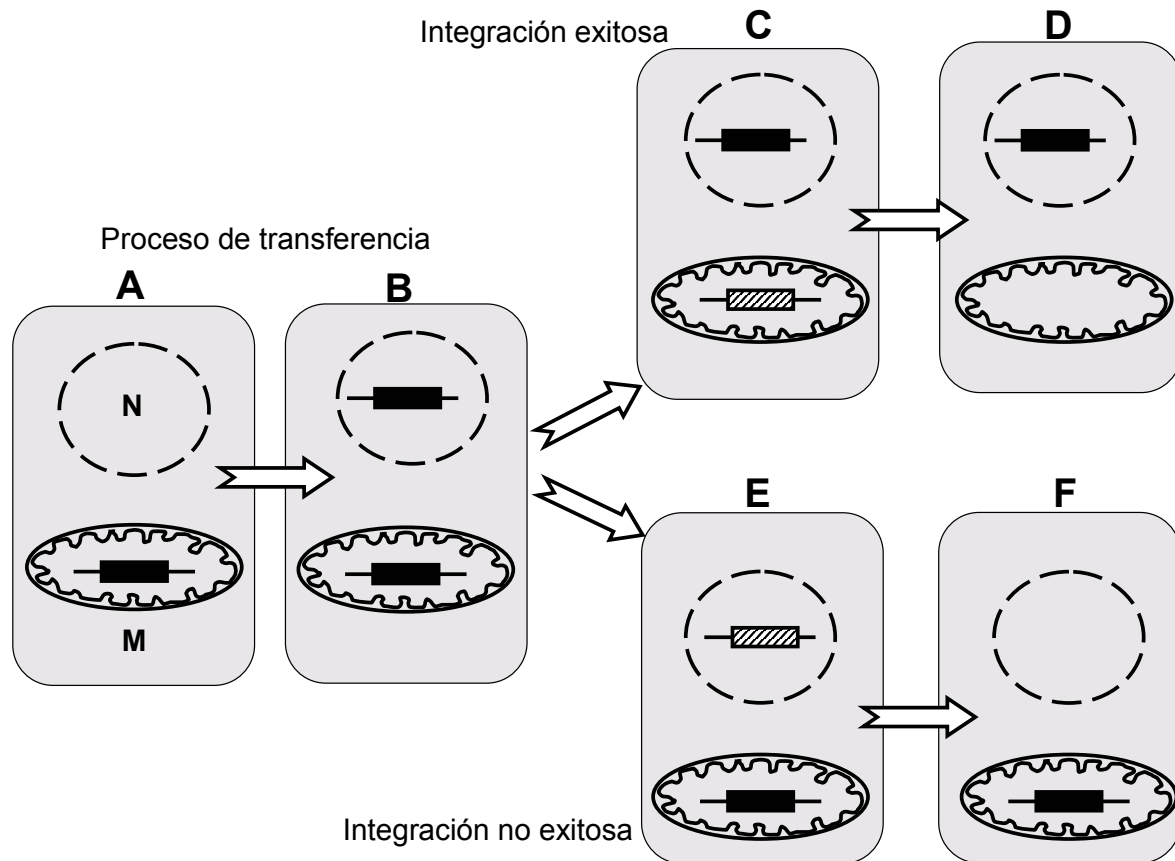


Figura 3. Migración de genes mitocondriales al núcleo. La mitocondria (M) y el núcleo (N) se esquematizan. A) Un gen mitocondrial activo. Todavía no existe una copia del mismo en el genoma nuclear. B) Una copia del gen mitocondrial migra al núcleo. Si se integra exitosamente y se activa (adquiriendo una secuencia que codifique una presecuencia mitocondrial), coexistirán por un tiempo ambos genes expresados. C) Si la expresión del gen que migró al núcleo fué exitosa, la copia mitocondrial se inactiva, y puede eventualmente desaparecer (D). E) La integración del gen migrante en el núcleo no es exitosa y permanece como un pseudogen, o eventualmente desaparece (F). En este caso el gen original mitocondrial permanece activo.

a) Salida del material genético mitocondrial

En primer lugar, debe existir una amplia disponibilidad del material genético, ya que en principio los segmentos de ADN transferibles pueden incluir cualquier región del genoma mitocondrial. Esto se resuelve de manera muy sencilla gracias a la redundancia de organelos: en general se localizan varias mitocondrias en cada célula y cada mitocondria a su vez, contiene un número variable de genomas. Estas dos características permiten que exista una fuente continua

de moléculas de ADN disponibles para migrar. Se ha encontrado que el tamaño de los fragmentos mitocondriales transferidos al núcleo en varias especies van desde 31 pares de bases (25) hasta 270 kb (26). Este último valor representa un caso único, en el cual el 75% del genoma mitocondrial en *Arabidopsis thailana* migró y se integró en el núcleo. La relocalización del material genético también puede suceder a partir de transcritos mitocondriales (ARNm) los cuales deben encontrarse en abundancia. En la migración mediada por ARNm solo se transfiere la información madura, ya que se eliminan los intrones (27). La migración de información genética en forma de ARN requerirá un paso ulterior de transcripción reversa, de tal manera que sea finalmente una molécula de ADN la que se integre en el genoma nuclear.

La migración del material genético implica su salida de la mitocondria, que podría suceder a través de rompimientos temporales de las membranas mitocondriales. El escape del ADNmt también puede suceder a través de la formación de una vacuola que contenga un fragmento de ADN. Algunos estudios citológicos han mostrado que existen asociaciones físicas directas entre las membranas nuclear y mitocondrial (28), las cuales podrían favorecer la migración de genes. También se ha relacionado la transferencia de material genético con factores del medio ambiente que rodea a las células, como cambios en la fuente de carbono disponible o en la temperatura, los cuales pueden modificar la fluidez de las membranas mitocondriales (29).

En *S. cerevisiae* se ha observado que la migración de genes mitocondriales al núcleo puede ocurrir durante el transcurso de la vida de un solo organismo, lo que ha permitido realizar observaciones experimentales directas. En esta levadura, la migración génica es un fenómeno intracelular dependiente del estado del ADNmt y del estado metabólico de la célula, pero no de un intermediario de ARNm. La tasa de escape del ADNmt al núcleo en levadura sucede con una frecuencia de aproximadamente 5×10^{-6} fragmentos por célula por generación; mientras que la tasa de migración inversa, del ADN nuclear hacia la mitocondria, es 100,000 veces menor (29, 30).

Otra forma de migración de fragmentos del ADNmt hacia el núcleo ocurre en el hongo *Podospora anserina*. En este organismo, el envejecimiento celular está relacionado con la migración de genes. Se ha observado que fragmentos discretos de ADNmt son cortados del genoma y permanecen en el interior de las mitocondrias de individuos senescentes formando plásmidos que se replican a una velocidad más acelerada que el resto del genoma mitocondrial. De esta manera, al final de la etapa de envejecimiento estos vectores constituyen la mayor parte del material genético presente. Una fracción de los plásmidos formados migran al núcleo y se integran al genoma nuclear (30).

Otro caso particular de migración de genes al núcleo lo presentan las algas clorofíceas, como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. En la mayoría de los organismos eucariotes, las tres subunidades más grandes de la citocromo c oxidasa (COXI, COXII, COXIII) se encuentran codificadas en el ADNmt en los genes correspondientes *cox1*, *cox2*, y *cox3*, y son sintetizadas en la matriz mitocondrial. En las algas clorofíceas, las subunidades COXII y COXIII se encuentran codificadas en el genoma nuclear. Además, el gen *cox2* de las algas clorofíceas se escindió en dos genes independientes, denominados *cox2a* y *cox2b* (31). El gen *cox2a* codifica para la subunidad COXIIA, que corresponde al extremo amino terminal y a la región hidrofóbica (transmembranal) de una subunidad COXII ortodoxa. Por su parte, el gen *cox2b* codifica para la proteína COXIIB, equivalente a la porción soluble, que une al centro diatómico de

cobre Cu_A en una subunidad COXII tradicional. Se piensa que ambas subunidades son importadas al interior de la mitocondria y se ensamblan de manera no covalente para formar un heterodímero estructural y funcionalmente equivalente a la subunidad COXII tradicional (31). Este es el primer ejemplo en la literatura de un gen mitocondrial que codifica para un componente de la FOS-OX que fue escindido en dos fragmentos funcionales, los cuales migraron independientemente y se relocalizaron en diferentes sitios del genoma nuclear.

b) Inserción del material genético mitocondrial en el genoma nuclear

Una vez que un fragmento de ADN ha salido de la mitocondria puede entrar al núcleo fácilmente. Los genes migrantes pueden integrarse en el genoma nuclear a través de varios mecanismos, que incluyen fusión en los extremos (25), recombinación homóloga (32) y recombinación no homóloga (33). En estos tres mecanismos se ha propuesto que la integración de los genes migrantes se lleva a cabo en regiones que no interfieren con la actividad de los genes nucleares, como en intrones, en regiones adyacentes, o en regiones teloméricas (25). Sin embargo, como se describe más adelante, hay excepciones: existen genes mitocondriales que migraron y se insertaron en los marcos de lectura abiertos de los genes nucleares, interrumpiéndolos e inactivándolos.

c) Activación del gen relocalizado en el núcleo

Una vez que el gen mitocondrial se ha insertado en el genoma nuclear, debe sufrir ciertas modificaciones para poder expresarse. Estos cambios consisten en la adquisición de secuencias que codifiquen para presecuencias mitocondriales, cambios en el uso de codones, adquisición de promotores, y de señales de poliadenilación. Algunas de estas modificaciones se discuten a continuación:

i) Adquisición de una presecuencia que codifique para un péptido señal que le permita a la proteína ingresar a la mitocondria. La proteína mitocondrial sintetizada en el citosol debe ser dirigida hacia el interior de la mitocondria. Se ha planteado que las presecuencias mitocondriales pueden adquirirse: 1) como resultado de un reordenamiento de ADN que coloca, al azar, presecuencias mitocondriales potenciales en el extremo 5' de algunos marcos abiertos de lectura (34); 2) por la modificación puntual de los extremos amino terminales de algunas proteínas que pueden generar una secuencia importadora funcional (35); ó 3) por un mecanismo de duplicación y recombinación de presecuencias ya existentes (36). Se ha sugerido que cualquier genoma nuclear contiene un número de secuencias latentes que podrían funcionar como presecuencias mitocondriales (37). En otro tipo de experimentos, se hicieron fusiones génicas entre fragmentos al azar del genoma de *Escherichia coli* y genes que codifican a proteínas mitocondriales, y se estudió la importación de las proteínas quiméricas correspondientes. Se encontró que aproximadamente un 2.5% de las clonas de *E. coli* mostraron la capacidad de codificar una presecuencia capaz de dirigir a las proteínas correspondientes hacia la mitocondria (34). Esto denota la extrema versatilidad de las presecuencias mitocondriales, las cuales para poder funcionar, requieren solamente de una estructura secundaria helicoidal, cargada positivamente anfifílica, aún cuando la estructura primaria esté poco conservada. La estructura anfifílica es importante para reconocer y unirse a los receptores localizados en la membrana externa mitocondrial. La carga neta positiva puede ser necesaria para el proceso de importación a través de la membrana interna mitocondrial (38). Un caso extraordinario de adquisición de péptido señal es el ilustrado por el gen *sdh3* de *Arabidopsis* (que codifica una subunidad de la succinato

deshidrogenasa) y que migró de la mitocondria al núcleo, insertándose en una de las dos copias del gen *hsp70* (que codifica para una chaperona mitocondrial). La inserción del gen *sdh3* interrumpió a uno de los dos genes *hsp70*, inactivándolo, pero manteniendo intacta a la región que codifica para la presecuencia de *hsp70*. De esta manera, el gen migrante *sdh3* adquirió una región preexistente que codifica un péptido señal que le permite a la proteína SDH3 ingresar a la mitocondria (39). Otro ejemplo interesante es el del gen mitocondrial migrante *rps14* del arroz, el cual se insertó en un intrón del gen nuclear *sdh2*, y adquirió una región codificante para presecuencia mitocondrial por procesamiento alternativo de los ARNm (40). Así, la misma presecuencia mitocondrial de la proteína RPS14 funciona tanto para la propia RPS14 como para la SDH2.

Las presecuencias identificadas en las proteínas mitocondriales COXIII, COXIIA, ATP6 y NAD4L codificadas en el núcleo del alga *C. reinhardtii* (31, 41, 42) son particularmente largas, de 107, 133, 119 y 143 residuos de aminoácidos respectivamente, y son ricas en alaninas, prolinas, y en residuos cargados positivamente, especialmente argininas. En *S. cerevisiae* se ha observado que la duplicación de las presecuencias mitocondriales favorece la importación *in vivo* e *in vitro* de proteínas hidrofóbicas a la mitocondria (43), tal vez porque mejora de alguna manera la interacción entre el precursor y la maquinaria de importación (44). Una presecuencia larga también podría alterar el plegamiento de la proteína como lo hace una chaperona, aumentando su capacidad de importación (45). En general, las presecuencias mitocondriales tienen dos sitios de edición, y el fenómeno de importación al interior de la mitocondria involucra a tres regiones diferentes de la presecuencia: el primer segmento dirige a la proteína hasta la mitocondria; la segunda sección guía a la proteína hasta la matriz mitocondrial, y el tercer segmento lleva a la proteína hasta la membrana interna mitocondrial (46).

ii) Modificación del uso de codones – Los cambios en el uso de codones que sufrieron los genes migrantes son particularmente evidentes en el caso de *C. reinhardtii*. Esta alga verde utiliza el código genético universal tanto en la mitocondria como en el núcleo, hecho que facilita la migración de genes. Sin embargo, el uso preferencial de codones utilizado en el núcleo es radicalmente distinto al uso de codones mitocondrial. El genoma nuclear tiene un alto contenido de G + C y por lo tanto los codones más utilizados son aquellos que presentan una G o una C en la tercera posición. Todos los genes que migraron de la mitocondria al núcleo de esta alga verde (los genes *cox3*, *cox2a*, *cox2b*, *atp6* y *nad4L*), presentan un uso de codones claramente nuclear, lo que sugiere que una vez integrados en el núcleo, su secuencia original sufrió numerosas modificaciones (31, 41, 42).

Para que una migración sea exitosa, el gen mitocondrial relocalizado en el genoma nuclear debe activarse y convertirse en un gen funcional. Si por alguna razón no se llevan a cabo las modificaciones necesarias para activarlo, el gen puede desaparecer, o bien permanecer en el genoma nuclear como un pseudogene. En algunos grupos de organismos la migración de genes al núcleo y su activación funcional parece haber cesado en algún momento de la evolución. Tal es el caso de los vertebrados, los cuales muestran un contenido génico prácticamente constante (47). Una de las razones por las cuales la migración de genes mitocondriales al núcleo se ha detenido en los animales y no en las plantas, podría relacionarse con la diferencia que existe entre el código genético de las mitocondrias animales y el código genético universal que se emplea en el núcleo celular, ya que en las plantas no existe tal diferencia (48).

Es interesante hacer notar que existen copias de genes mitocondriales que se localizan actualmente en los genomas nucleares de los vertebrados en la forma de pseudogenes, y que podrían sugerir que han existido migraciones no exitosas, en las cuales los genes se integraron, pero nunca se activaron (o bien se activaron pero sus productos proteicos nunca pudieron importarse correctamente al interior de la mitocondria, por lo que eventualmente se inactivaron) (49). En el genoma nuclear de los primates se localizan pseudogenes de *cob* y en los seres humanos, se han identificado numerosos pseudogenes de *cox1* y *cox2*. Dichas secuencias se consideran “fósiles moleculares” que representan migraciones al núcleo que no fueron exitosas (50). La presencia de estos pseudogenes mitocondriales en el genoma nuclear ilustra una vez más la tendencia de la mitocondria a exportar su material genético hacia el núcleo.

d) Pérdida del gen original

Durante un periodo probablemente corto, el gen mitocondrial y el gen migrante establecido en el núcleo deben expresarse simultáneamente. Dependiendo del azar y de la tasa de mutación de cada genoma, eventualmente algunas de las dos copias del gen se silenciará y se eliminará. La eliminación de un gen es un fenómeno paulatino durante el cual se van perdiendo y editando fragmentos, hasta que llega un momento en que su transcripción desaparece. La inactivación de los genes también puede suceder por la introducción de un codón de término en la secuencia nucleotídica (27,36). En cualquier caso, eventualmente el gen se elimina por completo y desaparece de alguno de los dos genomas (Figura 2).

Como se mencionó la tasa de migración de material genético desde la mitocondria hacia el núcleo es mucho mayor que en el sentido inverso. Sin embargo, aunque es un fenómeno raro, existen algunos ejemplos de la adquisición de genes foráneos por la mitocondria, dos de ellos son los que se describen a continuación (51):

i) En el genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* se encuentran 16 secciones que corresponden a fragmentos de ADN del cloroplasto, fragmentos de genes nucleares, retrotransposones y secuencias de origen viral. Algunos de los genes contenidos en estos fragmentos son funcionales, por ejemplo, seis de los genes que codifican a ARNt de origen cloroplastídico, ahora residen en el genoma mitocondrial.

ii) En el genoma mitocondrial de ciertos corales existe un gen que podría codificar una proteína involucrada en el proceso de reparación del ADN (similar a la proteína MutS). Se ha planteado que este gen es de origen mitocondrial y en algún momento se transfirió al núcleo, donde se diversificó y originó una familia de seis genes. Finalmente uno de ellos se reintegró al genoma mitocondrial, donde se localiza actualmente.

Es evidente que la migración de genes desde la mitocondria hasta el núcleo es un proceso complejo que requiere de cambios importantes en los genes migrantes. El proceso nos lleva a postular dos preguntas: *i)* ¿Qué presiones evolutivas favorecen la migración de genes mitocondriales al núcleo? *ii)* ¿Qué ha ocasionado que en los genomas mitocondriales permanezcan ciertos genes? Actualmente, estas dos preguntas no pueden ser contestadas con precisión, pero algunas ideas nos permiten acercarnos a posibles respuestas.

¿QUÉ FAVORECE LA MIGRACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES AL NÚCLEO?

Una de las hipótesis planteadas parte del hecho de que en los organelos suceden reacciones de óxido reducción que pueden incrementar la tasa de mutación génica inducida por la presencia de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, por lo que la información genética podría conservarse de mejor manera estando en un ambiente como el nuclear (52). Sin embargo, esto no es necesariamente cierto para los hongos y las plantas, cuyos genes nucleares tienen tasas de mutación más altas que los mitocondriales (53).

Otra explicación toma como base el que las mitocondrias se reproducen exclusivamente de manera asexual. Cuando no existe reproducción sexual en un grupo de organismos (en este caso de organelos), no existe recombinación genética y por lo tanto, la producción de mutaciones letales o de pérdidas en el genoma suceden de manera irreversible. Eventualmente la acumulación de mutaciones llevaría a la extinción de los organelos. Cuando un gen migra al núcleo, se mueve de un ambiente predominantemente asexual hacia un genoma con recombinación sexual. Sin embargo, en organismos como la levadura *S. cerevisiae* el ADNmt presenta una alta tasa de recombinación que puede ser usada como mecanismo de reparación de lesiones del genoma mitocondrial (54).

¿QUÉ FAVORECE QUE CIERTOS GENES PERMANEZCAN EN EL GENOMA MITOCONDRIAL?

La migración de genes de los organelos al núcleo es el resultado de un proceso indispensable para el establecimiento de simbiosis metabólicas estables. Este fenómeno está ampliamente documentado tanto en mitocondrias como en cloroplastos (55). En principio, los mismos procesos que han hecho que la mayor parte de los genes mitocondriales hayan migrado al núcleo deberían estar actuando sobre los genes que aún permanecen en las mitocondrias. Esto nos puede llevar a concluir que todos los genes mitocondriales deberían eventualmente migrar hacia el núcleo. Un ejemplo de esta posible migración total lo representan los hidrogenosomas (56). Se piensa que estos organelos, presentes en algunos protistas amitocondriados, se originaron a partir de las mitocondrias. La mayoría de los hidrogenosomas reportados hasta ahora carecen de material genético, representando un caso extremo de migración total; tal vez porque el proceso de fosforilación oxidativa no existe en estos organelos y por lo tanto los genes que participan en esta vía, y que se encontraban en la mitocondria se perdieron sin ninguna dificultad. Sin embargo, todas las mitocondrias estudiadas a la fecha poseen un genoma, y como se mencionó, el contenido mínimo de genes es más o menos conservado entre las diferentes especies.

Existen varias hipótesis acerca de por qué en los genomas mitocondriales se conserva todavía un conjunto limitado de genes. Una posible explicación ha sido que en las mitocondrias de algunos organismos se utiliza un código genético diferente al código genético que se emplea en el genoma nuclear. Esta heterogeneidad de lenguajes, podría evitar la expresión de los genes mitocondriales relocalizados en el núcleo. Sin embargo, esto no explica por qué cierto grupo de genes permaneció en los genomas mitocondriales durante la migración masiva de genes hacia el núcleo, cuando el fenómeno de endosimbiosis apenas comenzaba y no existían diferencias en los códigos genéticos.

Otro proceso que también podría detener la migración de genes mitocondriales al núcleo, es que algunos genes mitocondriales, especialmente en plantas y en tripanosomátidos, se han establecido patrones complejos de procesamiento, como la edición del ARNm, que haría imposible el procesamiento del gen en un ambiente nuclear. Sin embargo, este problema se solucionaría si el vehículo intermediario entre el genoma mitocondrial y el genoma nuclear fuera la molécula ya editada de ARNm (57).

También se ha planteado que en la mitocondria permanecen aquellos genes cuya expresión se regula por el estado redox de sus productos o de los acarreadores de electrones con los cuales interactúan. Esto permitiría que la célula disponga de una localización adecuada del gen que codifica proteínas cuya función demanda un control regulatorio rápido, directo e independiente de otros compartimentos y procesos celulares (52). En esta hipótesis, se asume que los genomas mitocondriales ya exportaron todos los genes potencialmente exportables.

Otra hipótesis que explica la permanencia de ciertos genes en el ADNmt toma en consideración la hidrofobicidad de los productos proteicos correspondientes. Las proteínas codificadas en los ADNmt son generalmente aquellas que se localizan en la membrana interna mitocondrial y que se caracterizan por ser altamente hidrofóbicas. Se ha propuesto que la síntesis en el citosol de este tipo de proteínas podría ocasionar que no se dirigieran al compartimento celular adecuado (por ejemplo, que se insertaran en las membranas del retículo endoplásmico en lugar de hacerlo en las mitocondrias). Además, al tratarse de polipéptidos hidrofóbicos podría ocurrir que el transporte a través del sistema de membranas mitocondrial resultara imposible, o bien que los productos proteicos se agregaran irreversiblemente (58). Se ha propuesto que las proteínas altamente hidrofóbicas, no pueden ser importadas correctamente a la mitocondria (45); por lo que deben ser sintetizadas en el interior del organelo para ser insertadas a la membrana interna mitocondrial y adquirir la conformación topológica necesaria para su acoplamiento correcto en el complejo respiratorio al que pertenecen. Hay dos ejemplos de proteínas que se han conservado en los genomas mitocondriales de todos los organismos caracterizados hasta la fecha: el gen *cob* que codifica un citocromo tipo b de ocho cruces transmembranales y el gen *cox1* que codifica la subunidad I de la citocromo c oxidasa que tiene doce cruces transmembranales. Aquellos organismos que poseen complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), también contienen varios de los genes *nad* en su genoma mitocondrial (los genes *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *na4L* y *nad5*), que codifican para proteínas altamente hidrofóbicas con 3 a 16 cruces transmembranales.

En *S. cerevisiae* se han realizado estudios *in vivo* intentando dirigir hacia la mitocondria construcciones citoplásmicas de longitudes variables del citocromo *b*; mostrando que la importabilidad de los polipéptidos no se encuentra forzosamente relacionada al número de cruces transmembranales que posea (45). Estos estudios sugirieron que los parámetros críticos son el promedio máximo de hidrofobicidad de una cadena de entre 60 y 80 residuos de aminoácidos (*mesoH*) y la hidrofobicidad máxima de las regiones transmembranales. Estos valores son indicadores de la facilidad o dificultad con la que una proteína puede ser importada a la mitocondria. De acuerdo a estos parámetros, las proteínas de origen nuclear ATP6, NAD4L, COXIII, COXIIA y COXIIB del alga *C. reinhardtii* tienen una hidrofobicidad reducida que permite su importación a la mitocondria. Los análisis de hidropatía realizados para las subunidades COXIII y ATP6 mostraron que la reducción de la hidrofobicidad sucede preferentemente en aquellos segmentos transmembranales que no están involucrados en la función de la subunidad ni en interacciones importantes subunidad-subunidad (31, 42).

La gran importancia de la disminución de la hidrofobicidad lo ilustra el caso de la subunidad COXII de leguminosas. Todas las leguminosas que exhiben genes *cox2* tanto nucleares como mitocondriales, muestran una hidrofobicidad disminuída en el primer segmento transmembranal de la proteína COXII codificada en el núcleo con respecto a la codificada en la mitocondria (es decir, la proteína mitocondrial es siempre más hidrofóbica que la nuclear). Con técnicas de ingeniería genética, Daley y col. (59) expresaron la COXII mitocondrial con la presecuencia de la COXII nuclear, y observaron que la proteína mitocondrial no ingresaba a la mitocondria. Al mutar dos residuos de la primera región transmembranal de la COXII mitocondrial madura, y sustituirla por los aminoácidos (menos hidrofóbicos) de la COXII nuclear, la proteína ingresó a la mitocondria sin problemas. Por lo tanto, la disminución de la hidrofobicidad en unos cuantos residuos críticos, son suficientes para permitir la importación de una proteína mitocondrial expresada en el núcleo que cuente con una presecuencia.

EXPRESIÓN ALOTÓPICA DE GENES MITOCONDRIALES Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN TERAPIAS GÉNICAS MITOCONDRIALES HUMANAS

El genoma mitocondrial humano es una molécula pequeña, circular, de doble cadena que contiene 37 genes. Veinticuatro de estos genes son parte de la maquinaria de traducción mitocondrial (2 ARNr y 22 ARNt) y 13 codifican subunidades de la cadena respiratoria (siete subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, tres subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V) (17). Las primeras mutaciones patogénicas del genoma mitocondrial humano, fueron descritas en los trabajos de Holt y col. (60) y de Wallace y col. (61). Desde entonces, se han descrito más de cien mutaciones en el genoma humano (62). Desde el punto de vista genético, estas mutaciones del ADNmt pueden caer en tres categorías: *i*) mutaciones en genes que codifican proteínas; *ii*) mutaciones en genes de ARN estructurales como ARNt y ARNr y que por lo tanto afectan todo el proceso de síntesis de proteínas en el organelo; y *iii*) rearrreglos del genoma a gran escala como deleciones o duplicaciones. Estas modificaciones pueden producir diversas condiciones patológicas (63). Es importante mencionar que también se han descrito numerosas enfermedades que se producen por el mal funcionamiento de las mitocondrias pero que involucran genes que se encuentran codificados en el genoma nuclear (64).

Hasta el momento no existe ningún tipo de terapia para los síndromes mitocondriales, solamente existen tratamientos paliativos, como mejoras en la dieta, algunas correcciones quirúrgicas y tratamientos con sustituciones de los productos de las vías metabólicas alteradas, que pueden a lo más disminuir los problemas y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Una de las razones que dificultan aún más este problema médico ha sido la heterogeneidad de cada uno de los síndromes (64). Se han planteado varias estrategias para desarrollar terapias génicas que puedan corregir las enfermedades mitocondriales (65). Estas estrategias incluyen el introducir genes modificados o productos génicos a la mitocondria a través de la maquinaria de importación proteica (66); o bien por la inhibición del ADNmt alterado por complejos de ácidos nucleicos y proteínas antígenómicas dirigidos a secuencias específicas (67). Otro tipo de terapia génica consiste en colocar en el núcleo una copia "normal" del gen o genes alterados y dirigir los productos que se sintetizan en el citoplasma hacia la mitocondria. Esta activación funcional de un gen en un compartimento celular diferente a su lugar de origen se conoce como expresión alotópica. La expresión alotópica de genes mitocondriales ha sido desarrollada con éxito en *S.*

cerevisiae para reparar defectos en la maduración de ARN de la matriz mitocondrial b14 (68); para estudiar las funciones de la subunidad ribosomal mitocondrial VARI (69); y para expresar desde el citosol una subunidad ATP8 funcional (70).

En una aproximación hacia una posible terapia génica, Manfredi y col. (71) desarrollaron un modelo de células humanas con mutaciones en el gen mitocondrial *atp6* incapaz de sintetizar ATP. Para poder reparar esta alteración, se rediseñó el gen mitocondrial humano para que utilizara el código genético universal, se le añadieron dos presecuencias mitocondriales diferentes (una de 25 residuos de la subunidad 8 de la citocromo c oxidasa y otra de 61 residuos de una isoforma humana de la subunidad c de la ATPasa) y se insertó la construcción en el genoma nuclear. En este modelo celular se rescató la deficiencia en la síntesis de ATP, sin embargo la eficiencia de importación de la subunidad fue muy baja con cualquiera de las dos MTSs utilizadas. De igual manera, la expresión heteróloga del gen nuclear *atp6* de *C. reinhardtii* ha rescatado la deficiencia en la síntesis de ATP en estas células (72). La expresión alotópica de genes mitocondriales en el núcleo para propósitos de terapia génica debe considerar los cambios apropiados en el uso de codones debido a las diferencias en el código genético entre ambos genomas, así como la adición de una presecuencia mitocondrial capaz de dirigir el producto peptídico sintetizado hacia la mitocondria. Sin embargo, estos dos elementos mostraron no ser suficientes para una expresión alotópica eficiente. Tal vez se facilitaría la importación de proteínas con la disminución en la hidrofobicidad promedio de la proteína sintetizada, principalmente en las regiones transmembranales que no son fundamentales para la función de la proteína. Tomar el ejemplo de *C. reinhardtii* como base para decidir en qué regiones deberían hacerse las modificaciones podría facilitar el trabajo, ya que en este organismo la disminución de hidrofobicidad se ha hecho de manera natural, manteniendo inalterada la función de las proteínas, a pesar de que los genes que las codifican hayan migrado de un compartimento celular a otro. Como puede verse, las expectativas de alcanzar el éxito, parecen cada vez más cercanas. Así, la posibilidad de aplicar terapia génica para el tratamiento de los desordenes mitocondriales podría ser realidad en un futuro cercano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico de la Q.B.P. Miriam Vázquez-Acevedo para la realización de las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, y el apoyo económico de CONACyT (40696) y DGAPA-UNAM (IN207201).

REFERENCIAS

1. Margulis L (1970) The origin of Eucaryotic cells. Yale University Press. New Haven, USA.
2. Andersson SG, Karlberg O, Canback B, Kurland CG (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:165-179.
3. Lang BF, Gray MW, Burger G (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33:351-397.
4. Martin W, Muller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392:37-41.
5. Martin W, Russel MJ (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil Trans R Soc Lond B* 358:59-85.

6. Moreira D, López-García P (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and δ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophy hypothesis. *J Mol. Evol.* 47:517-530.
7. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481.
8. Springer N, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH, Schmidt H (1996) *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the beta-subclass of Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 135:333-336.
9. von Dohlen CD, Kohler S, Alsop ST, McManus WR (2001) Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. *Nature* 412:433-436.
10. Pak JW, Jeon KW (1997) A symbiont-produced protein and bacterial symbiosis in *Amoeba proteus*. *J Eukaryot Microbiol* 44:614-619.
11. Nass S, Nass MMK (1963) Ultramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 19:593-629.
12. Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG, Andersson SGE (2000) The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast* 17:170-187.
13. Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C, Corral-Debrinski M, Jacq C (2002) Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* 3:159-164.
14. Feagin JE (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol* 30:371-390.
15. Stern DB, Newton KJ (1985) Mitochondrial gene expression in Cucurbitaceae: conserved and variable features. *Curr Genet* 9:395-404.
16. Lang B F, Burger G, O'Kelly C J, Cedergren R, Golding G B, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray M W (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387:493-497.
17. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
18. Hodges PE, McKee AHZ, Davis BP, Pasyne WEB, Garrels JI 1999, Yeast Protein database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic Acids Res* 27:69-73.
19. Herrmann JM (2003) Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol* 11:74-79.
20. Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *J Mol Biol* 326:639-567
21. Kurland CG, Andersson SG (2000) Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:786-820.
22. Adams KL, Song K, Roessler PG, Nugent JM, Doyle JL, Doyle JJ and Palmer JD (1999) Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13863-13868.
23. Grohmann L, Brennicke A, Schuster W (1992) The mitochondrial gene encoding ribosomal protein S12 has been translocated to the nuclear genome in *Oenothera*. *Nucleic Acids Res* 20:5641-5646.
24. Adams KL, Ong HC, Palmer JD (2001) Mitochondrial gene transfer in pieces: fission of the ribosomal protein gene *rp12* and partial or complete gene transfer to the nucleus. *Mol Biol Evol* 18:2289-2297.
25. Blanchard JL, Schmidt GW (1996) Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns [published erratum appears in *Mol Biol Evol* (1996) 13: 893]. *Mol Biol Evol* 13: 537-548.
26. Stupar RM, Lilly JW, Town CD, Cheng Z, Kaul S, Buell CR, Jiang J (2001) Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on Arabidopsis thaliana chromosome 2: implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5099-5103.
27. Brennicke A, Grohmann L, Hiesel R, Knoop V, Schuster W (1993) The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Lett* 325:140-145.
28. Campbell CL, Thorsness PE (1998) Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci* 111:2455-2464.
29. Thorsness PE, Fox TD (1990) Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 346:376-379.

30. Wright RM, Cummings DJ (1983) Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in a fungus. *Nature* 302:86-88.
31. Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., Claros, M.G., Davidson, E., King, M.P. and González-Halphen, D. (2001) Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem* 276:11302-11309.
32. Pichersky E, Logsdon JM Jr, McGrath JM, Stasys RA (1991) Fragments of plastid DNA in the nuclear genome of tomato: prevalence, chromosomal location, and possible mechanism of integration. *Mol Gen Genet* 225:453-458.
33. Sun CW, Callis J (1993) Recent stable insertion of mitochondrial DNA into an *Arabidopsis* polyubiquitin gene by nonhomologous recombination. *Plant Cell* 5:97-107.
34. Baker A, Schatz G (1987) Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3117-3121.
35. Vassarotti A, Stroud R, Douglas M (1987) Independent mutations at the amino terminus of a protein act as surrogate signals for mitochondrial import. *Embo J* 6:705-711.
36. Kadowaki K, Kubo N, Ozawa K, Hirai A (1996) Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signals. *EMBO J* 15:6652-6661.
37. Kobayashi Y, Knoop V, Fukuzawa H, Brennicke A, Ohyama, K (1997) Interorganellar gene transfer in bryophytes: the functional *nad7* gene is nuclear encoded in *Marchantia polymorpha*. *Mol Gen Genet* 256:589-592.
38. Emanuelsson O, von Heijne G (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochim Biophys Acta* 1541:114-119.
39. Adams KL, Rosenblueth M, Qiu Y-L, Palmer JD (2001) Multiple losses and transfers to the nucleus of two mitochondrial succinate dehydrogenase genes during angiosperm evolution. *Genetics* 158:1289-1300.
40. Kubo N, Harada K, Hirai A, Kadowaki K (1999) A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: common use of the same mitochondrial targeting signal for different proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9207-9211.
41. Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, Tolkunova E, Funes S, Claros MG, Davidson E, King MP, González-Halphen D (2000) Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome c oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. *J Biol Chem* 275:30144-30152.
42. Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D (2002) The typically mtDNA-encoded ATP6 subunit of the mitochondrial F₁F₀-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 277:6051-6058.
43. Galanis M, Devenish RJ, Nagley P (1991) Duplication of leader sequence for protein targeting to mitochondria leads to increased import efficiency. *FEBS Lett* 282:425-430.
44. Claros MG, Perea J, Jacq C (1996) Allotopic expression of yeast mitochondrial maturase to study mitochondrial import of hydrophobic proteins. *Methods Enzymol* 264:389-403.
45. Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C (1995) Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b*. *Eur J Biochem* 228:762-771.
46. Daley DO, Adams KL, Clifton R, Qualmann S, Millar AH, Palmer JD, Pratje E, Whelan J (2002) Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J* 30:11-21.
47. Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27:1767-1780.
48. Adams KL, Daley DO, Qiu YL, Whelan J, Palmer JD (2000) Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature* 408:354-357.
49. Wallace DC, Stuard C, Murdock D, Schurr T, Brown MD (1997) Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14900-14905.

50. Collura RV, Stewart CB (1995) Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature* 378:485-489.
51. Blanchard JL and Lynch M (2000) Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends Genet* 16:315-320.
52. Allen JF (2003) Why chloroplasts and mitochondria contain genomes? *Com Func Genom* 4:31-36.
53. Wolfe KH, Li WH, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9054-9058.
54. Ling F, Morioka H, Ohtsuka E, Shibata T (2000) A role for *MHR1*, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA. *Nuc Acids Res* 28:4956-4963.
55. Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422:72-76.
56. Dyall SD, Johnson PJ (2000) Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr Opin Microbiol* 3:404-411.
57. Wischmann C, Schuster W (1995) Transfer of *rps10* from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*: evidence for RNA-mediated transfer and exon shuffling at the integration site. *FEBS Lett* 374:152-156.
58. von Heijne G (1986) Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett* 198:1-4.
59. Daley DO, Clifton R, Whelan J (2002) Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10510-10515.
60. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331:717-719.
61. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242:1427-1430.
62. DiMauro S, Andreu AL (2000) Mutations in mtDNA: are we scraping the bottom of the barrel? *Brain Pathol* 10:431-441.
63. DiMauro S, Schon EA (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 106:18-26.
64. Zeviani M, Klopstock T (2001) Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 14:553-560.
65. DiMauro S, Hirano M, Schon EA (2000) Mitochondrial encephalomyopathies: therapeutic approaches. *Neurol Sci* 2000:S901-8.
66. Kolesnikova, OA, Entelis NS, Mireau H, Fox TD, Martin RP, Tarassov IA (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* 289:1931-1933.
67. Taylor RW, Wardell TM, Lightowlers RN, Turnbull DM (2000) Molecular basis for treatment of mitochondrial myopathies. *Neurol Sci* 21:S909-S912.
68. Banroques J, Perea J, Jacq C (1987) Efficient splicing of two yeast mitochondrial introns controlled by a nuclear-encoded maturase. *EMBO J* 6:1085-1091.
69. Sanchirico M, Tzellas A, Fox TD, Conrad-Webb H, Periman PS, Mason TL (1995) Relocation of the unusual VAR1 gene from the mitochondrion to the nucleus. *Biochem Cell Biol* 73:987-995.
70. Gray RE, Law RH, Devenish RJ, Nagley P (1996) Allotopic expression of mitochondrial ATP synthase genes in nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 264:369-389.
71. Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, Sadlock JE, Kwong JQ, Guy J, Schon EA (2002) Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet* 30:394-399.
72. Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA (2002) An Algal Nucleus-encoded Subunit of Mitochondrial ATP Synthase Rescues a Defect in the Analogous Human Mitochondrial-encoded Subunit. *Mol Biol Cell* 13:3836-3844.

Semblanza del Dr. Diego González-Halphen.



Nació en la Ciudad de México el 11 de Enero de 1956, obtuvo el grado de Ingeniero Bioquímico en la escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, Se graduó de Maestría en Ciencias en Especialidad Bioquímica en 1982, Se doctoró en Ciencias especialidad Bioquímica del INVESTAV IPN en 1985. Realizó estudios postdoctorales en la Universidad de Oregon E.U. del 85 al 88. Es Investigador en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM desde el 88, actualmente es el jefe de departamento de Genética Molecular. Es miembro del SNI nivel, 2, Ha dirigido 6 tesis de licenciatura, 4 de maestría y 5 de Doctorado. Cuenta con 29 publicaciones internacionales y mas de 3000 citas a sus trabajos. Recibió la distinción Jóvenes Académicos de la UNAM en el área de Docencia en Ciencias Naturales.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

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

(ISSN-0188-137X)

LA VITAMINA BIOTINA MODIFICA LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CELULAS HUMANAS: EVIDENCIA DE UN SISTEMA DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MULTISISTEMICA QUE PROTEGE EL METABOLISMO CEREBRAL DURANTE EL AYUNO

Dr. Alfonso León del Río.

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (México)

alfon@servidor.unam.mx

RESUMEN

La enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) cataliza la activación, mediante biotilación, de cinco carboxilasas en células humanas. La deficiencia de HCS produce el síndrome deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC). Esta enfermedad es potencialmente mortal y se caracteriza por la deficiencia de la actividad de todas las carboxilasas. La deficiencia de biotina no solo disminuye la actividad de estas enzimas sino que parece modificar la expresión genética. El objetivo de este trabajo es el describir el mecanismo que utiliza biotina para modificar la transcripción de varios genes en células humanas. Los niveles de ARNm de genes que codifican HCS y carboxilasas fueron cuantificados mediante densitometría de productos de rtPCR (polimerización en cadena por transcripción reversa) en células humanas estimuladas con biotina. Se describe la participación obligatoria de la HCS en la estimulación transcripcional dependiente de la vitamina en hepatocitos y fibroblastos humanos. Este resultado es apoyado

por el hecho que células de pacientes con deficiencia de HCS son incapaces de estimular la transcripción al ser expuestas a biotina. Se presenta evidencia que sugiere que el compuesto biotinil-5'-AMP, la forma activa de la biotina, funciona como un segundo mensajero que activa una cascada de transducción de señales en la que participan la forma soluble de la enzima guanilato ciclasa y la proteína cinasa dependiente de GMPc (GMP cíclico). Este sistema de activación transcripcional pudiera estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurológicas y en malformaciones congénita.

En este trabajo se presenta evidencia de que la cascada de transducción de señales formada por las enzimas HCS-GCs-PKG regula la expresión de una red de genes en células humanas. Este sistema de regulación de la expresión genética esta afectado en pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas o en organismos sujetos a una dieta pobre en biotina. Nuestras investigaciones sugieren que la regulación transcripcional mediada por biotina es diferente en hígado y músculo con respecto al cerebro. Es posible que estas diferencias tejido específicas se deriven de un sistema diseñado para proteger al metabolismo cerebral mediante la reducción en el transporte y utilización de esta vitamina en hígado y músculo durante el ayuno. La clonación de promotores de genes activados por biotina permitió identificar dos posibles sitios involucrados en mediar el efecto de biotina sobre la transcripción. Estos sitios son reconocidos por los factores CREB y C/EBP por lo que se especula que la activación transcripcional por biotina sea el resultado de una remodelación de la cromatina en la región promotora mediante el reclutamiento de acetilasas de histonas.

Los resultados de este proyecto presentan evidencia que sugiere que errores en el sistema de regulación transcripcional dependiente de biotina puede estar relacionado con varias enfermedades humanas, desde el cáncer hasta destrucción de ciertas áreas del cerebro. El descubrimiento de que la biotina actúa como un inductor transcripcional en seres humanos abre un nuevo campo de estudio que permitirá entender el porque ciertas enfermedades neurológicas pueden ser tratadas con dosis farmacológicas de la vitamina o porque la deficiencia de biotina resulta en una incremento en malformaciones congénitas.

INTRODUCCIÓN

La vitamina hidrosoluble biotina es esencial para el mantenimiento de la homeostasis metabólica de todos los organismos. La función de esta vitamina es la de ser cofactor de enzimas conocidas como carboxilasas dependientes de biotina (1). En células humanas existen cinco carboxilasas; piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), metilcrotonil-CoA carboxilasa y dos formas de acetil-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2). Estas enzimas catalizan reacciones clave en gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de amino ácidos.

La biotinilación de carboxilasas es catalizada por la proteína BirA (2,3 en procariontes y por la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (1) en eucariontes. Esta modificación postraduccional se lleva a cabo en dos etapas; en la primera, la biotina es activada mediante la hidrólisis de ATP prediciéndose el compuesto biotinil-5'-AMP (B-AMP) (4,5). En la segunda etapa de la reacción, el B-AMP es utilizado para transferir a la biotina, con liberación de AMP, a un residuo de lisina específico, en una región altamente conservada en las carboxilasas (6-9).

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre el papel de HCS y biotina en el metabolismo humano proviene del estudio de la enfermedad deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC). La causa de esta enfermedad es la deficiencia en la actividad de la HCS que resulta en la incapacidad para sintetizar el intermediario de biotilación B-AMP y en la disminución en la actividad de todas las carboxilasas (10). Los pacientes presentan en las primeras horas de vida dermatitis periorificial severa, letargia, hipotonia, alopecia cetoacidosis hiperamonemia y acidemia orgánica (11). El desequilibrio bioquímico que caracteriza a esta enfermedad conduce a un estado de coma o incluso la muerte si la enfermedad no es diagnosticada a tiempo.

En todos los casos estudiados la enzima HCS de los pacientes con DMC muestra una afinidad por biotina 3 a 70 veces menor que los valores de células humanas normales (12,13). Esta es la razón por la cual todos los síntomas clínicos y la potencialmente mortal interrupción de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de amino ácidos pueden ser revertidos suministrando a los pacientes dosis farmacológicas de biotina.

La clonación del cDNA (DNA complementario) que codifica a la HCS humano (7) permitió determinar las bases moleculares de la DMC. Casi todas las mutaciones identificadas en pacientes afectados están localizadas en una región de 120 aminoácidos (12,14) y que muestra una alta homología con el extremo carboxilo terminal de la proteína BirA (7). El análisis de las estructuras calculadas para estos dominios reveló que los cambios observados en la HCS alteran la conformación del sitio activo de la HCS lo que resulta en la afinidad disminuida por la biotina y en la capacidad de los pacientes de recuperarse cuando son tratados con dosis farmacológicas de esta vitamina.

Estos resultados parecían haber culminado casi 70 años de investigación que comenzaron con la caracterización de la biotina como un factor de crecimiento para levaduras en 1933 (15). Sin embargo, las observaciones publicadas en varios trabajos han puesto a en duda la profundidad de nuestro conocimiento sobre las funciones de la biotina en células humanas.

A diferencia de la DMC en donde el papel de la biotina ha sido bien caracterizado, en los últimos años se han publicado una serie de trabajos sobre enfermedades que responden al tratamiento con biotina y cuya etiología es desconocida. El origen de estos padecimientos no esta relacionado a una deficiencia en la actividad de las carboxilasas dependientes de esta vitamina. La enfermedad de ganglio basal (EGB) se caracteriza por una destrucción de las cabezas del caudato central y una pérdida parcial del putamen, lo que resulta en encefalopatía progresiva, vómito, cuadriparesis, cuadriplegia, convulsiones, pérdida del habla y muerte (39). Los síntomas de EGB, a diferencia de lo que ocurre en la deficiencia de holocarboxilasa sintetasa, se presentan entre los 3 y los 14 años de edad y pueden ser revertidos si la enfermedad se diagnostica a tiempo y los pacientes reciben cantidades farmacológicas de la vitamina por el resto de su vida. En ningún caso estos pacientes han desarrollado una deficiencia total o parcial de HCS o carboxilasas. La capacidad de la biotina para revertir los síntomas de pacientes afectados con EGB sin que haya una deficiencia de carboxilasas, sugiere que esta vitamina pueda estar involucrada en otros procesos celulares al menos en el cerebro.

Esta hipótesis podría ser fortalecida por el hecho de que animales de laboratorio en gestación, a los que se les induce una deficiencia marginal de biotina que no resulta en una disminución en la actividad de carboxilasas, muestran una alta incidencia de malformaciones congénitas como labio y paladar hendido, anencefalia, sindactilia y espina bífida. (16,17). Al igual

que en el caso de la EGB, no existe hasta el momento un mecanismo molecular que pueda explicar el origen de la amplia gama de padecimientos que la deficiencia adquirida o genética de biotina tiene en humanos y animales de laboratorio.

Otras observaciones igualmente interesantes y que podrían conducir a las otras funciones que tiene la biotina en la célula han sido publicadas recientemente. En estos trabajos se demuestra que la expresión o actividad de varias enzimas hepáticas requieren de suministros adecuados de biotina. La biotina parece aumentar la actividad enzimática de glucocinasa y la transcripción de su gene en ratas *in vivo*, células beta de páncreas y hepatocitos de rata en cultivo (18-20). De manera similar, los niveles de ARNm de la enzima 6-fosfofructocinasa se incrementan en ratas deficientes de biotina después de la administración peritoneal de la vitamina (21,22).

Para explicar todas estas observaciones comenzamos una línea de investigación en la que proponemos que la biotina actúa como un inductor transcripcional en células humanas. Durante los últimos tres años hemos hecho descubrimientos significativos que indican que la biotina esta involucrada en la regulación de la expresión genética a través de una cascada de transducción de señales en la que participan la forma soluble de la enzima guanilato ciclasa (GCs) y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Una de las contribuciones mas importantes de este trabajo fué el identificar a la holocarboxilasa sintetasa (HCS) como una enzima bifuncional que además de catalizar la biotilación de carboxilasas participa en la activación transcripcional dependiente de biotina mediante la síntesis de 5'biotinil-AMP (B-AMP). En este proyecto se demostró que el B-AMP funciona como un segundo mensajero, que no había sido identificado como tal en células humanas, cuya función es la de activar a la enzima GCs. Estos resultados sugieren que el fenotipo que caracteriza a los pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas pueda deberse, al menos en parte, a la modificación de los patrones de expresión genética en las células hepáticas de estos individuos.

En este trabajo presentamos también evidencia que indica que la cascada de transducción de señales no solo es importante en el caso de la enfermedad DMC sino que también es vital para el correcto funcionamiento del metabolismo cerebral. Al estudiar el efecto de la deficiencia de biotina en células humanas encontramos una paradoja metabólica. Al carecer de esta vitamina las células responden "apagando" los genes que codifican enzimas involucradas en su transporte y utilización en lo que parecería un suicidio celular. Para comprender este fenómeno desarrollamos un modelo animal de deficiencia de biotina. Este modelo nos permitió descubrir que la inhibición transcripcional de genes involucrados en gluconeogénesis y síntesis de ácidos grasos ocurre en hígado, músculo, piel y riñón. Sin embargo, en el cerebro de estos animales la transcripción y la actividad de estas enzimas son normales. Este descubrimiento nos llevó a proponer que en la deficiencia de biotina los llamados órganos periféricos como el hígado y músculo muestran un altruismo metabólico que consiste en la regulación negativa de los genes involucrados en el uso de esta vitamina. Este mecanismo evita que el sistema muscular o el hígado, con una masa mucho mayor, se conviertan en competidores del cerebro por la poca biotina presente en el plasma. La razón de este complicado sistema de regulación transcripcional parece estar relacionado con el hecho de que la enzima piruvato carboxilasa (PC), una enzima dependiente de biotina, suministra a través de la anaplerosis del ciclo de Krebs un 30% de la energía utilizada por el cerebro.

En la parte final de este proyecto caracterizamos funcionalmente los promotores de dos genes activados por biotina. En ensayos de transfección se demuestra que el promotor de los genes de acetil-CoA carboxilasa (ACC-1) y del receptor multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) es activado por cambios en la concentración de biotina. El análisis de estas regiones demuestra la presencia de sitios de unión para los factores de transcripción CREB, C/EBP y AP-1. Estos factores son responsables del reclutamiento de CBP y p300 proteínas con actividad de acetilasa de histonas asociadas a zonas transcripcionalmente activas en el DNA. Estos resultados sugieren que la biotina activa una cascada de transducción de señales que al señalar al núcleo promueve la remodelación temporal de la cromatina favoreciendo la entrada de la maquinaria basal de transcripción.

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA EN LOS NIVELES DE RNAm EN CÉLULAS HEPG2

Para establecer un modelo experimental que nos permitiera estudiar el efecto de biotina sobre la transcripción genética, utilizamos la línea de hepatoblastoma humano HepG2. En nuestro estudio, primero determinamos el efecto de desarrollar deficiencia de biotina en los niveles de RNAm de HCS, PCC, ACC-1 y ACC-2 en células HepG2 cultivadas en un medio libre de biotina hasta por 15 días. El RNA total fue aislado en tiempos diferentes y la cantidad de RNAm fue medido como se describe en la sección de Metodología (Fig. 1a) muestra un experimento representativo). La deficiencia de biotina resultó en una disminución gradual en los niveles de RNAm de HCS, PCC y ACC-1 que alcanzó 17-28% de los niveles iniciales (Fig.1b) a los 15 días del tratamiento. Los RNAm de ACC-1 y PCC fueron afectados más rápidamente, mostrando una disminución del 60% a los 7 días mientras que el RNAm de HCS requirió de 11 días en un medio libre de biotina para mostrar una reducción similar (Fig.1b). No se observaron cambios en los niveles de RNAm de ACC-2 o β -actina durante la realización de este experimento lo que sugiere que el efecto de la deficiencia de biotina es específico. Las células HepG2 mostraron morfología y crecimiento normal durante los 15 días de tratamiento en medio sin biotina.

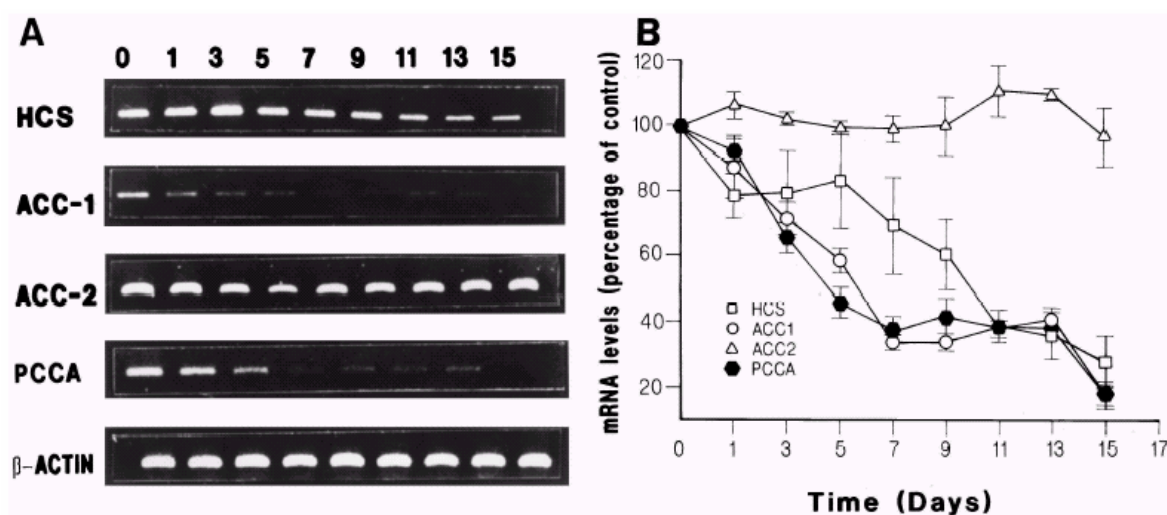


Figura 1. Efecto de la duración de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS, ACC-1, PCC y ACC-2. Panel A muestra un experimento de rtPCR representativo y panel B muestra el resumen de los experimentos realizados. Los resultados son presentados como la media con error estándar.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BIOTINA EN LOS NIVELES DE RNAm DE HCS Y CARBOXILASAS

Para comprobar que la reducción en los niveles de RNAm es un efecto específico de la deficiencia de biotina, incubamos células HepG2 en un medio libre de biotina por 14 días. Estos cultivos fueron transferidos a un medio conteniendo biotina 1.0 μ M por 2, 6, 12 o 24 h. Aunque incubaciones cortas con biotina produjeron incrementos importantes en los niveles de ARNm de HCS (datos no mostrados), fue solo hasta las 24 horas que se observaron niveles de ARNm comparables a los de células cultivadas en medio de crecimiento normal (Fig.2a y 2b). La suplementación de biotina a los medios de crecimiento tuvo un efecto mayor en los RNAm de ACC-1 y PCC comparado a los niveles iniciales. En el caso de ACC-1, la biotina no solo restauró los niveles de su RNAm sino que produjo un aumento del 40% por encima de los resultados obtenidos en células cultivadas permanentemente en presencia de biotina. De manera semejante, el RNAm de PCC mostró un incremento de 30% sobre las células control. Sin embargo, la biotina aumentó los niveles de ARNm solo hasta alcanzar los niveles iniciales. En contraste con los resultados anteriores, no hubo un cambio significativo en los niveles de ARNm de ACC-2 o β -actina después de la estimulación con biotina (Fig.2a y 2b).

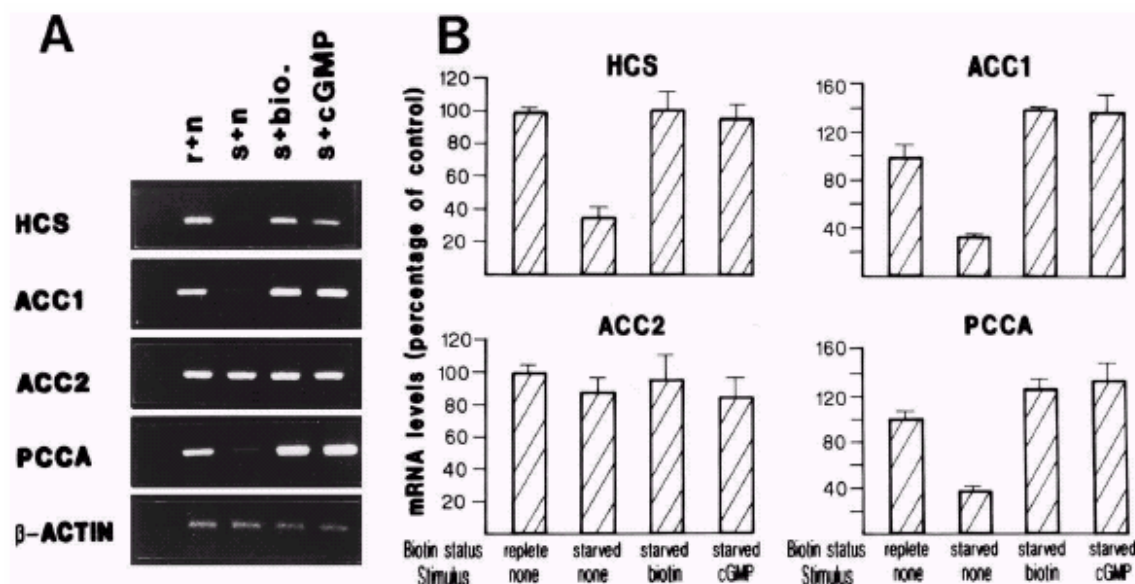


Figura 2. Efecto de la biotina, GMPc y del inhibidor de la guanilato ciclasa soluble sobre los niveles de ARNm.

EFFECTO DEL GMPc EN LOS NIVELES DE RNAm EN CÉLULAS DEFICIENTES DE BIOTINA

Para explorar la idea de que la recuperación en los niveles de ARNm involucra una vía de transducción de señales y la participación de segundos mensajeros, comparamos el efecto de biotina y GMPc en la recuperación de los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCC. Al estimular

células HepG2 deficientes de biotina con 8-Br-cGMP (1.0 mM) este tratamiento resultó en el incremento de los niveles de RNAm de HCS a los niveles observados en células control. Este incremento fue comparable al obtenido añadiendo biotina a los cultivos (Fig. 2a y 2b). Los niveles e RNAm de PCC y ACC-1 aumentaron después de la estimulación con GMPc 30-35% por encima de los valores observados en células control (Fig. 2a y 2b). Estos resultados también fueron idénticos a los observados estimulando a las células HepG2 con biotina. Finalmente, el tratamiento con 8-Br-cGMP no tuvo efecto alguno sobre el RNAm de ACC-2 o actina (Fig. 2a y 2b). La estimulación simultánea de células HepG2 con biotina y 8-Br-cGMP no produjo un efecto aditivo o sinérgico en los niveles de RNAm. El resultado de usar ambos compuestos fueron idénticos a los obtenidos utilizando cualquiera de ellos por separado (datos no mostrados).

LA FORMA SOLUBLE DE LA ENZIMA GUANILATO CICLASA MEDIA EL EFECTO DE BIOTINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAm

Nuestros resultados sugieren que el segundo mensajero GMPc actúa como mediador del efecto de biotina en los niveles de RNAm de HCS, PCC y ACC-1. Existen dos enzimas que podrían estar involucradas en el aumento en la concentración de GMPc en hepatocitos estimulados con biotina; guanilato ciclasa soluble (GCs) y guanilato ciclasa membranal. Para distinguir entre estas posibilidades determinamos si la inhibición de la GCs afecta la recuperación dependiente de biotina de los niveles de RNAm. Células HepG2 deficientes de la vitamina fueron estimuladas con biotina por 24 h en presencia de ODQ un inhibidor específico de la GCs como se describe en la sección de Metodología (37), y los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC fueron comparados con los obtenidos en células deficientes de biotina y células deficientes de biotina estimuladas por 24 h con la vitamina. Como se muestra en el Cuadro 1, la deficiencia de biotina (Bio Def) redujo los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC a un 34-38% con respecto a valores de células control. Al añadir biotina al medio (Bio Def + Bio) de nuevo resultó en la recuperación de los niveles de RNAm a niveles normales para HCS y por encima de valores control en el caso de ACC-1 y PCC-1 (Cuadro 1). La incubación de células HepG2 con biotina y ODQ (ODQ + Bio) evitó la recuperación dependiente de biotina de los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC. Los resultados obtenidos cuando la GCs fue inhibida fueron HCS 11%, ACC-1 36% y PCC 33% (Cuadro 1). Este experimento indica que la GCs está involucrada estimular la recuperación de RNAm por biotina o GMPc. Estos datos también confirman que el RNAm de ACC-2 parece no ser afectados de una manera significativa por la deficiencia de biotina o la suplementación con la vitamina.

LA PROTEÍNA CINASA DEPENDIENTE DE GMPc ES ESTIMULADA POR LA ACTIVIDAD DE LA GCs PARTICIPANDO EN EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE RNAm DEPENDIENTE DE BIOTINA

Para determinar si el efecto de biotina ocurre a través de una cinasa dependiente de GMPc (PKG) (29), se incubaron células HepG2 deficientes de biotina en presencia del inhibidor de la PKG, Rp-cGMPS (PKG_i). Estos experimentos muestran que aunque la estimulación de células HepG2 con biotina 1 μ M fue suficiente para restaurar los niveles de RNAm a niveles normales, la incubación de las células en presencia del inhibidor PKG_i limitó de manera importante la recuperación de los niveles de RNAm (Cuadro, 1).

LA ACTINOMICINA-D IMPIDE LA RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES DE RNAm EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON BIOTINA.

Para continuar caracterizando el efecto de biotina en los niveles de ARNm investigamos si este proceso involucra una estimulación directa de la transcripción de los genes estudiados. Células HepG2 deficientes de biotina fueron incubadas durante una hora en presencia de actinomicina D, inhibidor de la RNA polimerasa II. Después de este tiempo se añadió biotina (1 μ M) a la mitad de los cultivos, mientras que los restantes sirvieron como controles de actinomicina-D. La incubación de las células continuó por 24 h (Cuadro, 1). Este experimento muestra que los niveles de RNAm de HCS, ACC-1, ACC-2 y PCC disminuyeron por debajo de los niveles obtenidos en medio libre de biotina en las células que fueron expuestas a actinomicina-D. La estimulación con biotina no aumentó los niveles de RNAm en presencia del inhibidor, siendo estos valores esencialmente idénticos a los controles que solo fueron tratados con actinomicina-D (Cuadro, 1).

Cuadro.1. Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa soluble, proteína cinasa dependiente de GMPc y RNA polimerasa II en los niveles de ARNm.

Levels	Bio Def, %	Bio Def + Bio, %	ODQ + Bio, %	PKGi + Bio, %	Act D + bio, %
HCS	36 \pm 5.0	103 \pm 9.87	11 \pm 0.68	52 \pm 2.51	25 \pm 6.0
ACC-1	34 \pm 1.15	140 \pm 2.21	36 \pm 5.0	26 \pm 9.53	14 \pm 7.24
PCCA	38 \pm 3.54	130 \pm 6.61	33 \pm 3.60	21 \pm 11.1	34 \pm 5.03
ACC-2	88 \pm 8.96	95 \pm 2.31	ND	ND	19 \pm 2.0

EL EFECTO DE BIOTINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAm REQUIERE DE LA ACTIVIDAD DE LA HOLOCARBOXILASAS SINTETASA

Debido a que la biotina es el sustrato de la HCS, investigamos si esta enzima participa en la recuperación de los niveles de RNAm en células HepG2 estimuladas con biotina. En este experimento comparamos el efecto de diferentes concentraciones de biotina en los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC en fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con mutaciones en HCS que disminuyen su afinidad por biotina e impiden la formación del intermediario B-AMP. Debido a que los resultados obtenidos por los tres RNAm estudiados fueron similares, decidimos enfocarnos en el estudio del RNAm de la HCS. Dos líneas celulares mutantes fueron utilizadas, MCD-MK, homocigota para la mutación R508W, y MCD-VE con las mutaciones L216R y V363D (16). Experimentos preliminares demostraron que ambas líneas celulares respondían de manera idéntica a biotina (datos no mostrados). Por esta razón y el hecho de que las células MCD-MK nos proveían de un trasfondo genético homogéneo, decidimos utilizar ésta línea celular para estudiar el papel de la HCS en el efecto de biotina sobre los niveles de RNAm. La Fig. 3 muestra el efecto de diferentes concentraciones de la vitamina en la recuperación de los niveles de RNAm de HCS en células MCD-MK deficientes de biotina. La incubación de células normales y MCD-MK en un medio libre de biotina por 14 días redujo los niveles de RNAm de HCS a un 35% de los valores control en ambos casos. La suplementación de los cultivos con biotina 0.01 μ M incrementó los niveles de RNAm a 78% con respecto a los resultados obtenidos en fibroblastos control. Esta concentración de biotina no indujo un cambio

aparente en el RNAm de HCS en células MCD-MK (38%). Al incrementar 10 veces la concentración de biotina (0.1 mM) los niveles de RNAm de HCS aumentaron a 87% en fibroblastos normales y 53% en células MCD-MK. Los niveles de RNAm de HCS en fibroblastos normales y células MCD-MK mostraron niveles similares solo hasta que la concentración de biotina fue incrementada a 1.0 μ M (118% y 93%, respectivamente) (Fig.3).

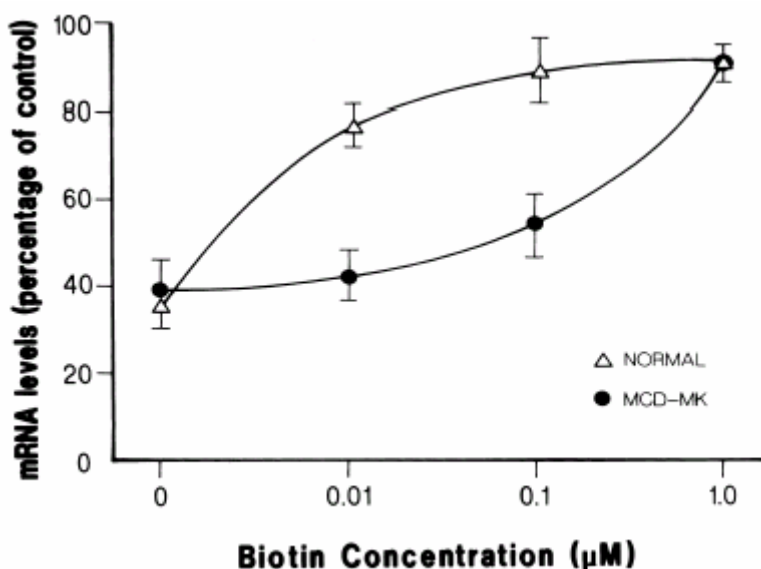


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS en células normales y de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas (MCD-MK).

EFFECTO DEL GMP_c EN LOS NIVELES DEL RNAm DE HCS EN CÉLULAS NORMALES Y CÉLULAS MCD

En esta sección del estudio investigamos si en la DMC las mutaciones en HCS afectan también el aumento en los niveles del RNAm en respuesta a GMP_c. fibroblastos normales y células MCD-MK fueron estimuladas con diferentes concentraciones de 8-Br-cGMP (0.01 mM, 0.1 mM y 1.0 mM). Ambas líneas celulares no mostraron ningún cambio en la concentración de RNAm de HCS al ser incubadas con 8-Br-cGMP 0.01mM y 0.1 mM (datos no mostrados). Sin embargo al estimular las células con 8-Br-cGMP 1.0 mM los niveles de RNAm de HCS se elevaron a 117% en células normales y 92% en células MCD-MK con respecto a células control.

EL TRANSPORTADOR DE BIOTINA SMVT, ES REGULADO A NIVEL TRANSCRIPCIONAL POR LA PRESENCIA DE LA VITAMINA

Los resultados anteriores claramente indican que la biotina actúa sobre la expresión genética en células humanas. Sin embargo, para que la biotina pueda participar como cofactor de carboxilasas o como inductor transcripcional necesita ser primero internalizada a la célula. Por esta razón, y por el hecho de que el transportador de biotina SMVT presenta un punto lógico

de regulación del metabolismo de la vitamina, determinamos el efecto de su deficiencia sobre los niveles de ARNm de este gen. Células HepG2 incubadas en un medio deficiente de biotina mostraron una reducción del 70% en los niveles de ARNm de SMVT con respecto a células control (Fig.4.), la especificidad del efecto de la deficiencia de biotina quedó de manifiesto al estimular a las células con biotina 1.0 μ M. Este tratamiento fué suficiente para restablecer los niveles del ARNm de SMVT a valores normales. La expresión de SMVT parece estar bajo el mismo control transcripcional que los genes de HCS, ACC-1 y PCC ya que el GMPc puede sustituir a la biotina y el compuesto ODQ, inhibidor de la guanilato ciclase soluble, previno la recuperación de los niveles de ARNm cuando las células fueron estimuladas con biotina en presencia de este veneno metabólico (Fig.4.).

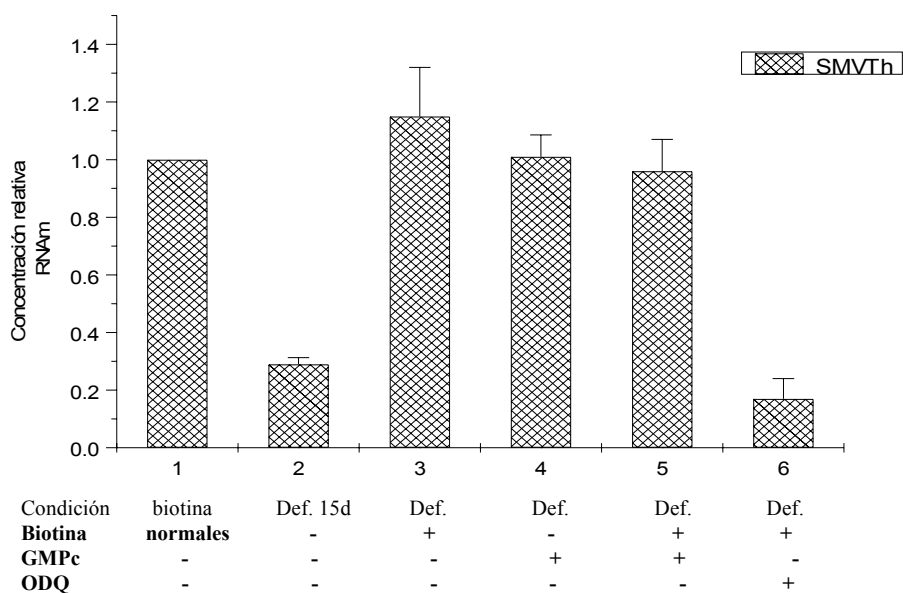


Figura 4. Efecto de biotina, GMPc y GCs, sobre los niveles de ARNm del SMVT en células humanas.

EN PACIENTES CON DEFICIENCIA MÚLTIPLE DE CARBOXILASAS HAY UNA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE ARNm DE SMVT

Para determinar si los niveles de ARNm de SMVT están bajo el control de la actividad de la HCS estudiamos el efecto de la deficiencia de biotina en células normales y células de pacientes con DMC. Al incubar estas líneas celulares en un medio deficiente de biotina registramos una reducción del 70% en los niveles de ARNm de SMVT en ambos casos. Sin embargo, al estimular las células con diferentes concentraciones de biotina la respuesta fué muy diferente. Mientras que biotina 1nM fué suficiente para que células normales incrementaran los niveles de ARNm a 78% con respecto al control, las células DMC mostraron un incremento mucho menor (20%). A pesar que la concentración de la biotina incrementó mil veces, los niveles de ARNm de SMVT, en células DMC no alcanzó los niveles normales (Fig. 5).

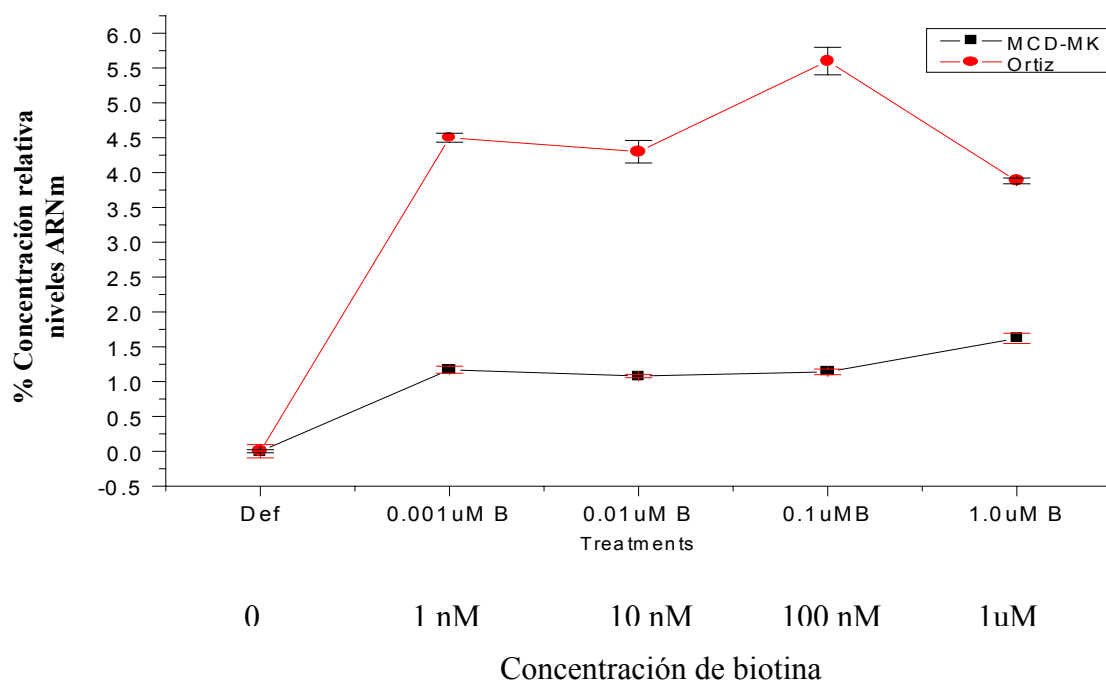


Figura 5. Efecto de la biotina en los niveles de ARNm de SMVT en células normales y de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas.

LA DEFICIENCIA DE BIOTINA NO AFECTA LOS NIVELES DE ARNm DE BIOTINIDASA ENZIMA RESPONSABLE DEL RECICLAMIENTO DE BIOTINA

Los resultados anteriores son difíciles de explicar ya que se esperaría que la célula respondiera a la deficiencia de biotina sintetizando más transportador SMVT para maximizar las oportunidades de satisfacer sus requerimientos en cuanto a esta vitamina. Para tratar de entender este comportamiento decidimos determinar el efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm de enzimas involucradas en el transporte (SMVT), utilización (HCS y propionil-CoA carboxilasa, PC) y reciclamiento (biotinidasa) de biotina. Nuevamente, como había ocurrido en experimentos anteriores, la deficiencia de biotina resultó en una disminución de los niveles de ARNm de HCS, PC y SMVT en fibroblastos normales y en fibroblastos de pacientes con DMC. Sin embargo, los niveles del ARNm de biotinidasa no fueron afectados (Cuadro 2). Estos resultados sugieren que la deficiencia de biotina reduce la capacidad de las células para utilizar la biotina exógena mientras que la capacidad de reciclamiento intracelular permanece intacta. El hecho de que la biotinidasa no sea afectada transcripcionalmente también indica que el efecto de biotina es específico y no el resultado del deterioro metabólico de la célula que pudiera afectar la transcripción genética en general.

Cuadro 2. Efecto de la biotina sobre niveles de ARNm de enzimas involucradas en el transporte, utilización y reciclamiento de esta vitamina en diferentes líneas celulares humanas.

	HepG2		Fibroblastos normales		MCD-MK (HCS deficiente)	
	Deficientes	+Biotina	Deficientes	+Biotina	Deficientes	+Biotina
SMVT	29%	115%	18%	88%	18%	47.2%
HCS	36%	100%	34%	117%	38%	92%
PC	57%	100%	26%	100%	51%	100%
Biotinidasa	84%	91%	108%	100%	118%	113%

LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA CASCADA HCS-GCS-PKG MUESTRA ESPECIFICIDAD TISULAR

Para tratar de comprender el papel fisiológico de la regulación transcripcional por biotina desarrollamos un modelo animal de deficiencia de esta vitamina. En esta parte del proyecto utilizamos ratas tipo Whistar macho adultos alimentados con una dieta deficiente de biotina durante 8 semanas. Este tiempo es el requerido para que las carboxilasas en el plasma de los animales disminuyan su actividad a 1%-5% del valor normal. Estos valores enzimáticos son los que presentan los pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas. El RNA total se extrajo a partir de cerebro, músculo, riñón e hígado de estos animales para amplificar mediante rtPCR los ARNm de HCS, SMVT, PC y bitinidasa. Estos experimentos fueron diseñados para explorar la posibilidad de que la inhibición en la transcripción de estos genes por deficiencia de biotina sea un fenómeno general y no producto del uso de células hepáticas como modelo experimental, en el caso del modelo animal, la deficiencia de biotina resultó en una marcada disminución en el ARNm de SMVT, HCS y la carboxilasa piruvato carboxilasa (PC) en hígado y riñón (Cuadro 3). De manera análoga a los resultados obtenidos en hepatocitos y fibroblastos humanos los niveles de ARNm de biotinidasa no fueron afectados por la deficiencia de biotina. De manera notable el cerebro mostró ser un órgano protegido ya que la deficiencia de biotina no afecto los niveles de ARNm de ninguno de los genes estudiados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de biotina sobre niveles de ARNm de enzimas involucradas en la utilización de biotina en órganos de rata deficiente de biotina.

	Hígado	Cerebro	Riñón
SMVTr	42%	90%	43%
HCSr	55%	94%	n.d.
PCr	16.7%	95.6%	41%
Biotinidasa	91%	104%	93%

LOS PROMOTORES DE ACC-1 Y SMVT CONTIENEN SECUENCIAS QUE SON ACTIVADAS DURANTE LA ESTIMULACIÓN CELULAR CON BIOTINA

En los experimentos anteriores se demostró que la biotina al ser transformada por la HCS en B-AMP actúa como un inductor transcripcional a través de la estimulación de una cascada de transducción de señales localizada en el citoplasma. Sin embargo, desconocemos como se transmite esa señal al núcleo celular para activar la transcripción de genes blanco. Para caracterizar la parte nuclear de la estimulación transcripcional por biotina clonamos fragmentos de DNA genómico en los que presumiblemente se encuentran los promotores de los genes ACC-1 y SMVT. Estos fragmentos fueron subclonados en el vector pGI3 basic (promega) que contiene el gen reportero de luciferasa. Un aumento en la actividad de luciferasa es el indicador de que los fragmentos genómicos contienen un promotor funcional. En el caso de la región promotora de SMVT esta se dividió en tres fragmentos menores a los que se denominó P1, P2 y P3. Estos experimentos mostraron que únicamente el fragmento P2 presenta la capacidad para dirigir la expresión de luciferasa (Fig.6.). Cuando las células transfectadas con estos fragmentos fueron estimuladas con biotina la actividad de luciferasa se incrementó en un 100%. El promotor de ACC-1 mostró un comportamiento similar pero en este caso la biotina estimuló casi 200% la actividad de luciferasas con respecto al control (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el efecto transcripcional de biotina observado en células en cultivo se reproduce a nivel de promotores. Con el objeto de identificar las regiones en el promotor que pudieran estar involucradas en el efecto de biotina se analizaron las secuencias genómicas con el programa MacVector para identificar todos los posibles sitios de unión de factores de transcripción presentes en los promotores de ACC-1 y SMVT. Aunque estas regiones son completamente diferentes en cuanto a su secuencia, en ambas encontramos secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción C/EBP y CREB. La funcionalidad de estos sitios y su papel en la regulación transcripcional por biotina será determinada mediante ensayos de inmuno-precipitación de cromatina, mismos que serán descritos al final de esta sección.

DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que la biotina, además de actuar como cofactor de carboxilasas, también modifica la expresión genética a nivel transcripcional y traduccional. La mayor parte de estos trabajos han sido realizados utilizando proteínas hepáticas de rata. Estudios recientes han mostrado también que la biotina regula de manera positiva los niveles del RNAm de HCS y mantiene el nivel de las dos carboxilasas en hígado de rata. En este estudio, hemos examinado el papel de la HCS en la regulación genética mediada por biotina. Los resultados demuestran el papel de HCS, cuya función es la activación de biotina a B-AMP y su transferencia a las carboxilasas, como intermediario en la estimulación mediada por biotina de los niveles de RNAm de HCS y carboxilasas en fibroblastos humanos. Este trabajo demuestra que en fibroblastos y hepatocitos humanos que la estimulación por biotina de los niveles de RNAm requiere GMPc y la participación de la enzima guanilato ciclasa soluble, y la proteína cinasa dependiente de GMPc.

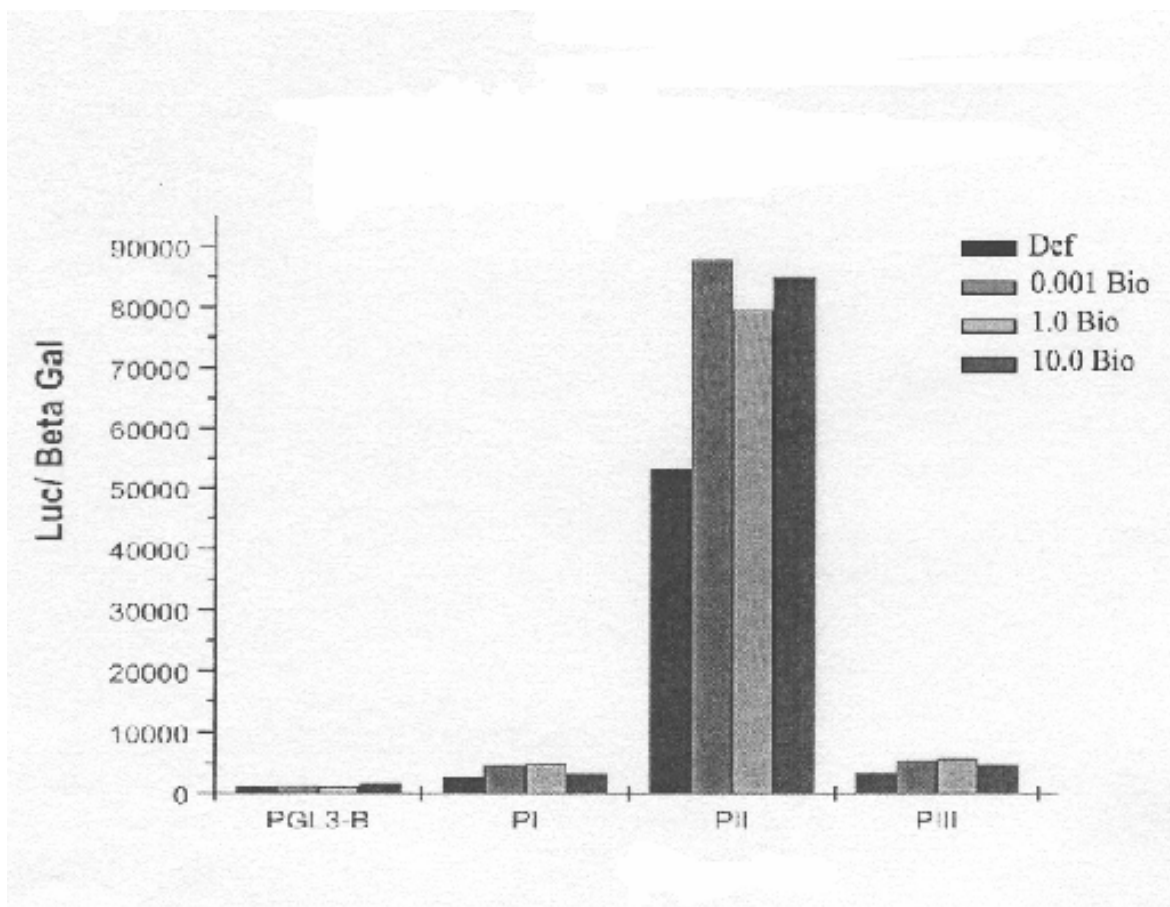


Figura 6. Efecto de biotina sobre la actividad del promotor del gen SMVT humano.

El impacto de la deficiencia de biotina en células HepG2 fue una reducción gradual de los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC hasta alcanzar un 30% de los niveles iniciales mientras que el ARNm de la ACC-2 no fue afectado. Las células tuvieron que ser incubadas dos semanas en un medio libre de biotina para observar los cambios antes mencionados en los niveles de RNAm. Esto probablemente refleja una lenta excreción y metabolismo de biotina. La suplementación o adición de biotina resultó en una recuperación dramática de los niveles de RNAm en 24 horas lo que demuestra que el efecto de biotina es específico.

La incubación de células HepG2 in presencia del inhibidor de la RNA polimerasa II, actinomycin-D por 24 horas redujo los niveles de RNAm por debajo de los niveles observados en células deficientes de biotina y la vitamina no pudo contrarrestar los efectos de la droga. Estos resultados sugieren que el efecto de biotina es estimular la transcripción genética, sin embargo, confirmación de esta afirmación requiere del examen directo de la velocidad de transcripción para descartar la posibilidad de que la biotina influya en el procesamiento o estabilidad del RNAm.

Los experimentos realizados en este trabajo presentan evidencias que indican que la biotina regula los niveles de RNAm a través de una cascada de transducción de señales que

involucra cGMP y PKG (Fig 7). En primer lugar, el GMPc puede reproducir el efecto de biotina en los niveles de RNAm. En segundo lugar, el uso de ODO, un inhibidor de la GCs, impide el efecto de biotina. Tercero, el inhibidor e la PKG (rp-cGMPS), permitió solo una recuperación mínima de los niveles de RNAm de HCS y carboxilasas.

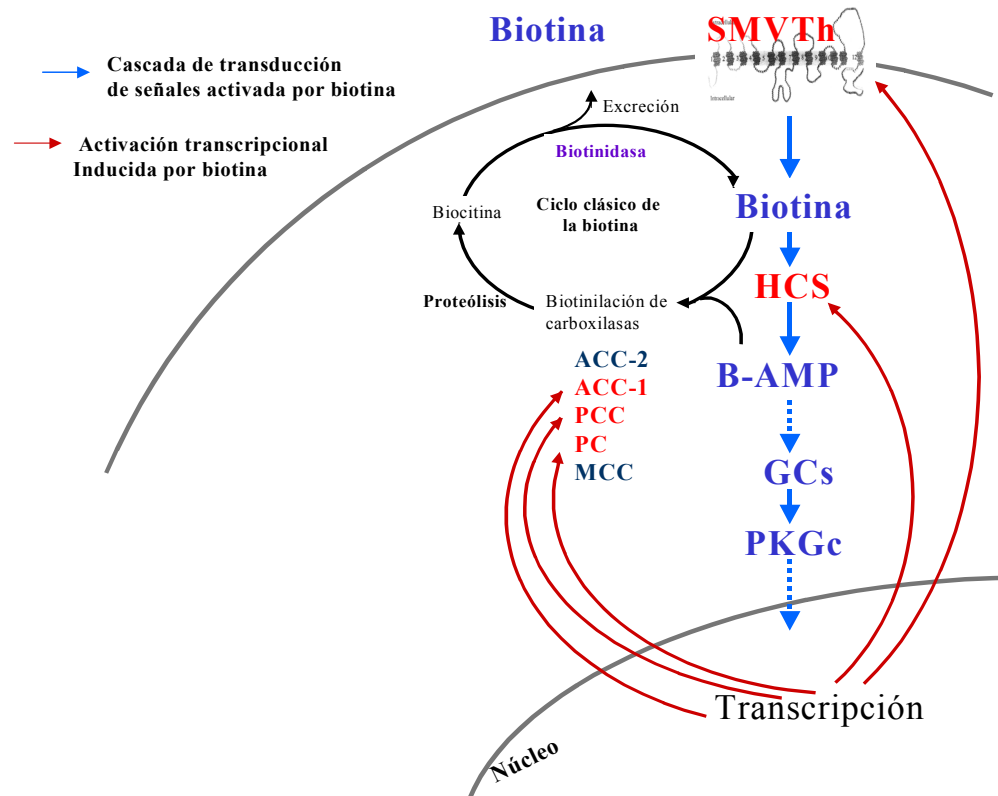


Figura 7. Modelo en el que se representa la función “clásica” de biotina como cofactor de carboxilasas y su papel como activador transcripcional.

En nuestra investigación el uso de células de pacientes con DMC fue esencial para distinguir entre un efecto directo de biotina y uno en el cual la biotina tiene que ser metabolizada para producir un efecto transcripcional. Las células MCD-MK son homocigotas para la mutación R508W, una de las más frecuentemente encontradas en pacientes con DMC (16, 31, 32). Células humanas que llevan esta mutación presentan una baja actividad de todas las carboxilasas pero han demostrado responder estupendamente a dosis farmacológicas de biotina (16). Al incubar células normales y DMC deficientes de biotina con concentraciones diferentes de la vitamina se demostró que las células mutantes requieren 100 veces más biotina para elevar la cantidad de ARNm de HCS a niveles mostrados por células normales. Al comparar la capacidad de biotina vs GMPc para estimular los niveles de RNAm de HCS en estas líneas celulares, demostramos la contribución esencial de HCS en este proceso y el hecho de que el GMPc se encuentra debajo de la HCS en la cascada de transducción de señales. El producto

inmediato de la interacción de HCS con biotina es la síntesis de B-AMP. Este compuesto es el sustrato real para la transferencia de biotina a las carboxilasas. En este trabajo sugerimos que el B-AMP es un buen candidato para ser un segundo mensajero involucrado en los procesos celulares regulados por biotina.

Un estudio previo a esta investigación demostró que la deficiencia de biotina en ratas resulta en la reducción en los niveles de ARNm de HCS mientras que los ARNm de PC y PCC no fueron afectados (27). En este estudio mostramos que la deficiencia de biotina en células humanas HepG2 reduce los niveles de ARNm de HCS, PCC y ACC-1. El comportamiento diferente del ARNm de PCC en células humanas y ratas deficientes de biotina puede explicarse por diferencias en las técnicas ó los modelos utilizados en ambos estudios. Es también posible que el efecto de biotina sobre las carboxilasas sea específico de células humanas. Sin embargo, nuestros resultados parecen ser confirmados por la observación hecha en pacientes con cáncer de colon. Las células de adenocarcinoma mostraron tener concentraciones mas bajas de biotina en comparación con células normales y una reducción en los niveles de ARNm de PCCA y PCCB (34). Es posible que en células de cáncer de colon el patrón de expresión genética ha sido alterado de manera adicional por la poca disponibilidad de biotina y por la disminución en la activación de la cascada de señalización HCS-GCs-PKG descrita en este estudio.

Uno de los descubrimientos más interesantes de este estudio es la represión de la transcripción del transportador de biotina SMVT en células deficientes. La singularidad de este resultado es que uno esperaría que ante la deficiencia de biotina la célula respondiera sintetizando más SMVT para optimizar las probabilidades de utilizar la poca biotina disponible en el medio. Esto en principio parece ser contrario al mantenimiento de la homeostasis metabólica por lo que decidimos utilizar un modelo animal para descartar que este resultado fuera producto del modelo utilizado más que una característica de la regulación in vivo del SMVT. El modelo animal mostró también que la deficiencia de biotina resulta en una reducción de los niveles de ARNm de las enzimas involucradas en el transporte y utilización de biotina en hígado, riñón y músculo. Sin embargo los niveles de ARNm no fueron afectados en el cerebro de estos animales. Para explicar estas observaciones proponemos el siguiente modelo; **En la deficiencia de biotina, debido a una mala alimentación o al ayuno, hay una reducción en la transcripción de los genes HCS, SMVT y de las carboxilasas en órganos periféricos.** Esto provocaría una reducción en el consumo de biotina en músculo, hígado, piel y riñón. Estos órganos, en el escenario propuesto, tendrían un papel altruista en el metabolismo ya que al sacrificar su consumo de biotina favorecen que la vitamina remanente en el plasma sea utilizada por el cerebro. Este mecanismo probablemente este asociado con la imperiosa necesidad de este órgano para mantener activas a las enzimas propionil-CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa ya que en conjunto aportan el 30% de la energía que consume este órgano en forma de intermediarios del ciclo de Krebs. Esta hipótesis es fortalecida por el hecho de que la PC también participa en la síntesis de neurotransmisores por lo que su papel en el cerebro es aún más importante. Es interesante recordar que tanto en células humanas en cultivo como en el modelo animal los niveles de ARNm de biotinidasa no fueron afectados por la deficiencia o suplementación de biotina. Debido a que el papel de la biotinidasa es el reciclar biotina intracelular durante la degradación de carboxilasas podemos especular que esta enzima tiene un papel fundamental en el modelo de protección del metabolismo cerebral. Ya que esta enzima no es afectada por los niveles de biotina es posible que durante la deficiencia de esta vitamina, y al disminuir el consumo de la vitamina en órganos como el músculo o el hígado, la biotinidasa contribuya a la supervivencia de estos tejidos mediante el reciclamiento de la vitamina

intracelular (Fig.7), la importancia de la biotinidasa en el mantenimiento metabólico queda de manifiesto en pacientes que muestran una deficiente actividad en la actividad de esta enzima. Los síntomas de esta enfermedad son virtualmente idénticos a los de pacientes con deficiencia de HCS. Sin embargo, a diferencia de la DMC, la deficiencia de biotinidasa implica daño neurológico y pérdida de la audición por lo que es posible que la actividad de esta enzima sea particularmente importante para satisfacer los requerimientos de biotina del sistema nervioso. Es interesante considerar la posibilidad de que la cascada HCS-Gcs-PKG y la biotinidasa estén detrás de los síntomas de pacientes afectados con la enfermedad de ganglio basal en particular con la destrucción del putamen.

La clonación de los promotores de ACC-1 y SMVT permitió estudiar los mecanismos de activación transcripcional a nivel del DNA. Nuestros resultados indican que la respuesta de estos promotores es idéntica a la observada en células humanas cultivadas en presencia de biotina. La adición de biotina en concentraciones fisiológicas es suficiente para aumentar en un 2100-200% la actividad de estos promotores en células HepG2. Estos resultados validan los experimentos realizados en células en cultivo y de manera igualmente importante nos proveen de un modelo experimental con el cual esperamos diseccionar en detalle cada uno de los componentes de la maquinaria nuclear responsable de la activación transcripcional de biotina. El análisis de las secuencias de los promotores de ACC-1 y SMVT revela una sola característica en común, la presencia de varios sitios de unión para CREB y C/EBP. Aunque estos sitios aun deben ser validados experimentalmente, es interesante considerar su posible importancia en los procesos descritos en este proyecto.

La cascada de transducción de señales activada por biotina involucra a la enzima PKG. Esta es una cinasa que al ser activada por GMPc es translocada a núcleo en donde se le ha asociado a la activación transcripcional mediante la fosforilación de factores de transcripción como c-Jun. Es interesante considerar que en la activación transcripcional por biotina PKG tenga como sustratos a CREB y C/EBP ya que es sabido que estos factores son activados por fosforilación catalizada por diversas cinasas. Si este modelo es correcto, la unión de CREB y C/EBP al promotor de ACC-1 o SMVT resultaría en el reclutamiento de CBP y p300. Estos factores celulares poseen actividad de acetilasas de histonas misma que se ha asociado a regiones transcripcionalmente activas del DNA. En este trabajo proponemos que el último paso en la activación transcripcional mediada por biotina es la acetilación de histonas lo que resulta en una remodelación transitoria de la estructura de la cromatina en la región promotora permitiendo el acceso a la maquinaria basal de la transcripción.

El descubrimiento de que la biotina actúa como un inductor transcripcional sugiere que esta vitamina pudiera ser importante en la regulación de la expresión de otros genes no involucrados en el metabolismo de la biotina. Durante años, varios investigadores y veterinarios han mostrado que la deficiencia marginal de biotina en animales en gestación resulta en una alta incidencia de malformaciones congénitas como labio y paladar hendido, sindactilia, anencefalia y espina bífida, entre otras (41). En estos animales la actividad de carboxilasas esta dentro de los límites normales, por lo que es posible que la activación transcripcional por biotina podría ser importante en la organogénesis durante el desarrollo embrionario. El efecto teratogénico de la deficiencia de biotina podría estar relacionado con la capacidad de la enzima PKG para activar los factores de transcripción *c-Jun* y *c-Fos* (42). Es posible que cuando la cascada HCS-GCs-PKG no es disparada por privación de la vitamina esto resulte en cambios en la expresión de genes que dependen de *c-Jun* y *c-Fos* para ello.

En resumen, en este trabajo hemos propuesto que la biotina actúa regulando los niveles de ARNm de varios genes a través de una cascada de transducción de señales que esta formada por la HCS, la forma soluble de la guanilato ciclasa y la proteína cinasa dependiente de GMPc (GMP cíclico). El papel de la HCS en el control de la expresión de los genes que codifican carboxilasas tiene implicaciones en el tratamiento de la deficiencia múltiple de carboxilasas. Es posible que las manifestaciones clínicas y bioquímicas de estos pacientes reflejan el efecto combinado de una baja afinidad por biotina de la HCS mutante y la consecuente reducción en los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas. Un efecto que resultaría en el deterioro de la salud de estos pacientes. De manera similar, nuestros experimentos sugieren que la rápida recuperación de pacientes con DMC ó de sus células en cultivo, representa el efecto simultáneo de compensar la baja afinidad de la HCS por la vitamina, así como, la elevación en la concentración de estas enzimas a través del incremento en los niveles de sus respectivos ARNm. Los resultados obtenidos en cuanto a la represión transcripcional en hígado y cerebro sugieren que la posibilidad de algunas enfermedades de etiología desconocida como la enfermedad de ganglio basal, pudiera estar relacionada a una falla en el sistema de protección del metabolismo cerebral propuesto en este trabajo.

Si este modelo es correcto, la deficiencia de biotina podría tener implicaciones importantes en el estudio de la nutrición y desarrollo humanos. En estudios recientes realizados en Estados Unidos, se ha demostrado que casi el 100% de las mujeres embarazadas desarrollan diversos grados de deficiencia de biotina. La evidencia que presentamos en este trabajo, en cuanto al papel de biotina como un inductor transcripcional y su posible relación con malformaciones congénitas, hacen prioritario el estudio del estatus nutricional de biotina en mujeres embarazadas en nuestro país. **Es necesario comprender a fondo las diferentes funciones de la biotina en el metabolismo humano para poder determinar el verdadero riesgo que representa una dieta pobre en biotina, sobre todo si se toma en cuenta los niveles tan elevados de desnutrición presentes en México.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Biotina 8-bromoguanosina monofosfato cíclico (8-Br-GMPc), 1-H [1,2,4]oxadazolo-[4,3-a]quinaxolina-1 uno (ODQ) y actinomicina-D fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Rp-8(4-clorotiofenil)-guanosina-3', 5'-monofosforotioato cíclico (Rp-8-pCPT-cGMPS) fue obtenido de Biolog, San Diego, CA. La línea celular humana de hepatoblastoma, HepG2, fue obtenida de la American Type Cell Collection. Fibroblastos humanos normales y fibroblastos de pacientes con DMC (DMC-MK) y DMC-VE) fueron donados por el Dr. R. Gravel de la Universidad de Calgary, Alberta, Canada.

Transcripción reversa-PCR. El ARN total fue aislado a partir de cultivos celulares utilizando el producto Trizol (Gibco-BRL Life Technology, Heidelberg, Alemania). El RNA obtenido fue tratado por 1h a 37°C con 6 U de deoxirribonucleasa libre de ribonucleasa en 100 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 50 mM de MgCl₂ en presencia de 2U/ul de inhibidor de RNAsa de placenta. La concentración de ARN fue determinada por absorbancia a 260 nm, y la integridad de las muestras de ARN fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Enseguida, 5 µg de ARN total fueron transformados a ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Gibco-BRL) y 0.8 µM de oligonucleótidos, específicos para cada uno de los genes utilizados. Una reacción de control sin transcriptasa reversa fue realizada para cada muestra de ARN para verificar que el producto del PCR subsecuente no fuera resultado de contaminación por DNA genómico. Para la amplificación por PCR de ADNc, se utilizaron oligonucleótidos sentido y antisentido para amplificar fragmentos de 200-500pb a partir de RNA. Esto fue

realizado incubando 1 ul del ADNc obtenido, en un volumen de reacción de 30 ul (50 mM MgCl₂ y 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) conteniendo 100 pmol de oligonucleótidos sentido y antisentido y 0.3ul de la enzima taq Polimerasa (Perkin Elmer). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: HCS:5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG- 3' y 5'- CCC AAG CCT TTT ACC GCC GTT TGG GGA-3' (Tm=58°C); ACC-1: 5'-GAT GTA CAT CGG CTG AGT GA-3' y 5'-ATC CAT TCA TTA CAT TGA CC-3' (Tm=58°C), ACC-2: 5'-CCT AAA GGT GAC CCG GAG T-3' Y 5'-AAA AAG CCA CTC ATG ACG TT-3' (Tm=60°C), PCCA: 5'-CCC CGA TGC CCG GAG GTG GT-3' y 5'-TAT TTC CAG CTC CAG AGC AG-3' (Tm=60°C), β-actina: 5'-GGG TCA GAA TTC CTA TG-3' y 5' -GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' (Tm=58°C).

Densitometría de fluorescencia: Los productos de PCR obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. La cantidad de producto de PCR fue determinado por densitometría, utilizando un analizador de imágenes (Fluor-S-imager, BIORAD, Hercules CA.) El procedimiento fue validado en estudios previos con productos amplificados por PCR utilizando diferentes concentraciones de fragmentos de ADNc de HCS, PCCA y β-actina (Dato no mostrado). El número de ciclos utilizados por PCR fue variable para cada uno de los genes. Para asegurar que los experimentos fueran realizados en la fase exponencial de amplificación, el número de ciclos utilizados fueron graficados contra la intensidad de fluorescencia de la banda obtenida. Para cada experimento, se utilizó ARNm del gen constitutivo de β-actina, como referencia de transcrito celular. Este fue presente a niveles equivalentes en todas las muestras de ARN (Figs. 1 y 2).

Efecto de la deficiencia de biotina en niveles de ARNm. La línea celular HepG2 humana fue mantenida a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en 5 ml. de medio alpha-MEM, el cual contiene altos niveles de glucosa (GIBCO/BRL) suplementado con SFB 10% inactivado por calor, además de la presencia de 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 ug/ml de estreptomina. Para los experimentos realizados en deficiencia de biotina, las células fueron mantenidas en medio MEM libre de biotina, suplementado con SFB 10% dializado (Gibco/BRL) con el fin de reducir al máximo los niveles de biotina. Las células HepG2 fueron cultivadas en este medio aproximadamente por 20 días. El RNA total fue extraído a diferentes tiempos y los niveles de ARNm para HCS, ACC-1, ACC-2, PCCA y β-actina fueron determinados por densitometría de fluorescencia como se describió anteriormente. Después de 15 días mantenidas en medio libre de biotina, los cultivos celulares alcanzaron un 70-80% de confluencia y un análisis por microscopía mostró morfología normal en las células.

Efecto de biotina y GMPc sobre los niveles de ARNm en células mantenidas en deficiencia de biotina. Células HepG2 mantenidas en medio libre de biotina por 15 días, fueron estimuladas con 1 μM de biotina ó 1mM de 8-Br-GMPc, un análogo no hidrolizable de GMPc. Las células fueron cosechadas después de 2, 6, 12 y 24h y los niveles de ARNm de los diferentes genes fue analizado como se mencionó anteriormente. Para determinar la participación de la forma soluble de la guanilato ciclasa (GCs) en los niveles de ARNm, las células deficientes de biotina fueron tratadas por 3 h con 50 μM de ODQ, un inhibidor específico de la GCs. Después de este tiempo, 1 μM de biotina fue añadido al medio por 24 h y el efecto sobre los niveles de ARNm fueron comparados con células deficientes de biotina estimuladas con biotina en ausencia de ODQ y células mantenidas en medio normal (células control).

Estímulo de biotina sobre los niveles de ARNm después de la inhibición de la ARN polimerasa II. Las células HepG2 deficientes de biotina fueron tratadas con 10 μM de actinomicina-D por 1 h (30). Después de este tiempo, se añadió biotina al medio a una concentración final de 1 μM y el RNA total fue aislado 24 h después. Los niveles de ARNm fueron comparados con los datos obtenidos de células tratadas con actinomicina-D en ausencia de biotina y células no tratadas con el inhibidor de la RNA polimerasa II.

Efecto de la inhibición de la proteína cinasa dependiente de GMPc. Células HepG2 fueron mantenidas en medio libre de biotina por 15 días, estas fueron tratadas con 10 μM de Rp-8-pCPT-cGMPS, un inhibidor específico de la proteína cinasa dependiente de GMPc (29) por 1 hora. Después de este periodo, 1μM de biotina (concentración final) fue añadido al medio y su crecimiento continuó por un total de 24h. El ARN total fue aislado y los niveles de ARNm fue determinado como se describió anteriormente.

Efecto de biotina y GMPc sobre los niveles de ARNm de HCS en cultivos de fibroblastos. Fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con DMC fueron incubados en medio deficiente de biotina por 15 días. Las células fueron tratadas con 0, 0.01, 0.1 ó 1.0 μ M de biotina por 24 hr. El ARN total fue aislado y el nivel de ARNm de la HCS fue determinado por densitometría de fluorescencia a partir de los productos de rtPCR. Experimentos similares fueron realizados en estas líneas celulares utilizando 0.01, 0.1 ó 1.0 mM 8-Br-GMPc.

Efecto de la biotina sobre la expresión del transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT). Para que la biotina pueda actuar como cofactor de carboxilasas o como inductor transcripcional debe primero ser transportada al interior de las células. En organismos eucariontes el transportador multivitamínico dependiente de sodio es el encargado de transportar biotina, ácido lipóico y pantotenato. Para estudiar si la biotina puede regular la expresión de su propio transportador medimos la cantidad de RNAm del SMVT en células normales y deficientes de biotina mediante rtPCR como se describió anteriormente.

Modelo animal de deficiencia de biotina.

Para estudiar el efecto de la deficiencia de biotina en diferentes órganos se alimentó a ratas Whistar adultas con una dieta libre de biotina (Harlan U.S.A). Para determinar el grado de deficiencia de biotina se midió la actividad de piruvato carboxilasa en el plasma cada tercer día. Cuando la actividad de esta enzima mostró valores de entre 1% y 5% de los valores normales los animales fueron sacrificados y los órganos fueron colectados y congelados en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. El RNA de los tejidos fue aislado mediante homogenización con trizol de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante.

Clonación y caracterización funcional de los promotores de ACC-1 y SMVT.

Utilizando como referencia la secuencia publicada de ACC-1 y SMVT realizamos una búsqueda en los bancos de datos del genoma humano para localizar la región genómica que contiene el sitio de inicio de la transcripción de estos genes. Fragmentos de 1.0, 3.0 y 5.0 kb de longitud por arriba del sitio de inicio de la transcripción fueron amplificados mediante PCR utilizando DNA genómico como templado de los genes de ACC-1 y SMVT. Los fragmentos fueron clonados en el plásmido pG13 (Promega) que contiene el gen reportero luciferasa. Los vectores fueron transfectados en células HepG2 y la actividad promotora fue determinada, después de estimular con biotina a estas células, en base a la actividad de luciferasa en extractos celulares.

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y por lo menos en tres diferentes ocasiones, utilizando diferentes muestras de ARN para los ensayos de rtPCR. Los resultados obtenidos de ARNm de células en deficiencia de biotina fueron normalizados con ARNm de β -actina y expresados como porcentaje de niveles de ARNm observados en células mantenidas en medio deficiente de biotina. Los datos son presentados como el promedio de tres experimentos diferentes \pm E. S.

REFERENCIAS

1. Wood HG, Barden RE. (1977) *Annu Rev Biochem* 46, 385-413.
2. Eisenberg MA, Prakash O, Hsiung SC. (1982) *J Biol Chem* 257, 15167-15173.
3. Cronan J Jr. (1989) *Cell* 58, 427-429.
4. Sundaram TK, Cazzulo JJ, Kornberg HL (1971) *Arch Biochem Biophys* 143, 609-616
5. Cazzulo JJ, Sundaram TK, Dilks SN, Kornberg HL. (1971) *Biochem J* 122, 653-661.
6. Chapman-Smith, A., and Cronan J. E. (1999) *TIBS* 24.
7. Leon-Del-Río A, Gravel RA. (1994) *J Biol Chem* 269, 22964-22968.
8. Cronan J Jr. (1990) *J Biol Chem* 265, 10327-10333
9. León-Del Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., and Gravel, R. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci* 92, 4626-4630.
10. Suzuki Y, Aoki Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Niikawa N, Matsubara Y, Narisawa K (1994) *Nat Genet* 8, 122-128.

11. Wolf B. (2001) In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Professional, 3935-3962.
12. Bartlett K, Ghneim HK, Stirk JH, Wastell HJ, Sherratt HS, Leonard JV (1985) *Ann N Y Acad Sci* 447, 235-251.
13. Sherwood WG, Saunders M, Robinson BH, Brewster T, Gravel RA. (1982) *J Pediatr* 101, 546-550.
14. Sweetman L, Nyhan WL, Sakati NA, Ohlsson A, Mange MS, Boychuk RB, Kaye R. (1982) *J Inherit Metab Dis* 5, 49-53
15. Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. (1985) *Am J Hum Genet* 37, 326-337.
16. Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D., and Gravel, R. A. (1999) *Molr Genet Metab* 66, 80-90.
17. Sakamoto O, Suzuki Y, Li X, Aoki Y, Hiratsuka M, Sourmala T, Baumgartner ER, Gibson KM, Narisawa K. (1999) *Pediatr Res* 46, 671-676.
18. Morita, J., Thuy L.P., and Sweetman L. (1998) *Mol Genet Metab* 64, 250-255.
19. Barker DF, Campbell AM (1981) *J Mol Biol* 146, 469-492
20. Buoncristiani MR, Howard PK, Otsuka AJ. (1986) *Gene* 44, 255-261.
21. Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolani R, Porzio O, Sesti G, Fusco A, Mazzanti L, Lauro R, Marlier LN. (1996) *Acta Diabetol* 33, 154-158
22. Chauhan, J. , Dakshinamurti, K. (1991) *J Biol Chem* 266, 10035-10038.
23. Spence, J. T. and Koudelka, A. P. (1984) *J Biol Chem* 259, 6393-9386.
24. Deodhar AD, Mistry SP. (1970) *Life Sci* 9, 581-588
25. Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. (1970) *Can J Biochem* 48, 493-500.
26. Collins JC, P., E., Green, R., Morell, A. G., and Stockert, R. J. (1988) *J Biol Chem* 263, 11280-11283.
27. Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. (2001) *J Nutr* 131, 1909-1913.
28. Bartlett K, Gompertz D. (1976) *Lancet* 2, 804.
29. De La Vega, L. A., and Stockert J.R. (2000) *Am J Physiol Cell Ph.* 279, C2037-2042.
30. Pisarev MA, de Pisarev DL. (1977) *Acta Endocrinol* (Copenh) 84, 297-302.
31. Dupuis L, Leon-Del-Rio A, Leclerc D, Campeau E, Sweetman L, Saudubray JM, Herman G, Gibson KM, Gravel RA. (1996) *Hum Mol Genet* 5,1011-6
32. Yang X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Gibson KM, Kure S, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y. (2000) *J Hum Genet* 45,358-62
33. Wolf B, Hsia YE, Sweetman L, Gravel R, Harris DJ, Nyhan WL.(1981) *J Pediatr* 99.835-46
34. Cherbonnel-Lasserre CL, Linares-Cruz G, Rigaut JP, Sabatier L, Dutrillaux B. (1997) *Int J Cancer* 72, 768-775.
35. Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11466-11470.
36. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. (1997) *J Biol Chem* 272, 10669-10677.
37. Lee YC, Martin E, Murad F (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10763-10768
38. Campeau, E.Gravel, R A. (2001) *J Biol Chem* 276, 12310-12316
39. Ozand PT, Gascon GG, Al Essa M, Joshi S, Al Jishi E, Bakheet S, Al Watban J, Al-Kawi MZ, Dabbagh O. (1998). *Brain*. Jul;121 (Pt 7):1267-79.
40. Mock DM., Quirk, JG, Mock N.I., (2002) *Am J Clin Nutr.* 2002 Feb;75(2):295-9
41. Zempleni J.,Mock,DM.(2000) *Proc Soc Exp Biol Med.*;223(1):14-21
42. Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss G, Pilz B. (1996). *J. Biol Chem* 271 (9):4597-4600.

Semblanza del Dr. Alfonso León del Río.



Es egresado de la Maestría en investigación Biomédica Básica de la Universidad Nacional Autónoma de México (1990). El Dr. León obtuvo su doctorado en Biología y Genética Humana por la Universidad de McGill en Montreal, Canadá (1995) y realizó una estancia postdoctoral en el Howard Hughes Medical Institute de la Universidad de California en San Diego.(1995-1998). Ha recibido numerosos premios:Premios y distinciones: Prix de Excellence de la Provincia de Quebec, Premio Doctoral de la American Society of Human Genetics, Donativo de la Fundación Mexicana para la Salud para jóvenes Investigadores. Donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para jóvenes investigadores.



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

HIPERTEXTO Y APRENDIZAJE EN LA EDUCACIÓN SUPERIOR *Insinuaciones metodológicas para el uso de Atlas TI para el aprendizaje de las ciencias*

Manuel Francisco Aguilar Tamayo¹ e Iliana Cuenca Almazán²

¹Coordinador de Información de la Secretaría Académica en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

www.geocities.com/cibertlan
cibertlan@yahoo.com

²Consultora Privada en Sistemas

ilicuenca@hotmail.com

RESUMEN

Se desarrolla el concepto de hipertexto y se analizan algunas de sus posibilidades de uso y puesta en práctica en el contexto de la educación superior. Se propone de manera particular el uso de *Atlas TI* como una herramienta que permite construir, alrededor de un conjunto de documentos, una estructura hipertextual organizada por conceptos o códigos claves y *notas* que conllevan a la reflexión de los estudiantes. Se propone un esquema general para introducir el *Atlas TI* como herramienta para apoyar las actividades de aprendizaje y organización de ideas de los alumnos.

DEFINICIONES DE HIPERTEXTO

El hipertexto existe necesariamente en el espacio informático, es decir, su soporte o medio es la computadora. Un ejemplo inmediato son las páginas de Internet que están compuestas por información en texto e imágenes que pueden a su vez, ser o contener, *vínculos* o *ligas* que conducen a otras páginas con la misma estructura y/o funcionamiento y que pueden también, remitir a otras páginas, formando así una estructura sin límites precisos, como las raíces del los árboles, sin un límite fijo de crecimiento. Un elemento fundamental para el "funcionamiento" de tales páginas es la acción del lector, personaje que mediante "clíc's" del *mouse* o ratón *acciona* las ligas y decide el camino a seguir, o lo que es lo mismo, *lee el hipertexto*. (Ver Figura 1)

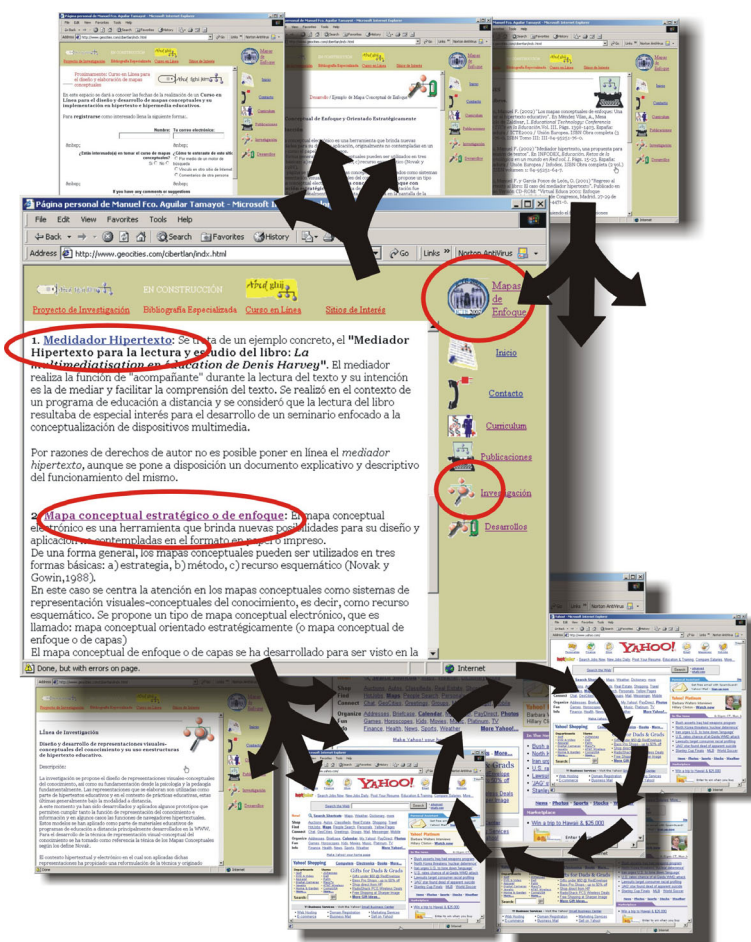


Figura 1. Internet y sus "páginas" tienen una estructura hipertextual en cuanto recuperan elementos de "vínculo" o "hipervínculo" y *unidades de información* o *lexias* representadas por las páginas. El lector define el camino de la *lectura* de acuerdo a las posibilidades presentes en las páginas. Se marcan algunos de los posibles *hipervínculos*. Las flechas ejemplifican algunas de las posibles rutas que puede construir el lector, en un *hipertexto* no todos los vínculos son bidireccionales por lo que en ocasiones no es posible "regresar" a la página de origen.

Sin embargo, *Internet y sus páginas no son en sí* hipertexto, atendiendo a sus características generales puede considerarse que poseen una *estructura hipertextual*, -aquella relación de vínculos entre páginas, existencia electrónica e informática- sin embargo, el *concepto de hipertexto* refiere a características más profundas y complejas que el simplemente hacer *referencias* a otros contenidos e informaciones.

La definición y concepto de *hipertexto* ha cambiado en el transcurso de los años, porque sus posibilidades han dependido del desarrollo tecnológico del *hardware* y del *software*, sin embargo sus componentes básicos como *lexias* y *vínculos* siguen siendo necesarios para explicar *cualquier hipertexto* en cualquier tiempo.

Precisamente con el transcurso del tiempo y los desarrollos tecnológicos la explicación se ha facilitado al mismo tiempo que se ha complicado, por un lado, existe mayor experiencia social y cultural con respecto al *hipertexto*. Un ejemplo de lo anterior se observa en las ya mencionadas páginas de Internet o los programas multimedia, estos medios de información y comunicación ofrecen un referente común a gran cantidad de *usuarios* y *lectores* acerca del *hipertexto*, pero por otro lado, estas mismas experiencias complican el entendimiento del concepto ya que, se trasladan las *experiencias de navegación* y búsqueda de información de manera directa a la idea de *hipertexto*.

A modo de iniciar una conceptualización más profunda del *hipertexto*, podemos decir que el hipertexto, se compone de *unidades de información* que se encuentran relacionadas mediante *vínculos*, los cuales son activados por el *lector* en el proceso de *consulta o lectura*.

EJEMPLOS ANALÓGICOS DEL HIPERTEXTO

Es posible encontrar la *idea del hipertexto* en ejemplos fuera del ámbito informático, un caso sería el *periódico o prensa y las revistas*, ambos medios impresos guardan estructuras similares al hipertexto, se encuentran compuestas por *unidades de información* y es posible realizar una lectura mediante “saltos” o siguiendo los *vínculos* que interesen al lector, es decir, no requieren de una lectura *lineal* como lo exigen por ejemplo, un libro.

El *libro* exige una lectura consecutiva en la medida que se reconoce un *inicio* y un *final*, la explicación por tanto avanza progresivamente y acumulativamente, su desarrollo es *lineal*, de ahí la necesidad de respetar el *orden* del libro. El *periódico o la revista* tienen una estructura que hace posible leer de manera *fragmentada y/o* de manera *no lineal*, es posible también leer en *profundidad o en amplitud* si es que se decide seguir el *vínculo* que conduce al desarrollo de la nota ó, si se prefiere el *vínculo* que conduzca a una nota completamente distinta. (Ver Figura 2)

Otras analogías con respecto al hipertexto las encontramos en la literatura, como ejemplo la novela de Milorad Pavic, *Diccionario jázaro* (1), el mismo autor la define como *novela léxico*. En esta novela Pavic ofrece la historia de un mismo pueblo de acuerdo a tres distintas fuentes narrativas: El “Libro Rojo”, proveniente de las fuentes cristianas a cerca de “la cuestión jázara”, el “Libro Verde” narrativa cuyas fuentes son islámicas, y el “Libro Amarillo” cuyo origen es judío. Cada uno de los libros contiene en un orden *alfabético unidades de información o*

lexias, a manera de “diccionario”, de tal forma que es posible comenzar la lectura de la novela en cualquier libro y en cualquier apartado, no existe un *relato lineal* de los acontecimientos.



Figura 2. Representación de una revista o periódico, ambas *formas de estructura y acceso a la información* tienen elementos comunes como son: *no-linealidad, unidades de información y vínculos*. La lectura en ambos medios puede hacerse por “partes” –de manera fragmentada-, la portada presenta vínculos o referencias que de seguirse implica “saltar” a una página no consecutiva, en la mayoría de las ocasiones en este tipo de publicaciones la lectura no se realiza secuencialmente ya que la información se encuentra segmentada.

De manera similar al caso anterior, ocurre con la novela de Julio Cortázar, *Rayuela* (2), en este caso, la novela ofrece capítulos cuyos títulos son *números*, y la lectura de la novela se puede iniciar y terminar en cualquiera de los capítulos; es posible también hacer una lectura tradicional, es decir de capítulos consecutivos o bien, el mismo autor ofrece distintas posibilidades de lectura recomendando al final de algunos capítulos el orden de lectura siguiente.

Un aspecto a destacar en los ejemplos literarios anteriores es que, ambos rompen con la *linealidad del libro* y con la idea del *principio* y el *final* de la narrativa, las historias comienzan al momento que da comienzo la lectura, y terminan en el momento que el lector abandona la lectura. Adicionalmente, cada lector construirá de acuerdo a su interés un *trayecto particular*, distinto al de los otros, por lo que de manera estricta no habría lector que lea la misma novela pues los capítulos leídos serán distintos; el orden de los mismos y por tanto, también el *relato* serían distintos.

Como un último ejemplo podría mencionarse *La Biblia* cuyas características de organización y estructura han sido utilizadas para ejemplificar a la estructura de información del hipertexto. La forma en que se dividen los *párrafos* se acerca al concepto de *lexias*, que a este momento podríamos definirlos como *unidades mínimas de información*, y los párrafos o *lexias* son a su vez organizados en *capítulos*, de manera progresiva y general los capítulos son ordenados en libros, de manera tal que es posible *acceder* a una *información específica* de manera *directa*.

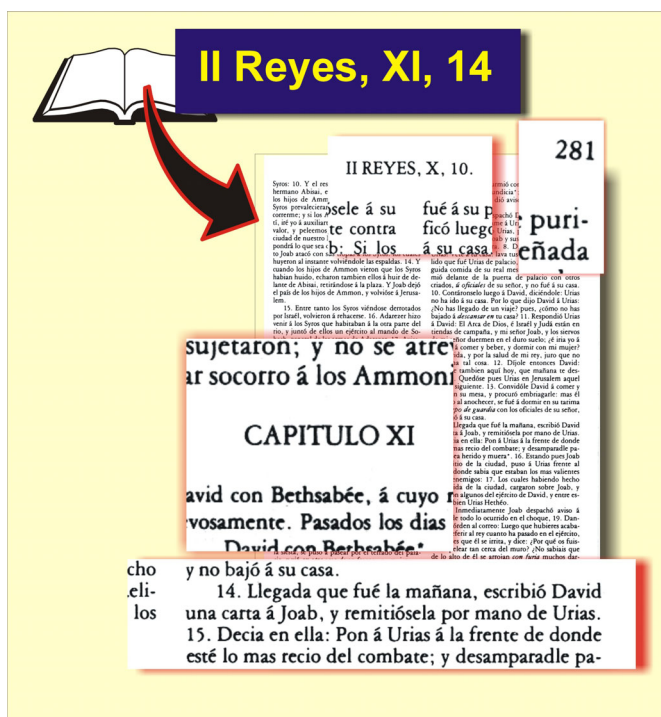


Figura 3. Las “secciones” de la Biblia (Libros, Capítulos y versículos) a manera de “coordenadas” es posible localizar un fragmento de manera directa.

Los ejemplos mencionados permiten entender que el *concepto* de *hipertexto* no carece de antecedentes socioculturales, es decir, ciertas características del hipertexto pueden encontrarse en obras cuyo medio o soporte no es ni informático ni hipertextual, sino lineal, tal es el caso del texto escrito e impreso bajo el formato de libro. Sin embargo, el *hipertexto* como tal, requiere de un soporte informático cuyo funcionamiento sea *hipertextual*, es decir, el medio de soporte es parte mismo del hipertexto y éste parte del *medio*. El hipertexto desde una perspectiva teórica puede construirse y analizarse “sin la tecnología”, sin embargo un hipertexto en concreto necesariamente implica de manera conjunta, *información* y *estructura* así como las posibilidades de acceso e interacción del usuario y/o lector.

EL CONCEPTO DE HIPERTEXTO

El término de *hipertexto*, de acuerdo a Rada (3) está relacionado al término de “*hyperbolick space*” (espacio hiperbólico), dicho termino habría sido introducido en el año de 1704 y habría adquirido popularidad hasta el siglo XIX gracias a los trabajos del matemático F. Klein. Rada menciona que Klein utilizó el término *hyperspace* (hiperespacio) para describir una geometría de muchas dimensiones.

Continuando con el análisis de Rada, el autor vincula la idea de *multidimensionalidad* con el concepto de T. Nelson de *hipertexto*, de esta manera se reconoce que, los procesos mentales humanos ocurren en espacios multidimensionales y que por tanto, la representación de conocimientos se puede dar en la multidimensionalidad del texto, es decir en el *hipertexto*. Debe decirse que fue T. Nelson quien aplicara el término de *hipertexto* en 1967.

Si bien el término de *hipertexto* puede adjudicarse a Nelson, el *concepto o idea explícita* de un sistema y estructura de información hipertextual surge de Vannevar Bush (4), la formación del concepto de Bush se habría dado en el año de 1935, y en el año de 1945 que publicado en un artículo del propio Bush titulado “*As We May Think*”, en él, se proponía un “dispositivo” o sistema que permitiera administrar de manera “mecanizada” libros, notas, registros, comunicaciones, de tal forma que se facilitara el acceso inmediato a toda la información relacionada, de tal manera que este sistema potenciaría y complementaría la memoria humana.

El desarrollo posterior del concepto de *hipertexto* se encuentra ligado al desarrollo de sistemas para *autoría hipertextual* y sistemas que permitieran la interconectividad entre computadoras, es decir, las *redes* y, de manera simultánea el soporte para la colaboración entre los usuarios. Por una cuestión de espacio y propósito de este documento no serán abordados cada una de estas experiencias, y se presentará un concepto más general de hipertexto de acuerdo a las tendencias dominantes de los actuales sistemas de autoría de hipertextos.

Parece entonces adecuada la definición de *hipertexto* propuesta por Horn (4):

“Hipertexto: La existencia de una *liga* o *lugar* en cualquier parte de un texto almacenado en la computadora que *vincule* dicho documento con otro lugar en el mismo o diferente texto, el *acceso* será rápido y facilitado por *botones* o cualquier otra *herramienta* para una *navegación no-lineal*. Sugerido por primera vez por Vannevar

Bush en 1945 y término¹ acuñado por Theodor Nelson en 1965. Primera vez *puesto en práctica* entre 1962 y 1965 por Douglas Engelbart”.

Actualmente los sistemas incluyen tanto texto como otros tipos de información, por lo que la definición de *hipermedia* ayudaría a complementar el concepto de hipertexto, nuevamente Horn (4) propone lo siguiente:

“Hipermedia. una extensión de la idea de *hipertexto* que incorpora otros componentes tales como: video, ilustraciones, diagramas, voz y animación, así como imágenes generadas por computadora. Generalmente un autor crea las *ligas* o *links* entre los distintos medios; texto, gráficos, diagramas, fotografías, video, música, películas u otros medios. El autor podría ser el *usuario* o el *aprendiz*”.

¹ La traducción de la definición de Horn es abierta y se han hecho notar términos que hoy son parte del debate a cerca del hipertexto y se han incluido algunos términos más cercanos a dichos debates, que en la época de Horn no cobraban popularidad.

La definición de *hipermedia* ofrece al final un elemento de especial interés para el diseño de hipertextos educativos, en donde se puede jugar el papel del *lector*, a la vez *usuario*, pero sobre todo *aprendiz* y con la posibilidad adicional de ser también *autor* de esta herramienta.

Desde una perspectiva más preocupada por el *lector* del hipertexto García Aretio (5) ofrece la siguiente definición (se han hecho notar con cursivas algunos conceptos fundamentales sobre las características del hipertexto):

“(…)El *hipertexto* consiste en una *red de información* textual con tecnología informática y de naturaleza *no secuencial* (propia esta de los textos impresos), obligando al *destinatario* a desarrollar un *pensamiento*, también, *no lineal*. El *hipertexto* se basa fundamentalmente en *nodos* (*unidades de información y nexos, enlaces o hipervínculos, unión entre nodos*), que al relacionarse, forman una red que posibilita la *navegación* a través de diferentes itinerarios”.

En el mismo sentido Burbule y Callister (6) comentan lo siguiente:

“(…) en la medida en que los sistemas hipertextuales incorporan la posibilidad de imponer modelos organizadores para la información existente, así como la de fomentar la capacidad del usuario para imaginar y crear nuevos modelos, el hipertexto pone en tela de juicio las distinciones absolutas entre *acceder* al conocimiento y *generarlo*”.

Como se observa en la última parte de la definición anterior, se considera que, el *lector* del hipertexto tiene la posibilidad de *escribir o participar* en la construcción del mismo, esto dependerá del *modelo* de hipertexto del que se trate. En algunos casos, el hipertexto podrá ser *abierto* por lo que todo usuario podría ser *lector/escritor*. Un modelo distinto a éste, es decir cerrado, podría reservar la *escritura* a un solo autor o grupo de autores, restringiendo en este caso la participación de los demás *usuarios* como solamente *lectores*. Es posible pensar también en la producción de un *hipertexto* generado a partir de la *colaboración* y la *multi-autoría* que, una vez concluida, podría pasar a ser un formato abierto o cerrado como los ya mencionados.

ELEMENTOS DEL HIPERTEXTO

Considerando el *hipertexto* como un “método para crear o acceder al texto no-lineal” (7) y para fines de análisis, se pueden reconocer en el *hipertexto* tres elementos: los *nodos o lexias*, los *vínculos o ligas* y el *interfaz* de navegación.

Los *nodos o lexias*, son “núcleos de contenido” (8) o unidades de información que podrán contener información a manera de texto, información gráfica o sonora. De acuerdo a Barthes las *lexias* pueden ser consideradas también como *unidades de lectura* (9):

“La *lexia* comprenderá unas veces unas pocas palabras y otras algunas frases, será cuestión de comodidad: bastará con que sea el mejor espacio posible donde

se puedan observar los sentidos; su dimensión, determinada empíricamente a ojo, dependerá de la densidad de las connotaciones (...)" (9).

Por tanto, un *nodo* o *lexia* será una "unidad" en cuanto contenga significados suficientes para dar un sentido y que sea coherente por si misma, es decir sea una *unidad de significado*. Por ello, una *lexia* podría tener la forma de un enunciado, un párrafo o un conjunto de párrafos cuya significatividad no requiera de ninguna otra *lexia*.

Con respecto a los *vínculos* o *ligas* estos son las *relaciones* que se establecen entre los *nodos* o *lexias* y que pueden ser establecidas en distintos momentos y bajo distintas perspectivas. Es posible que los vínculos sean marcados por el *autor* del hipertexto, o bien por el *lector* del mismo, ambos por un criterio *semántico* (8) o *asociativo* (7) o como parte de una *estrategia de lectura* (10). Ya que, como se ha mencionado, el *hipertexto* tiene una existencia informática, es decir, debe ser soportado por la computadora, *la visualización, selección y acceso a las lexias* requieren de *vínculos* que necesitan de una *activación* por parte del lector, de ahí la necesidad de un *interfaz* que ponga a disposición del usuario "una serie de dispositivos, tanto físicos como lógicos que permiten interactuar de una manera precisa y concreta con un sistema" (11), es decir con el hipertexto.

Dadas las formas actuales de presentación del hipertexto puede considerarse que el *interfaz* del hipertexto o hipermedia es *gráfico* y cuya activación se realiza mediante la selección y acción del *mouse* o de alguna tecla o botón. El aspecto visual del interfaz *facilita* comprender o representar la estructura o contenidos del hipertexto ayudando al *lector/usuario* a tener el acceso a la información y la recuperación de esta. Para algunos autores, como el caso de Michel Joyce (12) el "hipertexto es, antes que nada, una forma visual". (Ver Figura 4)

EL HIPERTEXTO EN EL CONTEXTO DE LA EDUCACIÓN SUPERIOR

La estructura hipertextual se encuentra implícita en todo *software* que contenga, administre o recupere información para ser presentada al *usuario*, de tal forma que sea comprensible y útil precisamente para el usuario/lector/aprendiz. Sin embargo, en lo que respecta para fines educativos, el que un *software* cumpla con un "funcionamiento" hipertextual no basta para *provocar* de ciertos aprendizajes sobre todo aquellos *aprendizajes* deseables curricularmente.

La idea original del *hipertexto* pretende *facilitar* la organización y acceso a la información, bajo el supuesto de que es la recuperación de información y su disposición la característica principal del *pensamiento*, a partir de ello ciertas perspectivas psicológicas han buscado explicar el *aprendizaje humano* en términos de *memoria* y *asociación*, y *recuperación de conceptos e informaciones*. En aproximaciones de años más recientes, se advierte que no necesariamente es así, "aunque podemos afirmar que el funcionamiento del hipertexto trata de asemejarse al funcionamiento de la mente, ello no implica necesariamente lo contrario" (13). Por ello el implemento del *hipertexto* como estrategia de enseñanza y aprendizaje requiere de tomar a consideración otros elementos más que la simple elaboración de documentos hipertextuales.

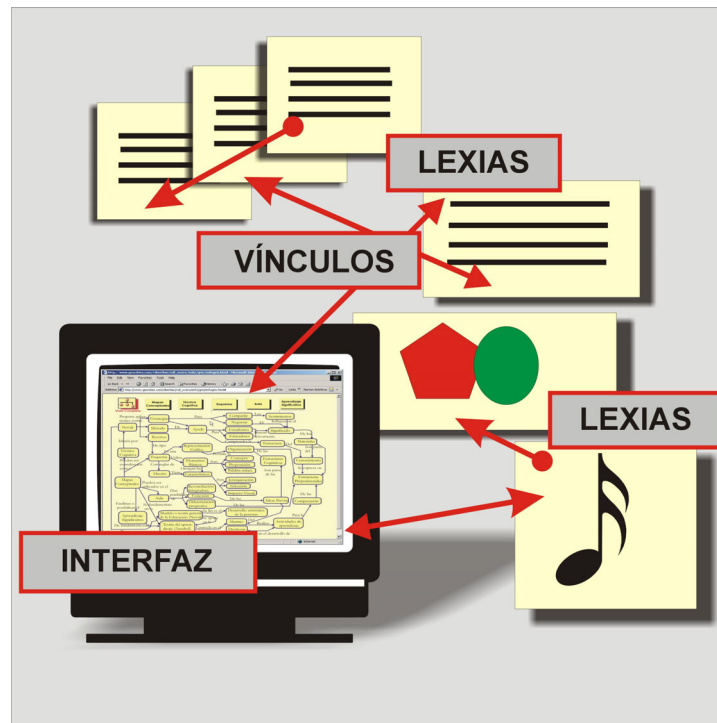


Figura 4. Elementos del hipertexto: Interfaz, lexias o nodos, vínculos, todos ellos en conjunto “hacen” el *hipertexto*.

La experiencia general de los aprendices con respecto al *hipertexto* se ubica en un plano de consulta y lectura, las formas dominantes de hipertexto bajo el nombre de *multimedia interactivos*, que no ofrecen estructuras abiertas, han facilitado la *consulta*, pero no la colaboración (14). De manera similar sucede el fenómeno de *Internet* que juega un papel, en el cual se permite la consulta y la búsqueda de información pero difícilmente conforma espacios de construcción hipertextual en colaboración, talvez algunos tímidos ejemplos podrían observarse en algunos *foros de discusión*. El concepto de *hipertexto* en la experiencia e idea de los usuarios, dista de aquella idea de ser *escritor y lector* de manera simultánea además de que otros participen también como *escritores y lectores* del texto que se construye.

Los usos del *hipertexto* en la educación son variados y dependerán de la perspectiva que se asuma acerca de aquello que es: *el aprendizaje, la enseñanza, la evaluación de lo aprendido*, los tipos de contenidos o conocimientos que se pretenden enseñar y aprender y, la aplicación o uso que se supongan para tales conocimientos y aprendizajes. Mencionadas solamente algunas de las variables del ámbito de la enseñanza y aprendizaje, podrá el lector formarse una idea de lo complejo y extenso que resultaría elaborar una descripción o guía de metodologías y estrategias para el uso del hipertexto sin considerar además los ámbitos temáticos y disciplinarios que podrían plantear particularidades a considerar. Adicionalmente a esto, existe la gran diversidad de herramientas hipertextuales con sus características

particulares. Por ello, se ha recurrido a una perspectiva que ofrece la posibilidad de ordenar y ubicar el uso de la tecnología del hipertexto de acuerdo al tipo de aprendizaje que se pretende provocar y en las estrategias que deberán utilizarse para alcanzar dicho aprendizaje. El enfoque que se presenta es el de Jonassen, Peck y Wilson (15).

Estos autores presentan una descripción de las distintas formas en que puede ser considerada la tecnología en la *promoción de los aprendizajes*, esta perspectiva rechaza de entrada una concepción de la tecnología como medios para la “entrega” de información y se preocupa por un uso de la tecnología como *facilitadoras y provocadoras de los aprendizajes* que permitan la *construcción de conocimiento* por parte de los aprendices. Los cinco papeles propuestos para la tecnología son:

- “Tecnología como soporte para la construcción del conocimiento. Para representar las ideas de los aprendices, sus creencias y conocimientos. Para producir de manera organizada multimedias y bases de datos por parte de los estudiantes.”
- “Tecnología como soportes para la información para la exploración de conocimientos y para soportar el aprendizaje por construcción. Para acceso a la información necesaria, para comparar perspectivas, creencias y visiones del mundo”.
- “Tecnología como un contexto y soporte para aprender haciendo. Para representar y simular de manera significativa problemas reales, situaciones y contextos, para representar creencias, perspectivas, argumentos e historias de los otros para generar un espacio seguro y controlado para la generación de problemas modelo y la reflexión de los aprendices”.
- “Tecnología como un medio social para soportar el aprendizaje mediante el diálogo. Para la colaboración con otros, la discusión, argumentación y la construcción de consensos con los miembros de la comunidad”.
- “Tecnología como par intelectual. Como soporte del aprendizaje por reflexión: para ayudar a los aprendices a representar de manera articulada lo que ellos saben, para reflejar lo que han aprendido y cómo lo han aprendido. Como soporte de la negociación de significados y la construcción de representaciones significativas, para soportar el aprendizaje significativo.” (15) (Págs. 13 y 14)

Si bien estos autores plantean lo anterior en referencia al uso de la tecnología en general, los puntos anteriores son válidos en lo que respecta al *hipertexto* y al *hipermedia*.

Un concepto aún más específico para comprender el papel de las tecnologías en el aprendizaje es el propuesto por Jonassen: *herramientas mentales o herramientas cognitivas* (16); este enfoque supone que existen diversas formas de pensamiento que se expresan o desarrollan en diversas *actividades* y en las *representaciones* elaboradas por los propios estudiantes. Jonassen define de la siguiente forma las *herramientas mentales*:

“Las herramientas mentales son herramientas computacionales y/o informáticas y ambientes de aprendizaje que han sido adaptadas o desarrolladas para funcionar como pares intelectuales del aprendiz, su función es la de promover y facilitar el pensamiento crítico y el aprendizaje de tipo superior (...) las herramientas

mentales son los instrumentos para la amplificación y reorganización de las capacidades cognitivas". (16, Págs. 9 y 10).

Jonassen continua desarrollando su concepto y explica que, las *herramientas mentales* como un *concepto*, "representan un acercamiento constructivista para el uso de la computadoras y cualquier otra tecnología, ambiente, o actividad que promueva en los aprendices representar, manipular o reflexionar acerca de lo que saben (...)". (16, Pág. 10).

Aprender con *herramientas mentales* requiere por parte del aprendiz una mayor conciencia de sus propias maneras de aprender y de su propia responsabilidad en el aprendizaje, exige también una mayor conciencia sobre el dominio del área de conocimiento particular, es decir, de los contenidos que se pretenden aprender.

ATLAS TI, UN POSIBILIDAD PARA APRENDER MEDIANTE LA CONSTRUCCIÓN DE HIPERTEXTO

La *elaboración* de hipertexto puede asumirse de distintas maneras, una de las formas más recurridas es la elaboración de páginas de Internet (17), otra manera de concebir la construcción de hipertexto es mediante la construcción de un hipermedia o multimedia. La dificultad de estas propuestas se encuentra en que, para el desarrollo de este tipo de proyectos, se requieren de elementos de programación y alguna metodología que permita llevar a cabo el *sistema* como un producto terminado. La atención queda desviada entonces al *desarrollo* o incluso al *diseño*, dichas actividades corresponden a un especialista y no a un *maestro o aprendiz*. La atención del maestro y aprendiz debería estar centrada en la *construcción del conocimiento soportada por tecnología y mediante el uso de herramientas mentales o cognitivas*. De ahí que la *elaboración de una página o sistema* no equivale a la *construcción de un hipertexto*.

Existen diferentes propuestas de software de autoría hipertextual, algunos enfocados al desarrollo de obra literaria, algunos otros más cercanos al desarrollo de *sistemas* hipertextuales, y unos más que permiten la construcción o elaboración de un discurso hipertextual y que apoyan la construcción de conocimiento mediante la representación en estructuras hipertextuales. Es dentro de esta última modalidad, en la que podemos ubicar la herramienta de *Atlas TI*, sin olvidar por supuesto su papel como *herramienta mental*, lo que implica que la atención se centre en las actividades de aprendizaje y en el establecimiento de *nodos y vínculos* y los procesos *metacognitivos*² (18, 19) así como en una perspectiva de *solución de problemas* que se encuentra implícita en la lectura y elaboración de hipertexto (20).

El desarrollo de *hipertexto* mediante el uso de *Atlas TI*, requiere de la *organización de ideas e información* (21) para que éstas puedan ser escritas o representadas como contenidos

² De manera general se puede definir la *metacognición* como un proceso que regula las tareas y estrategias utilizadas por los aprendices en el proceso de aprendizaje, es el *conocimiento* sobre el *conocer*. El *metaconocimiento* puede ser, aquél que tiene el aprendiz sobre si mismo, conocimiento acerca de la *actividades y técnicas de aprendizaje* y el *conocimiento* a cerca de las *estrategias* utilizadas para resolver problemas.

de los *nodos del hipertexto*. La organización de las ideas permite procesos más complejos como son las *inferencias, analogías, resolución de problemas (16)* entre otros; *Atlas TI* permite hacer explícita la asociación de ideas y su organización, tanto por su estructura hipertextual que hace posible la consulta, lectura o modificación de los nodos así como por la *visualización* que se tiene de las relaciones establecidas.

DESCRIPCIÓN DEL ATLAS TI

El *Atlas TI*, es una herramienta que permite desarrollar, alrededor de documentos (en varios formatos como: fotografía, gráficos, imágenes, video, audio o texto), una *estructura interrelacionada* de notas y reflexiones sobre el análisis de los documentos seleccionados. *Atlas TI* permite utilizar las *interrelaciones* entre notas, reflexiones y los documentos para crear *ligas o vínculos* entre ellas, es decir, ayuda a elaborar *nodos y a vincularlos*, construyendo progresivamente una estructura hipertextual. (Ver Figura 5)

Cabe aclarar que la descripción que se ofrece se refiere a los *procesos y actividades* que se dan lugar en la utilización del *Atlas TI* en el ámbito educativo y no se abordarán aspectos de "funcionamiento" del *software*, esto último implicaría la presentación de un *manual de operación* del *software* fuera de lugar para las intenciones de este documento, sin embargo *Atlas TI*, viene acompañado por manuales, tutoriales multimedia, presentaciones y demás documentos para su uso y aprendizaje, adicionalmente en el sitio de Internet se pueden encontrar más referencias y documentos de apoyo (www.atlasti.de), para una idea general consúltese la Figura 5 en este capítulo.

Atlas TI es un *software* utilizado originalmente para el análisis cualitativo de datos pero su uso se ha diversificado y es utilizado en una gran variedad de actividades de investigación que no guardan relación directa con la metodología del análisis cualitativo. Algunos ejemplos de su uso en distintas áreas son: antropología, educación, adquisición de conocimiento (usos para el aprendizaje), literatura, sociología, teología, criminología, etnografía, derecho, administración, ciencias sociales, lingüística, economía, historia, psicología y desarrollo de *software* por mencionar algunas; existen aplicaciones documentadas de su uso en: medicina, arquitectura, psicoterapia, artes y edición de publicaciones, entre otros. Algunos ejemplos y ligas de interés pueden encontrarse en la sitio de Internet del programa. (www.atlasti.de).

La principal característica de *Atlas TI* es su *hipertextualidad*, dicha característica permite la construcción de análisis de información mediante la relación de distintos textos, imágenes, video y audio. La relación gira alrededor de un tema o problema que busca ser comprendido a partir del análisis de documentos, en ese sentido el *hipertexto* que se elabora mediante el *Atlas TI* funciona como una *herramienta de comprensión y de creación de representaciones de conocimiento (13)*.

Los alcances de una herramienta como *Atlas TI* estarán determinados, entre muchos otros factores, por: el contexto de su uso, es decir la *tarea y actividades* de aprendizaje y si estas son significativas para los aprendices. También se requiere de ciertas nociones acerca de lo que es un hipertexto y cómo funciona, ya que lo que se construye en el *Atlas TI* es precisamente eso,

un *hipertexto*. Otro factor a considerar es el conocimiento que se tenga sobre el mismo programa informático, la capacitación que tenga con respecto a su uso facilitará otras actividades directamente ligadas al aprendizaje de los contenidos propuestos. Se ha demostrado que el conocimiento que se tenga sobre las herramientas de trabajo es crucial para el desempeño de actividades que requieren de estas (10 y 19).

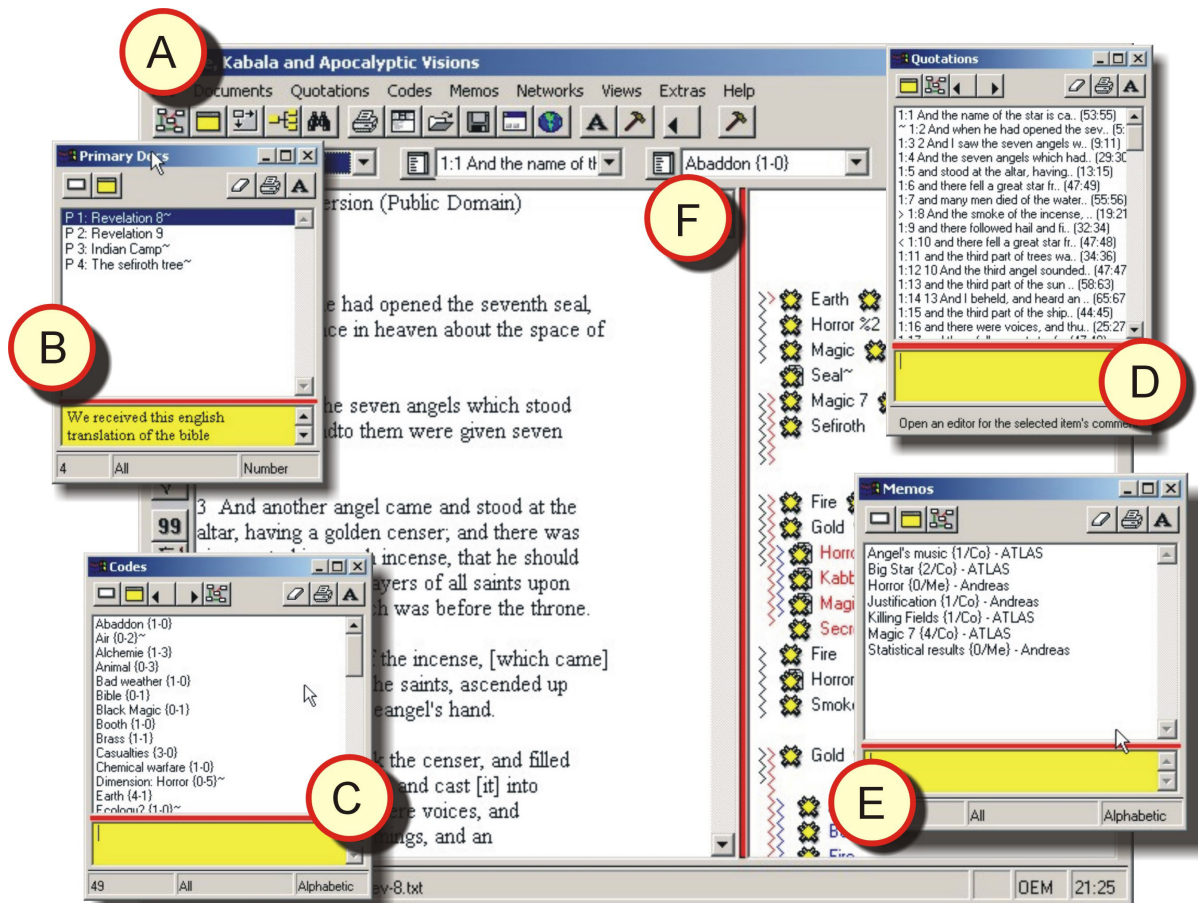


Figura 5. Representación general del funcionamiento del Atlas TI. (A) Es la ventana principal de ATLAS TI, es el *Interfaz* que permite, leer/escribir el *hipertexto*. (B) Es la ventana de “Documentos Primarios” permite seleccionar y presentar los documentos a analizar. (C) Ventana de Códigos en ella se muestran las categorías de análisis o conceptos claves, al seleccionarlos muestra los *vínculos* que se han establecido con el texto, los segmentos de texto y los “memos” o notas de análisis realizados por el alumno/usuario. (D) Ventana de “citas” o segmentos de documentos, al accionarlas muestran fragmentos de los documentos que se consideraron de importancia para el análisis. (E) Ventana de “memos” o notas, muestran todo lo escrito por el alumno/usuario, al activarlos se muestran los “códigos” aplicados, los segmentos de texto. Todas estas ventanas se encuentra *vinculadas* y su activación permite realizar una lectura *hipertextual* entre todos los elementos.

Atlas TI es una herramienta para *construir conocimiento y para expresarlo o representarlo de manera hipertextual*, para hacer esto, debe contarse con claridad en los objetivos y razones para su uso; esto depende en gran parte de la organización de las *actividades* para alcanzar *los objetivos del aprendizaje*, éstos últimos deben ser claros para el *aprendiz* pues será éste, quien establecerá estrategias y seleccionará técnicas que podrán ser apoyadas en mayor o menor grado por el *Atlas TI*. Como se ha mencionado, la *responsabilidad de aprender* recae en *el que aprende*. Por otra parte, es fundamental, por parte de los docentes encontrar métodos de evaluación que tomen en consideración los trabajos organizados alrededor de la herramientas, de otro modo el uso del *Atlas TI* parecería artificial e innecesario.

Las razones para utilizar una herramienta para el desarrollo de *hipertexto* puede justificarse a partir de variadas investigaciones que demuestran su efectividad para provocar determinados aprendizajes, de igual forma, existen investigaciones que pondrían evidencias que tales efectos no siempre son tan positivos para el aprendizaje, entonces, ¿por qué proponer el uso del hipertexto en la educación superior?. La respuesta evidentemente no es simple ni total, pero si se busca una razón podemos dar la siguiente: las *nuevas tendencias* en la forma de *trabajo, investigación y representación del conocimiento* implican cada vez más el uso de las *nuevas tecnologías*, el uso de estas va más allá de una pericia técnica, implican el conocimiento de nuevas formas de relación del investigador con su objeto de estudio, nuevas formas de *colaboración* para la *construcción de conocimiento*, nuevas formas de *comunicar el conocimiento* e incluso de validarlo, y por supuesto *nuevas formas de aprender y explicar lo que se aprende*. De ahí la relevancia y pertinencia de integrar tecnologías como el *hipertexto* como parte de la formación de los estudiantes.

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE ACTIVIDADES DE APRENDIZAJE UTILIZANDO ATLAS TI

Se presupone que cualquier tipo de implementación de *Atlas TI* implica tanto para maestro y alumno, el conocimiento operativo del software, por lo cual, antes de cualquier tipo de actividad, debe contemplarse el aprendizaje de esta herramienta a un nivel descriptivo, aprendizajes más profundos y específicos de manejo de *Atlas TI* dependerán de las actividades o propósitos de enseñanza y aprendizaje en el contexto de un programa educativo de nivel superior. Debe distinguirse entonces dos objetivos, uno es el que se refiere al *aprendizaje de la herramienta*, y el otro que se refiere a *los aprendizajes de contenidos del curso* que son *facilitados o apoyados mediante el uso de Atlas TI*.

Difícilmente podría establecerse una forma única de utilizar *el Atlas TI*, su puesta en práctica depende de una gran cantidad de condiciones que van de aspectos profesionales de los docentes, la materia que se imparte, el área de conocimiento, y hasta condiciones institucionales de apoyo o infraestructura, por mencionar las más generales.

Para cerrar este trabajo, se presenta un esquema general para orientar el uso del Atlas TI como herramienta mental de apoyo para las actividades de aprendizaje de los alumnos.

ESQUEMA GENERAL PARA LA INTRODUCCIÓN O USO DEL ATLAS TI EN LAS ACTIVIDADES Y TAREA DE APRENDIZAJE

- 1) Se requieren de una o dos sesiones instructivas acerca del uso de Atlas TI, esta se puede dar en dos partes, en la primera se explican el funcionamiento de las herramientas básicas, en una segunda parte mediante la participación del grupo, se desarrolla un ejemplo.
- 2) Debe establecerse un proyecto explícito a desarrollarse en *Atlas TI*, para ello se requiere de:
 - a. Establecer el tema o problemática.
 - b. Identificar los documentos fuentes válidas a utilizar, estos pueden ser: texto, imágenes, vídeo, audio, fotografía, gráficos, tablas y esquemas entre otros.
 - c. Integrar una *unidad hermenéutica* mínima de trabajo, es decir, los documentos que serán utilizados.
 - d. Discutir y establecer las categorías de análisis de los problemas, es decir, los conceptos claves a desarrollar, que están presentes en los documentos seleccionados y que permiten explicar y resolver el problema.
 - e. Debe considerarse que el trabajo con Atlas TI permitirá producir un *documento hipermédia*, deberán establecerse criterios de entrega, presentación y evaluación de dicho documento.
 - f. Reglamentar el trabajo en equipo, cada usuario deberá ingresar al sistema con su propia clave para que, en caso necesario sea posible conocer los aportes particulares de cada uno de los integrantes del equipo.
- 3) En caso de que se considere el uso de Atlas TI como una metodología de trabajo durante todo el curso, podrán establecerse subproyectos, cada uno de ellos deberá concluirse y podrán integrar un *portafolio (22)* al final del curso que podrá ser utilizado con fines de evaluación.

A continuación se presentan algunas preguntas que permiten reflexionar acerca de ciertas condiciones que deben considerarse si se desea organizar las tareas y actividades con el apoyo del Atlas TI. Partimos del supuesto que la *herramienta* de Atlas TI estaría disponible para alumnos y profesores.

- El profesor debe tener claro el *porqué* y *para qué* de utilizar el *Atlas TI*, plantearse algunas de las siguientes preguntas pueden servir para determinar el uso preciso y la finalidad así como las condiciones favorables para el uso del software, en ciertas preguntas que requieran de una respuesta de *si* o *no*, la respuesta afirmativa indicará que existen mejores condiciones o posibilidades para el uso de Atlas TI.
 - ¿Qué tipos de aprendizaje se pretenden promover?
 - ¿Qué tipo de actividades estimulan los aprendizajes que se desean? (¿búsqueda bibliográfica de información? ¿desarrollo de un proyecto? ¿solución de problemas?).
 - ¿Cuál es la mejor forma de evaluar si se han alcanzado los objetivos de aprendizaje?
 - ¿Conoce el docente el uso de la herramienta y la encuentra realmente útil para provocar u organizar los trabajos y actividades y así estimular el aprendizaje?

- ¿ el docente ha propuesto de manera explícita el desarrollo de un proyecto que requiera del uso del Atlas TI?
 - ¿Ha orientado al alumno acerca de las fuentes de información a utilizar en el desarrollo del proyecto?
 - ¿Se han discutido y establecido las principales categorías de análisis a desarrollar en el Atlas TI?
- El alumno debe tener claro el *porqué* y el *para qué* del uso del Atlas TI. Las preguntas que se plantean a continuación permiten establecer las bases para dar comienzo a trabajar con Atlas TI, existen preguntas que pueden ser contestadas con un *sí* o con *no*, en este caso, cuando la respuesta sea *sí* las condiciones son más favorables para el desarrollo de actividades con el Atlas TI.
 - ¿Qué tipo de trabajos serán desarrollados en el Atlas TI?
 - ¿Dónde y cómo será utilizado el Atlas TI?
 -
 - ¿El trabajo que desarrolle en Atlas TI será considerado para la evaluación de la materia?
 - ¿Se considera la capacitación del alumno para el uso del Atlas TI de tal forma que pueda concentrarse en las actividades de aprendizaje de la materia y no en los aspectos técnicos del *software*?
 - ¿Ha presentado el alumno un proyecto concreto de indagación o investigación que implique el uso del Atlas TI?
 - ¿Tiene el alumno los documentos necesarios para analizarlos mediante el Atlas TI?
 - ¿Conoce el alumno las principales categorías de análisis que le permitan desarrollar su proyecto en Atlas TI?

REFERENCIAS

- 1 Pavic, Milorad (1989) *Diccionario jázaro*. (Ejemplar Masculino). Anagrama. Barcelona.
- 2 Cortázar, Julio () *Rayuela*. Plantea. España.
- 3 Rada, Roy (1991) *Hypertext: from Text to Expertext*. McGraw-Hill. UK.
- 4 Horn, Robert E. (1989) *Mapping Hypertext*. Lexington Institute. USA.
- 5García Aretio, Lorenzo. (2001) *La educación a distancia. De la teoría a la práctica*. Ariel Educación. España.
- 6 Burbules, Nicholas C. Y Callister, Thomas A. (2001) *Educación: Riesgos y Promesas de las Nuevas Tecnologías de la Información*. Granica. España.
- 7 Kommers, P. (1996) "Definitions". Págs. 1-11. En: Kommers, Piet, Grabinger, S. Y Dunlap, J. C. *Hypermedia Learning Environments*. Lawrence Erlbaum Associates. USA.
- 8 Colorado Castellary, Arturo (1997) *Hipercultura visual. El reto hipermidia en el arte y la educación*. Editorial Complutense. España
- 9 Barthes, Rolan (2001) *S/Z. Siglo XXI*. México.

- 10 Rouet, Jean-François y Levone, Jarmo J. (1996) "Studying and Learning With Hypertext: Empirical Studies and Their Implication". (Págs. 9-23) En: Rouet, J-F., Levone, J. J., Dillon, A. Y Spiro, R. J. (editores) *Hypertext and Cognition*. Lawrence Erlbaum Associates. USA.
- 11 Moreno Muñoz, Antonio (2000) *Diseño ergonómico de aplicaciones hipermedia*. Paidós. España
- 12 Joyce, Michel (1995) *Of two Minds. Hypertext, Pedagogy and Poetics*. The University of Michigan Press. USA.
- 13 León, José A. (1998) "La adquisición de conocimiento a través del material escrito: texto tradicional y sistemas de hipertexto". Págs. 65-86. En: Vizcarro, C. Y León, J. A. *Nuevas Tecnologías para el aprendizaje*. Pirámide. España.
- 14 Harasim, L., Hiltz, S. R., Turoff, M. Y Teles, L. (2000) *Redes de aprendizaje*. Gedisa / Edicions de la Universitat Oberta de Catalunya. España.
- 15 Jonassen, D. H., Peck, K. L. Y Wilson, B. G (1999) *Learning with Technology: A Constructivist Perspective*. Merrill Prentice Hall. USA.
- 16 Jonassen, David H. (1996) *Computers as Mindtools for Schools*. Merrill Prentice Hall. USA.
- 17 Reyes Méndez, Jorge J. (2001) "La construcción de material didáctico hipertextual como herramienta de apoyo al proceso de enseñanza-aprendizaje". Págs. 235-266. En: Juárez Oropeza, M.A., Pardo Vázquez, J. P., Arenal Mena, I. P., Cea Bonilla, A. Y Piña Garza, E. (editores) *Mensaje Bioquímico*. Vol. XXV. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- 18 Oostendorp, Herre van (1996) "Studying and Annotating Electronic Text". Págs. 137-146. En: Rouet, J-F., Levone, J. J., Dillon, A. Y Spiro, R. J. (editores) *Hypertext and Cognition*. Lawrence Erlbaum Associates. USA.
- 19 Andersen, Margaret, D. (2001) "Individual Characteristics and Web-Based Courses". Págs. 45-72. En: Wolfe, Christopher R. (editor) *Learning and Teaching on the World Wide Web*. Academic Press. USA
- 20 Foltz, Peter W. (1996) "Comprensión, Coherence, and Strategies in Hypertext and Linear Text". Págs. 109-136. En: Rouet, J-F., Levone, J. J., Dillon, A. Y Spiro, R. J. (editores) *Hypertext and Cognition*. Lawrence Erlbaum Associates. USA.
- 21 Spitulnik, M. W. (1997) "Using Hipermedia to Represent Emerging Student Understanding: Science Learners and Preservice Teachers". Págs. 229-259. En: Mintzes, J. J., Wandersee, J. H. Y Novak, J. D. *Teaching Science for Understanding*. Academic Press. USA.
- 22 Vitale, M. R. Y Romance, N. R, (1999) "Portfolios in Science Assessment: A Knowledge-Based Model for Classroom Practice". Págs. 167-196. En: Mintzes, J. J., Wandersee, J. H. Y Novak, J. D. *Assessing Science Understanding*. Academic Press. USA:

Semblanza de la Act. Iliana Cuenca Almazán.

Se formó como actuario y actualmente se desempeña profesionalmente como consultora de sistemas. Ha desarrollado importantes proyectos en el área de comercio exterior y financiero, ha participado con la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en cursos de capacitación a profesores e investigadores para el desarrollo de software educativo. Ha asistido a congresos internacionales sobre educación a distancia y tecnología educativa.