



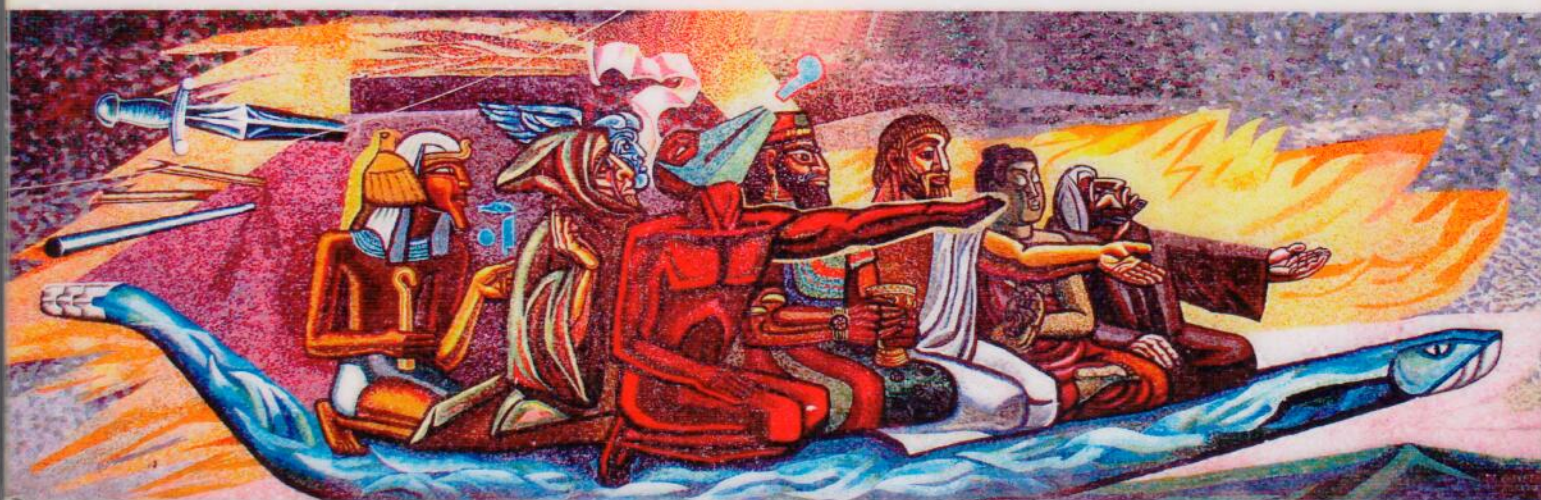
# Mensaje Bioquímico

Temas Bioquímicos de Vanguardia 2004

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 XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## Editorial

### LA BIOQUÍMICA CUMPLIÓ SU PRIMER CENTENARIO

La edición de un libro que reúne a los manuscritos de una serie de investigadores de nivel internacional, que exponen en estas páginas el conocimiento de vanguardia de sus áreas de desarrollo científico, es un placer y un honor que pocos pueden presumir. Ser editor es coordinar un concierto de muchas voces e instrumentos perfectamente afinados y armoniosos. Sin embargo, es necesario señalar que la edición del número XXVIII del Mensaje Bioquímico, Temas Bioquímicos de Vanguardia 2004, conlleva la responsabilidad que exige la tradición de una publicación de más de 25 años de antigüedad y que constituye la mejor colección de trabajos en el área de la bioquímica publicada en el idioma español. Así pues, los miembros del comité editorial del nuevo volumen del Mensaje Bioquímico agradecemos la generosa contribución de los investigadores quienes además de escribir con gran esmero una revisión científica, participan como expositores en el XXXI Taller de Actualización Bioquímica, el cual es un foro para la difusión y actualización del conocimiento científico dentro de la comunidad universitaria del país.

Debido a la importancia de esta publicación anual, desde el número XXVI se ha hecho, además de la tradicional edición en papel, la edición electrónica del mismo (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico/>), con lo que se da una mayor difusión de la obra, no sólo entre los asistentes al Taller de Bioquímica, sino entre la comunidad hispano parlante interesada en la Bioquímica. De hecho en los últimos cuatro meses, la edición electrónica de este libro ha recibido más de 600 visitas. Asimismo, debido la calidad de los trabajos incluidos en estas páginas,



esperamos en fecha próxima la incorporación de esta publicación en las bases de datos PERIÓDICA y LATINDEX.

El contenido del Mensaje Bioquímico, Temas Bioquímicos de Vanguardia 2004, responde a la amplia gama de intereses que tiene la comunidad bioquímica hispanoamericana. Así pues, los investigadores invitados nos llevan a explorar diferentes tópicos de la bioquímica. Por ejemplo, el Dr. Leopoldo de Meis, de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil, nos invita a explorar el mecanismo de la transducción de la energía en los sistemas biológicos, y el Dr. Alfredo Saavedra, de la Universidad Michoacana, nos platicará sobre el papel fisiológico del óxido nítrico mitocondrial, y su repercusión en el metabolismo de este organelo.

La interrelación entre la bioquímica y la medicina actual tiene su representación dentro de este evento por medio de diferentes invitados. Inicialmente, el Dr. Rogelio Hernández Pando, nos mostrará los avances en el campo de las enfermedades infecto-contagiosas, en particular la tuberculosis, a través de diferentes modelos experimentales. Nos mostrará cuán compleja es la relación que se establece entre el agente patógeno y el hospedero. Posteriormente, el Dr. Ricardo Tapia nos platicará sobre los extraordinarios avances en la comprensión de los mecanismos naturales de neurodegeneración,. Por otro lado, el Dr. Guillermo Elizondo nos expondrá el uso de los ratones transgénicos en la farmacología y la toxicología, otro enfoque que también incrementa nuestro conocimiento acerca de la relación de las enfermedades y los genes, y la aplicación de esta información en la farmacología, la toxicología.

Hablando de los genes, aunque actualmente se cuenta con la secuencia de todo el DNA del ser humano, aún no sabemos toda la información que ahí se almacena y sobre todo carecemos de información sobre cómo se activan o reprimen los diferentes genes para construir a un individuo. Para hablarnos sobre este interesante tópico, con nosotros se presentará un grupo de investigadores cuyas pláticas versarán sobre la regulación génica. En primer lugar, la Dra. Estela Sánchez nos mostrará los mecanismos de control de la traducción en las plantas. El Dr. Luis Vaca nos hablará sobre un novedoso mecanismo de regulación génica: el RNA interferente, el cual además se ha convertido en una excelente herramienta para el estudio de los diferentes fenómenos genéticos y como una alternativa dentro de la terapia génica. El Dr. Félix Recillas nos platicará sobre cómo participa la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica y rescatará el papel del núcleo celular en los factores epigenéticos.

Pero qué sería de los genes si no existieran aquellos elementos biológicos que los regulan, los protegen y los reparan, las proteínas. Para hablarnos de ellas, tenemos entre nosotros a la Dra. Rosario Muñoz Clares, quien nos presentará la comparación de la betaína aldehído deshidrogenasa de una planta comestible y una bacteria patógena del hombre. En este trabajo nos mostrará las diferencias y semejanzas que existen entre ambas deshidrogenasas y la posibilidad de hacer de la enzima patógena un posible blanco de agentes antimicrobianos. Así como estudiamos las características naturales de las enzimas, también podemos hacer modificaciones en su estructura con el fin de determinar el papel que desempeñan los diferentes aminoácidos, o bien mejorar o eliminar una actividad en particular. El progreso en los estudios de la estructura y función de las proteínas, fundamentado en el desarrollo de nuevas disciplinas biológicas, como genómica,

proteómica y bioinformática, ha originado un gran avance de la ingeniería de proteínas que permite diseñar y producir enzimas con nuevas propiedades. En este rubro, el Dr. Julio Polaina nos hablará sobre sus trabajos de ingeniería molecular de las enzimas implicadas en la digestión de los carbohidratos.

Un tópico que repercute en la difusión y el desarrollo de la bioquímica, es su enseñanza entre los nuevos alumnos de todas las áreas afines. Así pues, en este número del *Mensaje Bioquímico* se incorporan algunos investigadores interesados en este tema. Los Drs. Gutemberg G. Alves y Leopoldo de Meis, de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil, nos muestran algunos de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en la mitocondria por medio del DVD “La mitocondria en tres actos”, que han desarrollado para la enseñanza de la bioquímica a nivel de pregrado. En este video, los Drs. Gutemberg y de Meis mezclan de forma excepcional la música clásica y la bioenergética mitocondrial, obteniendo un producto que se encuentra en la interfase de la ciencia y el arte.

Por su parte, el Dr. Gustavo Viniegra González nos invita a reflexionar sobre la enseñanza tradicional de la Bioquímica, que debido al gran desarrollo de la misma, ha adquirido cada vez más un carácter enciclopédico y memorístico. Por ello sugiere, empleando como paradigma a la glucólisis, seleccionar problemas o reacciones clave, como por ejemplo, la reacción catalizada por la aldolasa, en donde el estudiante tendrá la oportunidad de estudiar los mecanismos básicos de reacción, para entender los principios de la estereoquímica, y la lógica que dirige al conjunto de reacciones que componen la glucólisis. Así, con auxilio de las nuevas estrategias de tipo electrónico disponibles, nos presenta nuevas herramientas que permiten emplear un enfoque más constructivista, en donde los estudiantes deducen, bajo la tutela del profesor, principios generales que gobiernan las vías metabólicas. Estas herramientas, se incluyen por supuesto en la edición en CD de este libro, y podrán ser empleadas fácilmente por los profesores y alumnos que así lo deseen.

La Dra. Geneviève Lucet Lagriffoul y el Ing. Daniel Espinosa Jiménez, nos muestran cómo la realidad virtual puede ser empleada como una herramienta para el desarrollo de las ciencias biomédicas. En particular, nos muestran la infraestructura y los alcances académicos de la Sala *Ixtli*, de la DGSCA de la UNAM. La sala *Ixtli* nos permite interaccionar con la bioquímica por medio de la realidad virtual y nos facilita su comprensión y ampliar nuestros conocimientos basados en la tridimensionalidad de las moléculas biológicas.

Dentro de este rubro también, el M en QO. Fernando Basurto nos hace la presentación de la Guía Interactiva de Química, que ha desarrollado con el fin de hacer más accesible el conocimiento químico a los alumnos de materias afines de educación media superior y superior. En ésta se puede encontrar, por parte de los alumnos, una guía de estudio, mientras que para los profesores, un recurso didáctico. Además, el software empleado como plataforma de esta guía permite la participación activa de los alumnos y los maestros en la producción de contenidos, actividad creativa que si se da en un contexto curricular definido, sin duda será de alto valor formativo.



Como obsequio final a nuestros lectores, se incluye en el presente volumen, el último trabajo de revisión publicado por nuestro entrañable maestro, el Dr. Hugo Aréchiga Urtuzuástegui. Dicho trabajo fue publicado originalmente por la Revista de Neurología (<http://www.revneurol.com/>) el año pasado. Agradecemos a Viguera Editores S.L., quienes gentilmente nos concedieron el permiso para compartir con nuestros lectores dicho trabajo, que reproducimos a manera de homenaje Póstumo para el Dr. Aréchiga, quién estaba invitado para participar en esta XXXI edición del Taller de Actualización Bioquímica, y cuyo lamentable deceso, impidió concretar su participación. Invitamos a todos los amigos y alumnos del Dr. Aréchiga a leer su último trabajo de revisión, para dar un postrer adiós a nuestro maestro, el profesor Aréchiga.

Estamos seguros que muchos de los trabajos aquí plasmados, se convertirán en referencia obligada para todos los estudiantes de habla hispana, interesados en la Bioquímica. Para los profesores, esperamos que estas revisiones, contribuyan a un mejor desarrollo del trabajo en clase.

Dentro de la celebración del XXXI Taller de Actualización en Bioquímica y la XXVIII edición del *Mensaje Bioquímico*, queremos recordar que en este año se cumplen 25 años de que Allan M. Cormack y Godfrey N. Hounsfield recibieran el premio Nobel en Fisiología y Medicina por el desarrollo de la tomografía asistida por computadora, que actualmente es un método radiológico ampliamente utilizado. También se cumple el trigésimo aniversario de la entrega del premio Nobel a Albert Claude, Christian de Duve y George E. Palade, por el desarrollo de los métodos que permitieron analizar con detalle la estructura y organización funcional de la célula. Su contribución fue decisiva para la creación de una de las primeras ciencias derivada de la Bioquímica, la Biología Celular.

Hace 50 años, Arnon y sus colegas descubrieron la fosforilación fotosintética. También ese mismo año, Britton Chance y Williams utilizan por primera vez un electrodo de oxígeno para estudiar la dinámica del transporte de electrones en mitocondrias. Por su parte, Zamecnick y sus colegas demostraron que las partículas de nucleoproteínas, ahora conocidas como ribosomas, son el sitio en donde se efectúa la síntesis de las proteínas.

Hace 60 años Avery, MacLeod y McCarty demostraron que el DNA es el portador de la información genética, y no las proteínas como se sospechaba en ese tiempo, y hace 75 años Christian Eijkman, bioquímico danés, recibió en 1929 el premio Nobel en fisiología y medicina por sus contribuciones que condujeron al concepto de las *vitaminas*, al demostrar que el *beriberi*, una enfermedad endémica en Asia a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, se producía por una deficiencia nutricional y que podía ser curada con los componentes solubles de la cascarilla del arroz. Esta observación, permitió el descubrimiento de la primera vitamina, la tiamina, y dio pie también, a la primera aportación de la Bioquímica, como ciencia por derecho propio, a la salud pública, dando lugar a un impulso muy importante de la investigación bioquímica y al descubrimiento de toda una serie de compuestos esenciales para la vida, las *vitaminas*. Este mismo año ocurrió también otro descubrimiento importante, puesto que Fiske y Subbarow aislaron por primera vez ATP a partir de extractos de músculo.

Hace exactamente 100 años, en 1904, Ivan P. Pavlov recibió el premio Nobel por sus

trabajos clásicos sobre la Fisiología de la Digestión, reconocimiento que podemos considerar, fue uno de los frutos selectos de una ciencia relativamente nueva, denominada como química fisiológica en sus primeros inicios. En este sentido, el trabajo desarrollado por Felix Hoppe-Seyler (1825-1895) fue determinante para el origen de esta nueva ciencia, al fundar en 1884 la primera institución dedicada al estudio de lo que ahora podríamos llamar Bioquímica: el Instituto de Química Fisiológica en Estrasburgo. Esta joven ciencia cambio rápidamente su nombre por el de química biológica, al ampliar su enfoque e incluir el estudio de diversos organismos no humanos. Sin embargo, no fue sino hasta 1903 cuando Carl Neuberg (1880-1956), acuña el término Bioquímica, enmarcando así, el origen de una nueva disciplina independiente, con sus propios métodos de estudio e investigación. De esta manera, podemos considerar el año 2004, como el inicio del segundo centenario de esta relativamente joven ciencia, que vive lo que podríamos llamar, su plenitud y en donde seguramente, lo mejor esta por venir.

En este tenor, tampoco podemos dejar de mencionar que hace 150 años, Pasteur inició los estudios que demostraron que la fermentación es causada por microorganismos, lo que permitió descartar en forma definitiva la hipótesis de la generación espontánea, y más lejano aún, hace 200 años, en 1804, Daltón enunció por primera vez la teoría atómica.

Y ya entrados en las remembranzas, nos parece importante sumarnos al homenaje a los mexicanos Luis Ernesto Miramontes Cárdenas (investigador) y George Rosenkranz (vicepresidente de la compañía Syntex), quienes junto con Carl Djerassi (director de proyecto), patentaron un invento que revolucionó al mundo: la píldora anticonceptiva. De hecho, hace exactamente 40 años, en 1964, el Departamento de Patentes de los Estados Unidos, seleccionó a la píldora anticonceptiva, como uno de los 40 inventos más importantes registrados entre 1794 y 1964. Así, el Dr. Miramontes Cárdenas, mientras trabajaba en México para la empresa farmacéutica mexicana Syntex, descubrió la noretisterona, una progesterona sintética que fue lanzada al mercado en 1957, como remedio para algunos desordenes menstruales y –muy discretamente– como anticonceptivo<sup>1</sup>.

Por último, para la edición e impresión de este libro y para la organización del ciclo de conferencias, se requieren de la participación de los patrocinadores. Este trabajo recibió el apoyo del Dr. Edgar Zenteno Galindo, Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, cuya actitud emprendedora y entusiasta lo convirtió *de facto*, en un organizador más del evento. También agradecemos el apoyo del Director de la Facultad de Medicina, el Dr. José Narro Robles, del Dr. Luis Enrique Graue Wiechers, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la FM-UNAM y del Dr. Gregorio Pérez Palacios, Coordinador de Investigación de la FM-UNAM. También gestionamos el apoyo económico de la Red Latinoamericana de Biología (RELAB), dependiente de CONACYT, y agradecemos en especial el dedicado apoyo de la Dra. Alicia González Manjarrez para este fin. También recibimos apoyo financiero del posgrado en

---

<sup>1</sup> Para más información sobre esta interesante historia, se recomienda revisar el número 67 (junio 2004) de la revista de divulgación de la UNAM, ¿Cómo ves? (<http://www.comoves.unam.mx/>), y para ampliar la información sobre los diferentes ganadores de un premio Nobel mencionados en este documento, recomendamos visitar el portal electrónico: <http://www.nobel.se/>

Ciencias Bioquímicas de la UNAM sede Fac. de Química. 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. También queremos hacer patente nuestro agradecimiento al Dr. Antonio Caso, Secretario Académico de la División de Estudios de Posgrado de la FM-UNAM, quien a través del grupo Dartos S.A. donó las carpetas que se entregaron a los inscritos al Taller. Finalmente, no quisiéramos dejar de mencionar a las siguientes personas, quienes de una u otra manera, nos apoyaron en diferentes etapas del desarrollo de este evento: Quím. Héctor Delgado, Biol. Adriana Julián Sánchez, M. en C. Aida Uribe Medina, Sra. Marivel Rojas García, Sra. Alejandra Palomares y Sra. Rosa María López.

Junio del 2004.

Oscar Flores Herrera.  
Héctor Riveros Rosas





---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## LOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE ALTA Y BAJA ENERGÍA.<sup>1</sup>

Leopoldo de Meis and Gutemberg G. Alves

Depto Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, CEP 21.941-590 Brazil

[demeis@bioqmed.ufrj.br](mailto:demeis@bioqmed.ufrj.br)

### PHOSPHATE COMPOUNDS OF HIGH AND LOW ENERGY

#### Abstract.

*Living organisms have evolved several ways to interconvert energy in its different forms, by using phosphate compounds such as adenosine triphosphate (ATP) as biological currency of energy exchange. ATPases are able to convert the energy derived from ATP hydrolysis into work. Also, a significant part of the total energy released may be dissipated in the surrounding environment as heat. In this work, we will review and discuss the processes of energy transduction, the notion of high and low energy phosphate compounds, and the evolution of two concepts: (i) that the energy derived from hydrolysis of phosphate compounds is only liberated before the hydrolysis of the phosphate bond and (ii) that the amount of energy released and the fraction of it that is converted into heat varies with the environment, e. g., if the compound is cleaved in solution or on the enzyme surface. We will also discuss some evidences indicating that ATPases can modulate the conversion of energy during the catalytic cycle determining the fraction of energy derived from the phosphate compound which will be converted into work and the fraction to be converted into heat. This concept is important for the understanding of thermogenesis and its role on cold resistance, control of body weight, and the mechanism several diseases like hyperthyroidism and adiposity, that are associated with misregulation of thermogenesis.*

**Keywords:** adenosine triphosphate, ATP; phosphate bond; ATPases; energy transduction; solvation; phosphate hydrolysis; pyrophosphate; thermogenesis.

---

<sup>1</sup> Artículo traducido por: Edgar Vázquez Contreras.

## Introducción

La energía es una cuestión central en la vida y para sobrevivir, los organismos vivos han encontrado varias maneras para interconvertir continuamente las diversas formas de energía disponibles en el ambiente. Los compuestos de fosfato son la materia biológica común de intercambio de energía y el trifosfato de adenosina (ATP) es el portador de energía más importante de la célula. Un grupo de enzimas conocidas como ATPasas pueden convertir la energía derivada de hidrólisis del ATP en el trabajo (contracción muscular), el transporte de iones ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa,  $\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$ -ATPasa) o aún la producción de luz (luciferasa de las luciérnagas). No toda la energía derivada de hidrólisis de los compuestos de fosfato es convertida en trabajo por las enzimas; una parte significativa de la energía total se disipa en el ambiente circundante como calor.

Dos conceptos generales se encuentran comúnmente en la mayoría de los libros de texto de Bioquímica: primero, la energía derivada de hidrólisis de los compuestos de fosfato se libera en el momento exacto de hidrólisis del enlace de fosfato y segundo, la cantidad de energía liberada y la fracción de ella que se convierte en calor es siempre la misma sin importar si el compuesto se encuentra en solución o en la superficie de la enzima. Es decir las enzimas actuarían como catalizadores, no teniendo ningún efecto en la energía de hidrólisis del sustrato ni controlando la fracción de la energía total liberada que se convierte en calor.

Estos dos conceptos ya no son válidos actualmente. Ahora sabemos que la energía de hidrólisis de los compuestos de fosfato varía considerablemente dependiendo de si se encuentra en solución o en la superficie de la enzima. Por otra parte, para las enzimas implicadas en la transducción de energía, la energía utilizada para realizar trabajo está disponible **antes** de la ruptura del compuesto de fosfato. La evidencia obtenida durante los últimos 5 años indica que las ATPasas pueden modular la conversión de la energía durante el ciclo catalítico, determinando la fracción de la energía derivada del compuesto de fosfato que será convertida en trabajo y la fracción que se convertirá en calor.

En este trabajo, discutiremos los procesos de transducción de energía, el concepto de compuestos de fosfato de alta y baja energía, así como el hecho de cómo algunas ATPasas pueden controlar y regular la cantidad de energía dirigida para generar trabajo o para producir calor. Este concepto es importante para la comprensión de la termogénesis y su papel en la resistencia al frío, así como el mecanismo de algunas enfermedades como el hipertiroidismo y la obesidad que se asocian con la pérdida de la regulación de la termogénesis.

## Los compuestos de fosfato de alta y baja energía

### *El concepto inicial*

La historia del ATP se remonta a los años 20's cuando Fiske y Subbarow [1] buscaban un método para la cuantificación de fosfato inorgánico (Pi) en los tejidos animales. Durante el curso de su experimento, purificaron al ATP y al fosfato de creatina de tejidos animales. En ese entonces no se conocía la importancia fisiológica de estos compuestos de fosfato. Tomó varios años para descubrir que estos compuestos eran portadores de energía y que su ruptura proporciona la energía necesaria para la contracción muscular. Fue hasta 1941 que los conceptos de compuestos de fosfato "ricos" y "pobres" en energía fue formalmente presentado por Lipmann [2] en una revisión en la cual analizaba sus datos y los obtenidos en otros laboratorios. En base al conocimiento disponible en aquella época, Lipmann propuso lo siguiente:

- (i) La energía que se deriva de hidrólisis de un compuesto de fosfato depende exclusivamente de la naturaleza química del enlace que liga el residuo de fosfato al resto de la molécula. El enlace de N-P del fosfato de creatina, el fosfato del enol del fosfoenolpiruvato, las uniones fosfoanhídrido del ATP y de PPi, y el enlace del acilfosfato del aspartil fosfato eran enlaces de fosfato ricos en energía típicos.
- (ii) Los enlaces de fosfato ricos en energía, son los que presentan una  $K_{eq}$  elevada para la hidrólisis en agua e inversamente, los enlaces de fosfato pobres en energía tendrían una constante de equilibrio baja para la hidrólisis. En este sentido, los fosfoésteres tales como la glucosa-6-fosfato y el glicerol fosfato son compuestos de fosfato típicos de baja energía.
- (iii) Se pensaba que la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula hacia otra, dependía solamente de la energía de hidrólisis de los enlaces químicos. Así, el fosfato gama del ATP se puede transferir a una molécula de glucosa formando glucosa-6-fosfato, pero en condiciones fisiológicas, la reacción reversa no sería posible a menos que energía adicional fuera proporcionada al sistema. Entonces la única manera de regenerar cualquier molécula de ATP hidrolizado en la célula sería invertir compuestos de fosfato de energía igual mayor que el propio ATP, tal como por ejemplo la creatina.

Al inicio de los años 40's, poco se sabía sobre la estructura de las proteínas y del mecanismo catalítico de las enzimas. Por lo tanto, en la revisión de Lipmann quedó implícito que la energía de hidrólisis de los compuestos de fosfato sería la misma sin importar si estuvieran unidos a la enzima o libres en solución.

En base a las formulaciones anteriormente descritas, se pensaba que la secuencia de eventos durante el proceso de la transducción de energía en enzimas, estaba compuesto por los siguientes pasos:

- (i) La enzima une al ATP;
- (ii) El ATP es hidrolizado y la energía se libera en el sitio catalítico en el momento exacto de la ruptura del enlace de fosfato.
- (iii) La energía es inmediatamente absorbida por la enzima y utilizada para realizar trabajo. Para la síntesis del ATP a partir de ADP y Pi, la secuencia de eventos sería igual, pero en orden inverso;
- (iv) La enzima ahora uniría al ADP y al Pi;
- (v) Una salida de energía en el sitio catalítico sería necesaria dirigir la síntesis del ATP;
- (vi) Una vez formada, la molécula del ATP será disociada de la enzima y difundirá en el citosol sin la necesidad de energía extra.

A partir de esta secuencia, se infirió que el trabajo sería realizado en la parte de la molécula de la enzima en donde se libera la energía *i.e.*, en la vecindad inmediata del sitio catalítico.

Estos conceptos permanecieron sin disputa desde la época de la revisión de Lipmann en 1941 hasta 1970. Durante este período, la mayoría del trabajo se fue de naturaleza teórica y se pensaba que la naturaleza de "alta energía" del enlace de fosfato era dependiente de efectos

intramoleculares tales como resonancia de oposición, las repulsiones electrostáticas y la distribución del electrón a lo largo del esqueleto de la molécula [3-5].

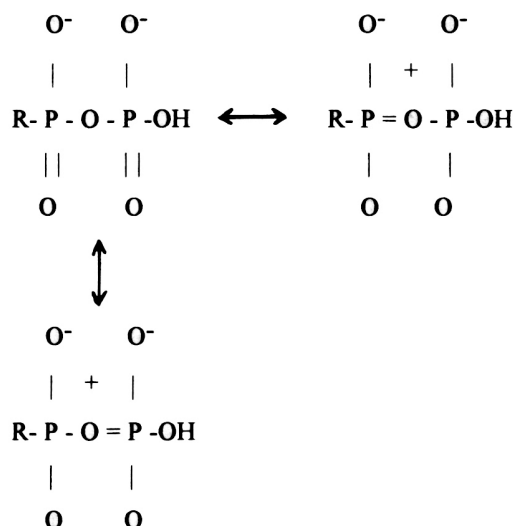


Figura 1. Las formas resonantes del pirofosfato.

Así se pensaba que la elevada constante de equilibrio (K<sub>eq</sub>) para la hidrólisis del PPI (PPi) y del ATP, estaba determinada por las cargas negativas y la resonancia de oposición del enlace P-O-P.

La carga negativa de cualquier lado del enlace se rechazaría, creando tensión dentro de la molécula y la resonancia de oposición generaría puntos de debilidad a lo largo del esqueleto. Consecuentemente, sería fácil romper la molécula y difícil mantener unidos a los productos de la reacción hidrolítica. La combinación de estos dos factores sería responsable de la elevada K<sub>eq</sub> para la hidrólisis de los enlaces del fosfoanhídrido del ATP o de PPI.

### Nuevos conceptos- aproximación teórica

En 1970 y George colaboradores [6], concluyeron que en los sistemas biológicos los compuestos de fosfato están en solución y por tanto, interaccionan fuertemente con el agua (Tabla 1). Por lo tanto se esperaba que las moléculas de agua se organicen alrededor del compuesto de fosfato y que ambos protejan las cargas de la molécula, neutralizando así la repulsión electrostática, y además, formando puentes entre diversos átomos de la molécula, reforzando de esta forma los puntos débiles generados a lo largo del esqueleto de la molécula por medio de resonancias opuestas.

George y colaboradores propusieron que la K<sub>eq</sub> para la hidrólisis de un compuesto de fosfato se debe determinar por las diferencias en energías de solvatación de los reactivos y productos y no por efectos intramoleculares como se había propuesto previamente [3,4]. La energía de solvatación es la cantidad de energía necesaria para remover a las moléculas de solvente que se organizan alrededor de una sustancia en solución. Mientras más solvatada sea la molécula es más estable o menos reactiva que aquella que está menos solvatada y la K<sub>eq</sub>

para la hidrólisis estaría determinada por la diferencia de energía de solvatación entre los reactivos y los productos. En este sentido, la  $K_{eq}$  de una reacción es alta cuando los productos están más solvatados que los reactivos.

**Tabla 1. Energías de solvatación de diferentes formas de fosfato inorgánico y pirofosfato**

| Molécula         | Energía de Solvatación<br>Kcal/mol |
|------------------|------------------------------------|
| $H_2PO_4^-$      | 76                                 |
| $HPO_4^{2-}$     | 299                                |
| $PO_4^{3-}$      | 637                                |
| $H_3P_2O_7^-$    | 87                                 |
| $H_2P_2O_7^{2-}$ | 134                                |
| $HP_2O_7^{3-}$   | 358                                |
| $P_2O_7^{4-}$    | 584                                |

*Valores reportados por George y colaboradores (1970). La energía de Solvatación se define como la energía necesaria para remover completamente al agua de solvatación de un compuesto.*

Note en la Tabla 1 que las energías de solvatación del Pi varían de 76 a 637 kcal/mol y para el Ppi, varía entre 87 y 584 kcal/mol. La cuantificación de la energía libre de hidrólisis de Ppi en agua, varía entre -3 y -6 Kcal/mol (Tabla 2).

**Tabla 2. Energía de hidrólisis de diferentes compuestos de fosfato en medios totalmente acuosos, en fase gaseosa y en mezclas de agua con solventes orgánicos.**

| Compuesto         | $\Delta G^0$ (Kcal/mol) |              | Mezclas de solvente orgánicos |
|-------------------|-------------------------|--------------|-------------------------------|
|                   | Agua                    | Fase gaseosa |                               |
| ATP               | -7.0 a -9.0             | ---          | +0.3                          |
| Ppi               | -3.0 a -6.0             | -0.4 a -0.9  | -1.0 a + 2.0                  |
| Aspartil fosfato  | -9.0 a -11.0            | +5.0 a +32.0 | +0.3 a +2.3                   |
| Creatina fosfato  | -9.0 a -11.0            | +9.0 a +212  | ---                           |
| Glucosa-6-fosfato | -1.5 a -3.0             | -1.5 a -2.5  | -1.5 a -2.5                   |

*Para detalles vea las referencias [13, 17]. La ecuación para la energía libre estándar de hidrólisis es  $\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$ , en donde R es la constantes general de los gases ( $1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T es la temperatura absoluta y  $K_{eq}$  es la constante de equilibrio de la reacción. Un valor negativo de  $\Delta G$  produce una  $K_{eq}$  elevada, lo que favorece la reacción.*

Esto representa una fracción muy pequeña de la energía de solvatación total del Pi y Ppi (Tabla 1). De esta forma, un cambio pequeño en la organización del solvente alrededor de las moléculas de los reactivos y los productos sería suficiente para explicar la energía de hidrólisis del Ppi cuantificada. El trabajo de George y colaboradores seguía inadvertido por varios años. No fue hasta 1978 que la teoría de solvatación fue revisada y verificada por Hayes y colaboradores [7]. Estos autores calcularon la energía de hidrólisis de varios los compuestos de fosfato en fase de gaseosa, una situación en la cual los reactivos y los productos no están solvatados y compararon estos valores con los obtenidos en agua (Tabla 2). En solución acuosa, el acetilfosfato y los enlaces de N~P de la fosfocreatina y de la fosfoarginina son de alta energía.



Sin embargo, en la fase gaseosa, esto no es verdad. Por el contrario, la energía libre positiva de hidrólisis indica que cuando los reactivos y los productos no están solvatados, el acetilfosfato y la fosfocreatina son más estables que los productos de su hidrólisis, y según la definición de Lipmann, se comportan como compuestos de fosfato de baja energía. De manera interesante, el concepto de energía de solvatación parece ser válido solamente para los compuestos de fosfato de alta y no para los de baja energía porque los valores calculados para las energías de hidrólisis de la glucosa-6-fosfato y otros los fosfoésteres son iguales sin importar si las moléculas están en soluciones acuosas o en fase gaseosa [7].

### **Cuantificaciones experimentales**

En 1984 nos interesamos en la teoría de solvatación propuesta originalmente por P. George. La motivación fue el descubrimiento de que la misma especie química, un residuo acilfosfato, tendría diferentes energías de hidrólisis dependiendo, si está en solución (agua) o en la superficie de la enzima. Esto será discutido más adelante en una sección particular. Para probar experimentalmente la teoría de solvatación, medimos en nuestro laboratorio la energía de hidrólisis del PPi en medios con diversas actividades de agua. La estrategia adoptada fue medir la  $K_{eq}$  en medios acuosos que contenían diversas concentraciones de solventes orgánicos. De acuerdo con la propuesta de la teoría de solvatación, encontramos que un cambio discreto de la actividad de agua es suficiente para promover un cambio drástico en la energía de hidrólisis del PPi (Figura 2). En medios totalmente acuosos ( $W_a = 1$ ), el  $\Delta G^\circ$  de hidrólisis de PPi fue -5 kcal/mol, pero se elevó a +1 kcal/mol cuando la actividad de agua del medio fue disminuida a 0.5 [8]. Entonces dependiendo de la actividad de agua del medio, el PPi podía cambiar de un compuesto de alta energía a uno de baja. Un año más tarde Wolfenden y Williams [9] encontraron que el ATP se podría sintetizar espontáneamente en cloroformo hidratado y recientemente Kirby et al. [10] observaron que el acetilfosfato se puede sintetizar espontáneamente en medios con actividad de agua disminuida. Contrastando con el PPi, el ATP y los residuos de acilfosfato, la actividad de agua no tiene prácticamente ningún efecto en la energía de hidrólisis de fosfoésteres tales como glucosa-6-fosfato. Así, en medio totalmente acuoso, el PPi se comporta como compuesto de alta energía cuando se compara con la glucosa-6-fosfato, pero en un ambiente hidrofóbico ( $W_a = 0.5$ ) la glucosa-6-fosfato se convierte en un compuesto de fosfato con una energía de hidrólisis más alta que el PPi (Figura 2) [8,11,12]. Estos efectos de  $W_a$  en la energía libre de hidrólisis del PPi y de la glucosa-6-fosfato se pueden interpretar fácilmente según la teoría de la energía de solvatación [6,12,13], pero difícil de hacer coincidir con la propuesta de Lipmann (1941). Si la energía de la reacción estuviera determinada solamente por la naturaleza del enlace de fosfato roto, como se propuso en los años 40's, entonces la energía de hidrólisis de PPi no debería depender del  $W_a$  del medio y siempre ser más alta que la de glucosa-6-fosfato sin importar las condiciones.

Más que contribuir a la comprensión de la naturaleza química de los compuestos de fosfato de alta y baja energía, estos resultados tienen implicaciones fisiológicas importantes en procesos biológicos de la transducción de energía. Un ejemplo es la síntesis fotosintética del PPi que se discute a continuación.

### **PPi de alta y baja energía**

Los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas *R. rubrum* contienen una enzima pirofosfatasa inorgánica membranal, que sintetiza PPi cuando un gradiente electroquímico de protones se forma a través de la membrana de los cromatóforos iluminados. Cuando la luz se apaga (en oscuridad), el PPi sintetizado previamente es metabolizado por la enzima antes mencionada (Figura 3).

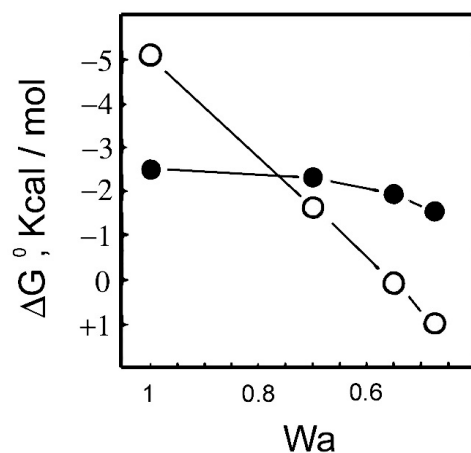


Figura 2. Efecto de la actividad de agua en las energías de hidrólisis del PPI y la glucosa-6-fosfato. Los círculos vacíos representan al PPI, los círculos llenos representan a la glucosa-6-fosfato. Para detalles experimentales vea [13].

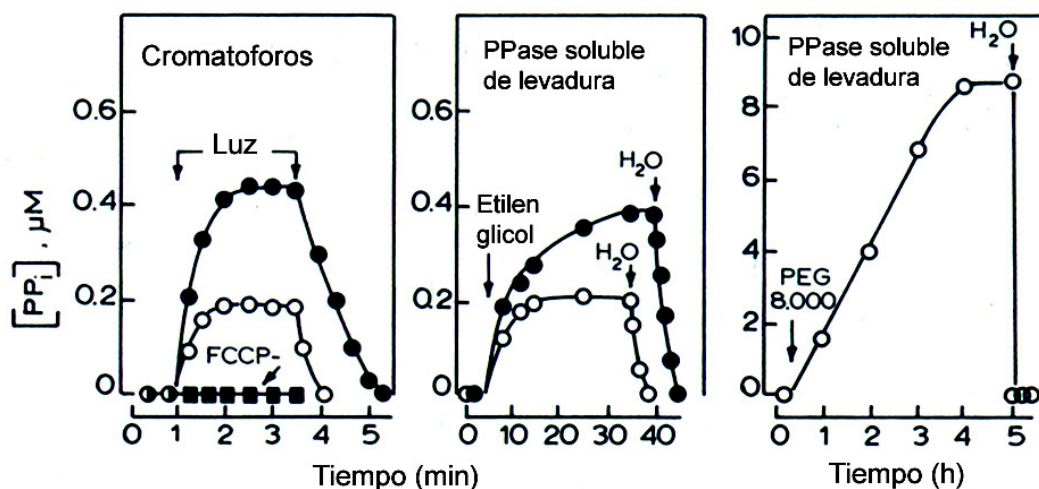


Figura 3. Síntesis de PPI por los cromatoforos de *R. rubrum* y por la pirofosfatasa inorgánica soluble de levadura (PPase). Los círculos llenos indican la presencia de 1 mM de Pi y los vacíos de 2 mM. Los cuadros representan la presencia de un ionóforo de  $H^+$  (FCCP). En el panel central el solvente utilizado fue etilenglicol, en el de la derecha fue poli(etilenglicol) 8000. Para más detalle refiérase a [15].

El ciclo de transducción de energía medido con los cromatoforos se puede reproducir por un pirofosfatasa soluble, sin la necesidad de la membrana, de la clorofila o de la luz [14,15]. La enzima soluble puede sintetizar PPI en la oscuridad cuando la actividad de agua del medio es reducida por la adición de solventes orgánicos. En esta condición, el  $\Delta G^\circ$  de hidrólisis de PPI tiene un valor positivo, es decir, el PPI no es un compuesto de alta energía y se sintetiza

espontáneamente (Figura 3). Si entonces diluimos el medio con agua, para disminuir la concentración del solvente orgánico y aumentar la actividad de  $W_a$  del medio, el PPi sintetizado previamente es metabolizado por la enzima porque ahora el PPi se ha convertido en un compuesto de alta energía con una  $K_{eq}$  alta para la hidrólisis. Estos experimentos indican que:

- una disminución de  $W_a$  puede desempeñar un papel en el mecanismo por el cual la energía derivada del gradiente electroquímico generado por la luz es utilizado para la síntesis de PPi en los cromatóforos de *R. rubrum*.
- para la síntesis del PPi, la energía no es necesaria para la formación del enlace covalente del PPi como se pensaba en los años 40's, sino al contrario para modificar el ambiente de un punto bajo de actividad de agua a uno elevado. En el primer ambiente el PPi es un compuesto de fosfato de baja energía y se forma espontáneamente mientras que en el segundo ambiente se convierte en un compuesto de fosfato de alta energía.

### Conversión de enlaces fosfato de alta energía en baja energía en el sitio catalítico de las enzimas

Durante las últimas cuatro décadas se ha aclarado el ciclo catalítico de varias enzimas implicadas en procesos de transducción de energía [16-22]. Estos estudios revelaron que la energía de hidrólisis de diversos compuestos de fosfato varía considerablemente dependiendo de si están en solución o unidos a la enzima (Tabla 3). Las reacciones que se pensaban prácticamente irreversibles en solución acuosa, ocurren espontáneamente cuando los reactivos están unidos a la enzima. Según estos resultados, la energía para realizar trabajo no está disponible para la enzima en el momento de la ruptura del compuesto de fosfato.

**Tabla 3. Variación de la energía de hidrólisis de compuestos de fosfato durante el ciclo catalítico de enzimas transductoras de energía.**

| Enzima                      | Reacción                                | Solución<br>(antes del trabajo) |                            | Unido a la enzima<br>(después del trabajo) |                            |
|-----------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|
|                             |                                         | $K_{eq}$<br>(M)                 | $\Delta G^0$<br>(Kcal/mol) | $K_{eq}$<br>(M)                            | $\Delta G^0$<br>(Kcal/mol) |
| $Ca^{2+}$ -ATPasa           | Aspartil fosfato (hidrólisis)           | $10^6$                          | -8,4                       | 1,0                                        | 0                          |
| $(Na^++K^+)$ ATPasa         | ATP (hidrólisis)                        | $10^6$                          | -8,4                       | 1,0                                        | 0                          |
| F1-ATPasa,<br>Miosina       | PPi (hidrólisis)                        | $10^4$                          | -5,6                       | 0,5                                        | -0,9                       |
| Pirofosfatasa<br>Inorgánica |                                         |                                 |                            |                                            |                            |
| Hexoquinasa                 | ATP + glucosa $\rightarrow$ Glc-P + ADP | $2 \times 10^3$                 | -4,6                       | 1,0                                        | 0                          |

Para detalles vea las referencias [13, 17]. La ecuación para la energía libre estándar de hidrólisis es  $\Delta G^{0'} = -RT \ln (K_{eq})$ , en donde  $R$  es la constantes general de los gases ( $1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura absoluta y  $K_{eq}$  es la constante de equilibrio de la reacción. Un valor negativo de  $\Delta G$  produce una  $K_{eq}$  elevada, lo que favorece la reacción.

Para las ATPasas del transporte iónico, la energía necesaria para desplazar los iones a través de la membrana está disponible antes de la ruptura del compuesto de fosfato [17]. Durante el ciclo catalítico hay una disminución considerable de la  $K_{eq}$  para la hidrólisis del compuesto de fosfato unido a la enzima (residuo de acilfosfato) y el transporte a través de la

membrana se acopla con esta transición de la  $K_{eq}$  y no con la ruptura del compuesto de fosfato. La hidrólisis parece ser necesaria para permitir solamente la disociación de los productos de hidrólisis de la enzima y no para proporcionar energía al sistema.

Para la ATPasa de la actomiosina, la energía está disponible cuando el ADP y (o) el Pi se disocian de la enzima y no cuando se hidroliza el ATP [23-25]. La  $K_{eq}$  para la hidrólisis del ATP en el sitio catalítico de la actomiosina es cerca de 1, es decir, la hidrólisis del ATP no implica un cambio significativo de la energía libre.

Según estos nuevos resultados, la secuencia de eventos para la transducción de energía en ATPasas de transporte o actomiosina son como sigue:

- (a) La enzima une al ATP u otros compuestos de fosfato;
- (b) La enzima realiza trabajo sin que el compuesto de fosfato sea hidrolizado. Esto es acompañado por una disminución del nivel de energía del compuesto de fosfato;
- (c) El compuesto de fosfato se rompe y los productos de hidrólisis se disocian de la enzima en un proceso que implica un cambio de energía relativamente pequeño.

En el proceso inverso, los compuestos de fosfato tales como ATP, PPi y el residuo de acilfosfato se sintetizan en el ambiente hidrofóbico del sitio catalítico de la enzima sin necesidad de energía, es decir, la energía se necesita entonces para la conversión del compuesto de fosfato de "baja energía" en un compuesto de "alta energía". Esta conversión estaría acompañada por una transición hidrofóbica ( $W_a$  bajo) - hidrofílica ( $W_a$  alto) en el sitio catalítico de la enzima. La síntesis de ATP y de PPi por la ATP sintasa mitocondrial, involucra un cambio conformacional de la proteína que permite la disociación del ATP y de PPi en el medio hidrofílico del ensayo. Para las ATPasas de transporte tales como la  $Ca^{2+}$ -ATPasa, la transición hidrofóbica-hidrofílica ocurre en el sitio catalítico. La información disponible actualmente sobre la estructura de las ATPasas de transporte indica que el trabajo se realiza en una región de la estructura terciaria de la proteína distante a aquella donde se localiza el sitio catalítico y que los cambios conformacionales de la proteína sincronizan la secuencia de evento que ocurren en estas dos regiones [21-22].

La propuesta de que la conversión del compuesto de fosfato de alta energía en el de baja, es promovida por un cambio del  $W_a$  en el sitio catalítico de las enzimas se ha verificado por medio de cuantificaciones de la actividad enzimática en medios con diversos  $W_a$ . Se ha demostrado que las enzimas que utilizan la energía de un gradiente químico para sintetizar el ATP a partir del ADP y del Pi pueden promover esta síntesis incluso en ausencia del gradiente, simplemente por el cambio en la actividad de agua del medio. Esto fue demostrado por primera vez con la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico [17,26], la  $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa [27] y la porción F1 soluble de la ATPasa mitocondrial [28-32]. En este último caso, la adición de un solvente orgánico promueve una disminución dramática de la  $K_m$  aparente de la enzima por el Pi y un aumento considerable en la cantidad ATP unido fuertemente en el sitio catalítico de la F1-ATPasa.

### Transducción energética y producción de calor en las ATPasas de transporte

En las reacciones que implican la transducción de energía, solamente una parte de la energía química liberada durante la hidrólisis del ATP se convierte en trabajo u otras formas de energía tales como energía osmótica. La otra parte se convierte en calor, y en animales endotérmicos, el calor liberado se utiliza para mantener la temperatura del cuerpo constante y alta.

El interés en la producción del calor y la termogénesis ha aumentado durante la última década debido a sus implicaciones para la salud y enfermedad. Las alteraciones de la termogénesis se observan en varios desórdenes, tales como el control del peso corporal y la disfunción endocrina [33], en el hipertiroidismo hay una disminución del peso corporal, y un aumento del metabolismo basal y de la tasa de producción de calor, al hormona tiroidea T3 (3,5,3'-tri-iodo-L-tironina) está implicada en la regulación térmica de vertebrados [34].

Hasta hace algunos años, se asumía que la cantidad de calor producida durante la hidrólisis de una molécula del ATP era siempre igual y que no se podría modular por las enzimas, como si la energía liberada durante la hidrólisis del ATP fuera dividida en dos porciones no intercambiables: una sería convertida en calor, la otra utilizada para el trabajo. Contrastando con esta posición, se encontró recientemente que algunas enzimas pueden manejar la energía derivada de hidrólisis del ATP de tal manera que determinan cuánta energía se utiliza para el trabajo y cuánta se disipa como calor [35-46]. En este sentido, la cantidad total de energía liberada durante la hidrólisis del ATP es siempre igual, pero la fracción de la energía total que se convierte en trabajo o calor se modula por la enzima. Esto fue demostrado originalmente para la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico y más adelante para la hexoquinasa [47] y pirofosfatasa de plantas [48].

Para la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa se encontró que la cantidad de calor liberada durante la hidrólisis del ATP varía dependiendo de si el residuo de acilfosfato formado a partir del ATP es hidrolizado antes o después de su transformación de "alto" a "bajo" contenido de energía [40-42,46]. El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana ocurre durante esta conversión. Si la ruptura sucede cuando el acilfosfato tiene una alta energía de hidrólisis (ambiente hidrofílico en el sitio catalítico) entonces toda la energía derivada de la ruptura se convierte en calor y no se utiliza nada para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Inversamente, cuando el acilfosfato bajo en energía se rompe (ambiente hidrofóbico en el sitio catalítico) una buena parte de la energía se utiliza para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  y poca energía queda disponible para ser convertida en calor. La regulación de la producción del calor depende por lo tanto del cociente entre los residuos del acilfosfato de alta y baja energía rotos durante catálisis. Existen varias isoformas de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas sarco / endoplásmicas (SERCA) y la cantidad de calor producida durante la hidrólisis del ATP y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  varía dependiendo de la isoforma utilizada. Esta variabilidad depende de la frecuencia de la ruptura del residuo de acilfosfato de alta energía [44]. La hormona tiroidea T3 regula la expresión de varias isoformas de SERCA. En el hipertiroidismo, una condición donde el índice de la producción de calor aumenta, las isoformas de SERCA que producen más calor (SERCA 1) están expresadas. Recientemente, fue demostrado que la administración a conejos de T4 (un precursor de T3) promueve un aumento en los índices de la actividad desacoplada de la ATPasa y de la producción del calor en vesículas del retículo sarcoplásmico, con un comportamiento que depende del tipo del músculo utilizado [49]. Esto sugiere que la actividad desacoplada  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa puede ser una de las fuentes de calor que contribuyen a la termogénesis en el hipertiroidismo.

## Referencias

1. Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1927). The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 65: 401.
2. Lipmann, F. (1941). Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Advances in Enzimology* 1 : 99-162.
3. Kalckar, M. (1941). An activator of the hexokinase system. *J. Biol. Chem.* 137: 789-790.
4. Boyd, D. B. and Lipscomb, W. N. (1969). Eletronic structures for energy-rich phosphates. *J. Theor. Biol.* 25: 403-420.
5. Hill, T. L. And Morales, M.H. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1656-1660.
6. George, P. Witonsky, R.J. Trachtman, M. Wu, C. Dorwatr, W., Richman, L. Richman, W., Shuray, F. And Lentz, B. (1970). An enquiry into the importance of solvation effects in phosphate ester and anhydride reactions *Biochim. Biophys. Acta* 223: 1-15.
7. Hayes M. D., Kenyon, L. G. And Kollman, A. P. (1978). Theoretical calculations of the hydrolysis energies of some "high-energy" molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 100:4331-4340.
8. de Meis, L. (1984) Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca, Mg and water to the free energy of hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 259, 6090-6097.
9. Williams, R. and Wolfenden, R. (1985). Solvent Water and the Biological Group-Transfer Potential of phosphoric and Carboxylic Anhydrides. *J. Amer. Chem. Soc.* 107:4345.
10. Kirby, A. J., Lima, M. F. da Silva, D. and Nome, F. (2004). Nucleophilic Attack by Oxyanions on a Phosphate Monoester Dianion: The Positive Effect of a Cationic General Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 126(5), 1350 – 1351
11. de Meis, L., Behrens, M. I., Petretski, J. H. and Politi, M. J. (1985). Contribution of water to free energy of hydrolysis of pyrophosphate. *Biochemistry* 24(26):7783-9.
12. Romero, P. J. and de Meis, L. (1989). Role of water in the energy of hydrolysis of phosphoanhydride and phosphoester bonds. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, Issue 14, 7869-7873.
13. de Meis, L. (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 287-296.
14. de Meis, L., Behrens, M. I., Celis, H., Romero, I., Gomez Puyou, M. T. and Gomez-Puyou, A. (1986). Orthophosphate-pyrophosphate exchange catalyzed by soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases. Role of H<sup>+</sup> gradient. *Eur J Biochem* 158(1):149-57.
15. Behrens, M. I. and de Meis L. (1985). Synthesis of pyrophosphate by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* in the light and by soluble yeast inorganic pyrophosphatase in water-organic solvent mixtures. *Eur J Biochem.* 152(1):221-7.
16. Boyer, P. D., Ross, R. L. And Momsen, W. (1973). A new concept for coupling in oxidative phosphorylation based on the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2873-2839.
17. de Meis, L. (1989) Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds. Energy transduction in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 973(2):333-49.
18. de Meis, L., and A. L. Vianna (1979) Energy interconversion by the Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 275-292.
19. Wilkinson, K. D. and Rose, I. A. (1979) Activation of yeast hexokinase PII. Changes in conformation and association *J. Biol. Chem.* 1979 254: 2125-2131.
20. Pedersen, P.L., and Carafoli, E. (1987) Ion Motive ATPases. I. Ubiquity, Properties and Significance to Cell Function. *Trends in Biochem. Sci.* 12, 146-150.
21. Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H. (1989) Location of high affinity Ca<sup>2+</sup>-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Nature* 339(6224): 476-8.
22. Inesi, G., Cantilina, T., Yu, X., Nikic, D., Sagara, Y., Kirtley, M. E. (1992) Long-range intramolecular linked functions in activation and inhibition of SERCA ATPases. *Ann N Y Acad Sci.* 671:32-47; discussion 48.
23. Hibberd, M. G., and. Trentham, D. R. (1986). Relationships between chemical and mechanical events during muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biochem.* 15:119-161.
24. Goldman, Y. E. and Brenner, B. (1987) Special topic: molecular mechanism of muscle contraction. General introduction. *Annu Rev Physiol.* 49:629-36.
25. Goldman Y. E. (1987) Measurement of sarcomere shortening in skinned fibers from frog muscle by white light diffraction. *Biophys J.* 52(1):57-68.
26. de Meis, L., de Souza Otero, A., Martins, O. B., Alves, E. W., Inesi, G. and Nakamoto, R. (1982). Phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate in the absence of Ca<sup>2+</sup>



- gradient. Contribution of water activity to the enthalpy and the entropy changes. *J Biol Chem.* 257(9):4993-8.
27. Moraes, V. L. and de Meis, L. (1987). ATP synthesis by the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase in the absence of an ionic gradient. Effects of organic solvent. *FEBS Lett.* 222(1):163-6.
28. Boyer, P. D., Cross, R. L. And Momsen, W. (1973). A new concept for coupling in oxidative phosphorylation based on the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2873-2839.
29. Sakamoto, J. and Tonomura, Y. (1983). Synthesis of enzyme-bound ATP by mitochondrial soluble F<sub>1</sub>-ATPase in the presence of dimethylsulfoxide. *J Biochem (Tokyo)*. 1983 Jun;93(6):1601-14.
30. Gómez-Puyou, A., Gómez-Puyou, M. T. and de Meis, L. (1986). Synthesis of ATP by soluble mitochondrial F<sub>1</sub> ATPase and F<sub>1</sub>-inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur J Biochem.* 159(1):133-40.
31. Cross, R.L., Cunningham, D. and Tamura, J.K. (1984). Binding change mechanism for ATP synthesis by oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Curr Top Cell Regul.* 24:335-44.
32. Boyer, P. D. (1997). *Energy, Life and ATP. Nobel Lectures, Chemistry 1996-2000*, ed. Ingmar Grenthe, World Scientific Publishing Co.
33. Lowell, B.B. and Spiegelman B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptative thermogenesis. *Nature (London)* 404, 652-660.
34. de Meis, L. (2000). ATP synthesis and heat production during Ca<sup>2+</sup> efflux by sarcoplasmic reticulum Ca(2<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 35-39.
35. de Meis, L. (2001). Role of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci. Rep.* 21, 113-137.
36. Chinet, A. E., A. Decrouy, and P. C Even. (1993) Ca<sup>2+</sup> dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 455: 663-678.
37. de Meis, L. (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropic energy. *Arch Biochem Biophys.* 306(2):287-96.
38. Dumonteil, E., H. Barré, and G. Meissner (1993) Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am. J. Physiol.* 265 (Cell Physiol. 34): C507-C513.
39. Dumonteil, E., H. Barré, and G. Meissner (1995) Expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport proteins in cold-acclimating ducklings. *Am. J. Physiol.* 269 (Cell Physiol. 38): C955-C960.
40. Jansky, L. (1995) Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol. Rev.* 75: 237-259.
41. de Meis, L., M. L. Bianconi, and V. A. Suzano (1997). Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production. *FEBS Lett.* 406: 201-204.
42. de Meis, L. (1998). Control of heat produced during ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the absence of a Ca<sup>2+</sup> gradient. *Biochem Biophys Res Commun.* 243(2):598-600.
43. de Meis, L. (1998). Control of heat production by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 274, C1738-C1744.
44. Wolosker, H., Engelender, S. and de Meis, L. (1998). *Adv. Mol. Cell Biol.* 23A, 1-31.
45. Mitidieri, F., and de Meis, L. (1999). Ca<sup>2+</sup> release and heat production by the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase of blood platelets. Effect of the platelet activating factor. *J. Biol. Chem.* 274, 28344-28350.
46. Lowell, B. B., Spiegelman, B. M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 404 (6778):652-60.
47. de Meis, L. (2001). Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Regulation by ADP. *J Biol Chem.* 276(27):25078-87.
48. Szoke, A., Scott, W. G. And Hadju, J. (2003) Catalysis, evolution and life. *FEBS Lett.* 2003 Oct 9;553(1-2):18-20.
49. Arruda, A. P., Da-Silva, W. S., Carvalho, D. P. and De Meis L. (2003). Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochem J.* 375 (Pt 3):753-60.

## LOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE ALTA Y BAJA ENERGÍA

### Resumen.

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

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

### Semblanza del Dr. Leopoldo de Meis.



El Dr. Leopoldo de Meis es Profesor Titular de Bioquímica Médica de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. Ha recibido numerosos premios, entre los que destacan el Premio de Química otorgado por la Academia de Ciencias del tercer Mundo, el premio N. van Uden, de la Universidad de Coimbra, Portugal, además de los premios "Ordem Nacional do Mérito Científico y do Mérito Educação - Classe Grã Cruz y Classe Comendador" del gobierno brasileño. Es "Doctor Honoris Causa" por la Universidad Católica de Louvain, Bélgica y Doctor Honoris Causa" por la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Ha publicado más de 160 artículos de investigación, y a la fecha ha dirigido 30 tesis de maestría y 29 de doctorado. Ha sido invitado como expositor a diferentes foros científicos a lo largo del planeta y a reuniones mundiales relacionadas con el uso que debe darse a la ciencia. Ha formado parte del comité editorial de diversos libros y revistas. Una parte muy importante de su desarrollo como profesor ha sido el área docente en donde tiene publicados varios libros y artículos. Últimamente su interés por hacer atractiva y accesible la bioquímica para los alumnos de medicina y carreras afines, lo ha llevado a diseñar materiales en CD-ROM en los cuales explica, combinando la ciencia y el arte, el funcionamiento de diversas partes del metabolismo energético.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## PHOSPHATE COMPOUNDS OF HIGH AND LOW ENERGY.

Leopoldo de Meis and Gutemberg G. Alves

Depto Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, CEP 21.941-590 Brazil

[demeis@bioqmed.ufri.br](mailto:demeis@bioqmed.ufri.br)

### LOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE ALTA Y BAJA ENERGÍA

#### Resumen.

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

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

## Introduction

Energy is a central issue in life and in order to survive, living organisms have found several ways to continuously interconvert the different forms of energy available in the environment. Phosphate compounds are the common biological currency of energy exchange and adenosine triphosphate (ATP) is the most important energy carrier in the cell. A group of enzymes known as **ATPases** are able to convert the energy derived from ATP hydrolysis into work (muscle contraction), ion transport ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$ -ATPase) or even light production (fireflies *luciferase*). Not all the energy derived from the hydrolysis of phosphate compounds is converted by enzymes into work; a significant part of the total energy released is dissipated in the surrounding environment as heat.

Two general concepts are commonly found in most Biochemistry text books: first, that the energy derived from hydrolysis of phosphate compounds is only liberated at the precise moment of the phosphate bond hydrolysis and second, that the amount of energy released and the fraction of it that is converted into heat is always the same regardless of whether the compound is cleaved in solution or on the enzyme surface. In other words, enzymes would act as mere catalyst, having no effect on the energy of hydrolysis of the substrate nor would they be able to control the fraction of total energy liberated which is converted into heat.

These two concepts are no longer valid. We now know that the energy of phosphate compounds hydrolysis varies greatly depending on whether it is in solution or bound to the enzyme. Moreover, for enzymes involved on energy transduction, the energy used to perform work becomes available **before** cleavage of the phosphate compound. Evidence obtained during the past 5 years indicate that ATPases can modulate the conversion of energy during the catalytic cycle determining the fraction of energy derived from the phosphate compound which will be converted into work and the fraction to be converted into heat.

In this work, we will discuss the processes of energy transduction, the notion of high and low energy phosphate compounds, and how some ATPases can control and regulate the amount of energy directed to work or to heat production. This concept is important for the understanding of thermogenesis and its role on cold resistance, control of body weight, and the mechanism several diseases like hyperthyroidism and adiposity, that are associated with misregulation of thermogenesis.

## Phosphate compounds of high and low energy

### *The initial concept*

The history of ATP dates back to the late 1920's when Fiske and Subbarow [1] were searching for a method that allowed the measurement of inorganic phosphate (Pi) in animal tissues. During the course of their experiment, they purified ATP and creatine phosphate from animal tissues. At the time of their discovery, the physiological importance of these phosphate compounds was not known. It took several years to discover that these compounds were energy carriers and their cleavage provided the energy needed for muscle contraction. It was only in 1941 that the concept of "energy-rich" and "energy-poor" phosphate compounds was formally presented by Lipmann [2] in a review where he analyzed the data obtained in his and other laboratories. On the basis of the knowledge available at that time, Lipmann proposed that:

- (i) The energy that could be derived from the hydrolysis of a phosphate compound would depend exclusively on the chemical nature of the bond that links the phosphate residue to the rest of the molecule. The N-P bond of *creatine phosphate*, the enol phosphate of *phosphoenolpyruvate*, the phosphoanhydride linkages of ATP and PPi, and the acyl phosphate bond of *aspartyl phosphate* were typical energy-rich phosphate bonds.

- (ii) Energy-rich phosphate bonds would be those who presented a high equilibrium constant ( $K_{eq}$ ) for the hydrolysis in water and conversely, energy-poor phosphate bonds would have a low equilibrium constant of hydrolysis. In this view, phosphoesters such as glucose-6-phosphate and glycerol phosphate would be typical phosphate compounds of low energy.
- (iii) The transfer of a phosphate from one molecule to another was thought to depend only on the energy of hydrolysis of the chemical bonds. Thus, the gamma phosphate of ATP can be transferred to a molecule of glucose forming glucose-6-phosphate, but in physiological conditions, the reverse reaction would not be possible unless extra energy would be provided to the system. Thus, the only way to regenerate any ATP hydrolyzed in the cell would be to spend phosphate compounds of equal or higher energy than ATP itself, such as creatine phosphate.

In the early forties, little was known about proteins structure and mechanism of enzyme catalysis. Therefore, in Lipmman's review it was implied that the energy of hydrolysis of phosphate compounds would be the same regardless of whether they were bound to the enzyme or free in solution.

On the basis of the formulations described above, the sequence of events during the process of energy transduction in enzymes was thought to be:

- (i) The enzyme binds ATP;
- (ii) ATP is hydrolyzed and energy is released at the catalytic site at the precise moment of the phosphate bond cleavage.
- (iii) The energy is immediately absorbed by the enzyme and used to perform work.

For the synthesis of ATP from ADP and  $P_i$ , the sequence of events would be the same, but in the reverse order:

- (i) The enzyme now would bind ADP and  $P_i$ ;
- (ii) An energy input at the catalytic site would be needed to drive the synthesis of ATP;
- (iii) Once formed, the ATP molecule would dissociate from the enzyme and diffuse into the cytosol without any further need of energy.

From these sequences, it was inferred that the work would be performed in a part of the enzyme molecule where energy is released i. e., in the immediate vicinity of the catalytic site. These concepts remained undisputed from the time of Lipmann review in 1941 until 1970. During this period, most work was of a theoretical nature and the "high energy" nature of the phosphate bond was thought to be dependent on intramolecular effects such as opposing resonance, eletrostatic repulsions and electron distribution along the molecule backbone [3-5].

Thus, the high  $K_{eq}$  for the hydrolysis of pyrophosphate and ATP, was thought to be determined by the negative charges and opposing resonance of the P-O-P linkage. The negative charge on either side of the linkage would repel each other, creating tension within the molecule and the opposing resonance would generate points of weakness along the backbone. As a result, it would be easy to cleave the molecule and difficult to bring together the products of the

hydrolytic reaction. The combination of these two factors would be responsible for the high equilibrium constant (K<sub>eq</sub>) for the hydrolysis of ATP or PPi phosphoanhydride bonds.

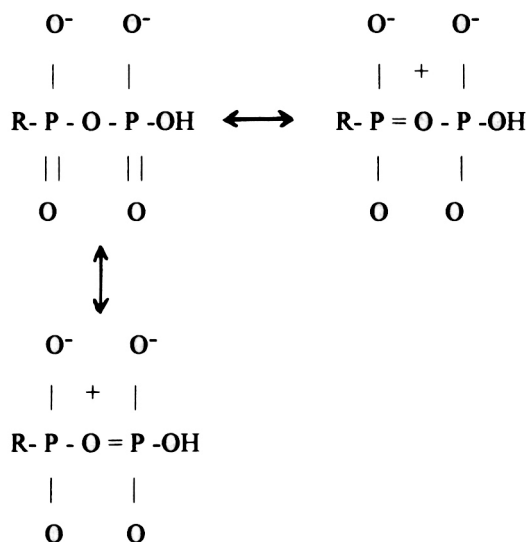


Figure 1. The resonating forms of the pyrophosphate moiety.

#### *New concepts - theoretical approach*

In 1970 George and co-workers [6], reasoned that in biological systems phosphate compounds are in solution and thus, interact strongly with water (Table 1). It will be therefore expected that water molecules should organize themselves around the phosphate compound and this would both shield the charges of the molecule, thus neutralizing the electrostatic repulsion, and in addition, form bridges between different atoms of the molecule, thus reinforcing the weak points generated along the molecule backbone by opposing resonances. George and co-workers proposed that the equilibrium constant for the hydrolysis of a phosphate compound should be determined by the differences in solvation energies of reactants and products and not by intramolecular effects as previously proposed [3,4].

Solvation energy is the amount of energy needed to remove the solvent molecules that organize around a substance in solution. A more solvated molecule is more stable or less reactive than a less solvated molecule and the K<sub>eq</sub> for hydrolysis would be determined by the difference of solvation energy between reactants and products. In this view, the K<sub>eq</sub> of a reaction is high when the products are more solvated than the reactants.

Notice in Table 1 that the solvation energies of Pi varies from 76 to 637 kcal/mol and for PPi, it varies between 87 and 584 kcal/mol. In water, the measured free energy of hydrolysis of PPi varies between -3 and -6 Kcal/mol (Table 2). This represents a very small fraction of the total solvation energy of Pi and pyrophosphate (Table 1). Thus, a small change in the organization of the solvent around the molecules of reactants and products would be sufficient to account for the measured energy of hydrolysis of pyrophosphate. The work of George and co-workers remained unnoticed for several years. It was only in 1978 that the solvation theory was revised and substantiated by Hayes and coworkers [7]. These authors calculated the energy of hydrolysis of

several phosphate compounds in gas phase, a situation in which reactants and products are no longer solvated and compared these values with those measured in water (Table 2).

**Table 1. Solvation energies of different ionic forms of inorganic phosphate and pyrophosphate**

| Molecule                                                   | Solvation Energy<br>Kcal/mol |
|------------------------------------------------------------|------------------------------|
| H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>                | 76                           |
| HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>                             | 299                          |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>                              | 637                          |
| H <sub>3</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>  | 87                           |
| H <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> | 134                          |
| HP <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>               | 358                          |
| P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup>                | 584                          |

*Values reported by George et al. (1970). Solvation energy is defined as the energy necessary to complete removal of the solvation water from the compound.*

**Table 2. Energy of hydrolysis of different phosphate compounds in totally aqueous medium, gas phase and mixtures of water with organic solvents**

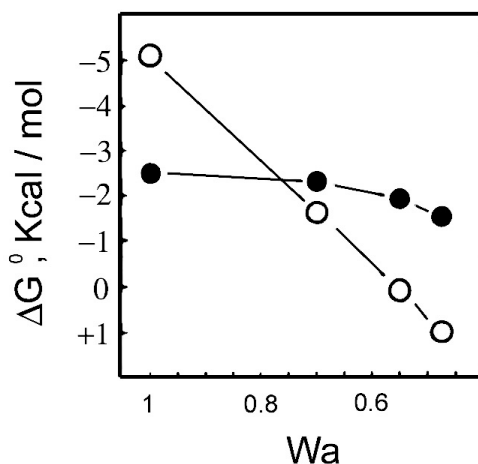
| Compound            | $\Delta G^0$ (Kcal/mol) |               | Organic solvent mixtures |
|---------------------|-------------------------|---------------|--------------------------|
|                     | Water                   | Gas phase     |                          |
| ATP                 | -7.0 to -9.0            | ---           | +0.3                     |
| PPi                 | -3.0 to -6.0            | -0.4 to -0.9  | -1.0 to +2.0             |
| Aspartyl phosphate  | -9.0 to -11.0           | +5.0 to +32.0 | +0.3 to +2.3             |
| Creatine phosphate  | -9.0 to -11.0           | +9.0 to +212  | ---                      |
| Glucose 6-phosphate | -1.5 to -3.0            | -1.5 to -2.5  | -1.5 to -2.5             |

*For details, see reference [13, 17]. Standard Free energy of hydrolysis equation is  $\Delta G^0 = -RT \ln (K_{eq})$ , where  $R$  is the universal gas constant ( $1.981 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  the absolute temperature and  $K_{eq}$  the equilibrium constant of the reaction. A negative  $\Delta G$  gives a high  $K_{eq}$ , favouring the reaction.*

In aqueous solution, acetyl phosphate and the N~P bonds of phosphocreatine and phosphoarginine are of a high energy nature. However, in the gas phase this is no longer true. On the contrary, positive free energy of hydrolysis indicates that when reactants and products are not solvated, acetyl phosphate and phosphocreatine are more stable than the products of their hydrolysis, and according to Lipmann's definition, they behave as "energy poor" phosphate compounds. Interestingly, the concept of solvation energy seems to be valid only for the "high energy" and not for the "low energy" phosphate compounds because the values calculated for the energies of hydrolysis of glucose 6-phosphate and others phosphoesters were the same regardless of whether the molecules were in aqueous solutions or in gas phase [7].

*Experimental measurements*

Starting in 1984 we became interested in the solvation theory first proposed by P. George. The motivation was the discovery that the same chemical specie, an acyl phosphate residue, would have different energies of hydrolysis depending on whether was in solution (water) or on the enzyme surface. This will be discussed below in a different section. In order to test the experimentally the solvation theory, we measured in our laboratory the energy of hydrolysis of pyrophosphate in media with different water activities. The strategy adopted was to measure the  $K_{eq}$  in aqueous media containing different concentrations of organic solvents. In agreement with the solvation theory proposal, we found that a discrete change of the water activity was sufficient to promote a drastic change of pyrophosphate energy of hydrolysis (Figure 2).



**Figure 2. Effect of water activity on the energies of hydrolysis of PPI and glucose 6-phosphate.** Empty circles represent PPI and full circles represent glucose 6-phosphate. For experimental details, see [13].

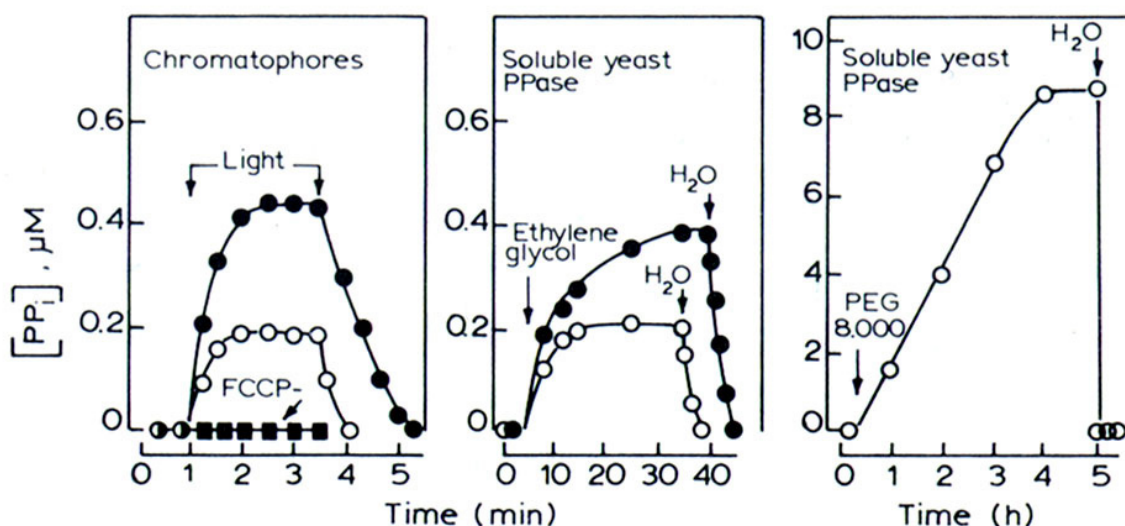
In totally aqueous media ( $W_a = 1$ ) the  $\Delta G^\circ$  of PPI hydrolysis was -5 kcal/mol, but it raised to +1 kcal/mol when the water activity of the medium was decreased to 0.5 [8]. Thus, depending on the water activity of the medium, pyrophosphate could change from a "high energy" to a "low energy" compound. One year later Wolfenden and Williams [9] found that ATP could be spontaneously synthesized in wet chloroform and recently Kirby et al. [10] observed that acetyl phosphate can be spontaneously synthesized in a media with a decreased water activity. Contrasting with PPI, ATP and acyl phosphate residues, water activity was found to have practically no effect on the energy of hydrolysis of phosphoesters such as glucose-6-phosphate. Thus, in totally aqueous medium, PPI behaves as a high energy compound when compared to glucose 6-phosphate, but in an hydrophobic environment ( $W_a = 0.5$ ) glucose 6-phosphate becomes a phosphate compound with a higher energy of hydrolysis than pyrophosphate (figure 2) [8,11,12]. These effects of  $W_a$  on the free energy of hydrolysis of PPI and glucose-6-phosphate can be easily interpreted according to the solvation energy theory [6,12,13], but difficult to accommodate with the Lipmann proposal (1941). If the energy of the reaction would be determined solely by the nature of the phosphate bond cleaved as proposed in the early forties, then the energy of hydrolysis of PPI should not depend on the  $W_a$  of the medium and always be higher than that of glucose-6-phosphate regardless of the conditions used.



More than contributing to the understanding of the chemical nature of high and low energy phosphate compounds, these findings have important physiological implications in biological processes of energy transduction. One example is the photosynthetic synthesis of pyrophosphate discussed below.

### Pyrophosphate of high and low energy

The chromatophores of the photosynthetic bacteria *R. rubrum* retain a membrane-bound inorganic pyrophosphatase that synthesizes pyrophosphate when an electrochemical proton gradient is formed across the chromatophores membrane upon illumination. When the light is turned off (dark), the pyrophosphate previously synthesized is cleaved by the membrane bound enzyme (Figure 3).



**Figure 3. Synthesis of pyrophosphate by chromatophores of *R. rubrum* and soluble yeast inorganic pyrophosphatase (PPase).** Full circles are in the presence of 1 mM Pi and empty circles in the presence of 2 mM Pi. Square represents the presence of an  $H^+$  ionophore (FCCP). In the middle panel the solvent used was ethylene glycol and in right it was poly(ethylene glycol) 8000. For details, see [15].

The cycle of energy transduction measured with the chromatophores can be mimicked by a soluble pyrophosphatase, without the need of either membrane, chlorophyll or light [14,15]. The soluble enzyme is able to synthesize pyrophosphate in the dark when the water activity of the medium is reduced by the addition of organic solvents to the medium. In this condition, the  $\Delta G^\circ$  of PPI hydrolysis has a positive value, i.e., PPI is not a high energy compound and is spontaneously synthesized (Figure 3). If we then dilute the medium with water, so as to decrease the concentration of organic solvent and increase the  $W_a$  activity of the medium, then the PPI previously synthesized is cleaved by the enzyme because now the PPI has become a "high energy compound" with a high  $K_{eq}$  for the hydrolysis. These experiments indicate that: (a) a decrease in  $W_a$  may play a role in the mechanism by which the energy derived from electrochemical gradient generated by light is used for the synthesis of PPI in *R. rubrum* chromatophores and (b) for the synthesis of pyrophosphate, energy is not needed for the formation of the covalent bond of pyrophosphate as thought in the early forties, but rather to

change the environment from a low to a high water activity. In the first environment the PPI is a low energy phosphate compound and it is spontaneously formed while in the second environment PPI becomes a high energy phosphate compound.

### Conversion of phosphate bonds from high into low energy at the catalytic site of enzymes

During the past four decades the catalytic cycle of several enzymes involved in processes of energy transduction has been elucidated [16-22]. These studies revealed that the energy of hydrolysis of different phosphate compounds varies greatly depending on whether they are in solution or bound to enzyme (Table 3). Reactions that were thought to be practically irreversible in aqueous solution were found to occur spontaneously when the reactants are bound to the enzyme. According to these findings, the energy for work does not become available to the enzyme at the moment of the phosphate compound cleavage.

**Table 3. Variability of the energy of hydrolysis of phosphate compounds during the catalytic cycle of energy transducing enzymes**

| Enzyme                                    | Reaction                      | Solution<br>(Before work) |                            | Enzyme bound<br>(after work) |                            |
|-------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                                           |                               | <i>Keq</i><br>(M)         | $\Delta G^0$<br>(Kcal/mol) | <i>Keq</i><br>(M)            | $\Delta G^0$<br>(Kcal/mol) |
| Ca <sup>2+</sup> -ATPase                  | Aspartyl phosphate hydrolysis | 10 <sup>6</sup>           | -8,4                       | 1,0                          | 0                          |
| (Na <sup>+</sup> + K <sup>+</sup> )ATPase | ATP hydrolysis                | 10 <sup>6</sup>           | -8,4                       | 1,0                          | 0                          |
| F1-ATPase,<br>Myosin                      | PPI hydrolysis                | 10 <sup>4</sup>           | -5,6                       | 0,5                          | -0,9                       |
| Inorganic<br>Pyrophosphatase              | ATP + glucose → Glc-P + ADP   | 2x10 <sup>3</sup>         | -4,6                       | 1,0                          | 0                          |
| Hexokinase                                |                               |                           |                            |                              |                            |

*For details, see reference [13, 17]. Standard Free energy of hydrolysis equation is  $\Delta G^0 = -RT \ln Keq$ , where *R* is the gas constant (1.987 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), *T* the absolute temperature, and *Keq* the equilibrium constant of the reaction. A negative  $\Delta G$  gives a high *Keq*, favouring the reaction.*

For the ion transport ATPases, the energy needed to translocate ions across the membrane becomes available before cleavage of the phosphate compound [17]. During the catalytic cycle there is a large decrease in the *Keq* for the hydrolysis of the phosphate compound bound to the enzyme (acyl phosphate residue) and transport across the membrane is coupled with this transition of the *Keq* and not with the cleavage of the phosphate compound. Hydrolysis seems necessary only to permit the dissociation of products of the hydrolysis from the enzyme and not to provide energy to the system.

For the actomyosin ATPase, the energy becomes available when ADP and (or) Pi dissociates from the enzyme and not when ATP is hydrolyzed [23-25]. The *Keq* for the hydrolysis of ATP at the catalytic site of actomyosin is about 1, i.e., the hydrolysis of ATP does not involve a significant change of free energy.

According to these new findings, the sequence of events for the transduction of energy in either transport ATPases or actomyosin seems to be:

- (A) The enzyme binds ATP or other phosphate compounds;

- (B) The enzyme performs work without the phosphate compound being hydrolyzed. This is accompanied by a decrease in the energy level of the phosphate compound;
- (C) The phosphate compound is cleaved and the products of hydrolysis dissociate from enzyme in a process which involves a relatively small energy change.

In the reverse process, phosphate compounds such as ATP, PPI and acyl phosphate residue are synthesized on the hydrophobic environment of the enzyme's catalytic site without the need of energy, i. e, energy is then needed for the conversion of the phosphate compound from "low-energy" into "high-energy". This conversion would be accompanied by an hydrophobic (low  $W_a$ ) - hydrophilic (high  $W_a$ ) transition at the catalytic site of the enzyme. For the synthesis of ATP (mitochondrial ATP synthase) and PPI, this involves a conformational change of the protein that allows the dissociation of ATP and PPI into the hydrophilic assay medium. For transport ATPases such as the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, the hydrophobic-hydrophilic transition occurs at the catalytic site. The information now available on the structure of transport ATPases indicates that work is performed in a region of the tertiary structure of the protein distant from the region where the catalytic site is located and that conformational changes of the protein synchronize the sequence of events occurring in these two regions [21-22].

The proposal that the conversion of the phosphate compound from "low "into "high energy" is promoted by a change of the  $W_a$  at the catalytic site of enzymes has been substantiated in measurements of the enzyme activity in media with different  $W_a$ . It was demonstrated that enzymes which use the energy of a chemical gradient to synthesize ATP from ADP and Pi are able to promote this synthesis even in the absence of the gradient, simply by oscillating water activity of the medium. This was first demonstrated with the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [17,26],  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  [27] and the soluble mitochondrial F1-ATPase [28-32]. In the later case, the addition of organic solvent promoted a dramatic decrease of the apparent  $K_m$  of the enzyme for Pi and a large increase in the amount of "tightly bound" ATP formed at the catalytic site of the F1-ATPase.

### Energy transduction and heat production in transport ATPases

In reactions involving energy transduction, only a part of the chemical energy released during the hydrolysis of ATP is converted into work or other forms of energy such as osmotic energy. The other part is converted into heat, and in endothermic animals, the heat released is used to maintain a constant and high body temperature.

Interest in heat production and thermogenesis has increased during the past decade due to its implications in health and disease. Alterations of thermogenesis are noted in several disorders, such as control of body weight and endocrine dysfunction [33]. The thyroid hormone T3 (3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine) is involved in the thermal regulation of vertebrates, and in hyperthyroidism there is a decrease of body weight, and an increase of both the basal metabolism and the rate of heat production [34].

Until a few years ago, it was assumed that the amount of heat produced during the hydrolysis of an ATP molecule was always the same and could not be modulated by enzymes, as if the energy released during ATP hydrolysis were to be divided in two non-interchangeable parts: one would be converted into heat, the other used for work. Contrasting with this view, recently it was found that some enzymes are able to handle the energy derived from ATP hydrolysis in such a way as to determine how much is used for work and how much is dissipated as heat [35-46]. In this view, the total amount of energy released during ATP hydrolysis is always the same, but the fraction of the total energy that is converted into work or heat seems to be modulated by the

enzyme. This was first shown for the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and later, for hexokinase [47] and plants pyrophosphatase [48].

For the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase it was found that the amount of heat released during ATP hydrolysis varies depending on whether the acyl phosphate residue formed by ATP is cleaved before or after its conversion from "high" into "low" energy [40-42,46].  $\text{Ca}^{2+}$  transport across the membrane takes place during this conversion. If cleavage occurs when the acyl phosphate has a high energy of hydrolysis (hydrophilic environment at the catalytic site) then all the energy derived from the cleavage is converted into heat and none is used for  $\text{Ca}^{2+}$  transport. Conversely, when the low energy acyl phosphate is cleaved (hydrophobic environment at the catalytic site) most of the energy was already used for  $\text{Ca}^{2+}$  transport and little was left available to be converted into heat. Regulation of heat production depends therefore on the ratio between high and low energy acyl phosphate residues cleaved during catalysis. There are several sarco / endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) isoforms and the amount of heat produced during ATP hydrolysis and  $\text{Ca}^{2+}$  transport varies depending on the isoform used. This variability was found to depend on the frequency of the high energy acyl phosphate residue cleavage [44]. The thyroid hormone T3 regulates the expression of the various SERCA isoforms. In hyperthyroidism, a condition where the rate of heat production is increased, the SERCA isoforms that produce more heat (SERCA 1) is over expressed. Recently, it was shown that the administration of T4 (a precursor of T3) to rabbits promotes an increase in the rates of both the uncoupled ATPase activity and heat production in sarcoplasmic reticulum vesicles, in a fashion dependable of the muscle type used [49]. This may suggest that  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase uncoupled activity may be one of the heat sources contributing to enhanced thermogenesis in hyperthyroidism.

## References

1. Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1927). The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 65: 401.
2. Lipmann, F. (1941). Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Advances in Enzymology* 1 : 99-162.
3. Kalckar, M. (1941). An activator of the hexokinase system. *J. Biol. Chem.* 137: 789-790.
4. Boyd, D. B. and Lipscomb, W. N. (1969). Electronic structures for energy-rich phosphates. *J. Theor. Biol.* 25: 403-420.
5. Hill, T. L. And Morales, M.H. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1656-1660.
6. George, P. Witonsky, R.J. Trachtman, M. Wu, C. Dorwatr, W., Richman, L. Richman, W., Shuray, F. And Lentz, B. (1970). An enquiry into the importance of solvation effects in phosphate ester and anhydride reactions *Biochim. Biophys. Acta* 223: 1-15.
7. Hayes M. D., Kenyon, L. G. And Kollman, A. P. (1978). Theoretical calculations of the hydrolysis energies of some "high-energy" molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 100:4331-4340.
8. de Meis, L. (1984) Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca, Mg and water to the free energy of hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 259, 6090-6097.
9. Williams, R. and Wolfenden, R. (1985). Solvent Water and the Biological Group-Transfer Potential of phosphoric and Carboxylic Anhydrides. *J. Amer. Chem. Soc.* 107:4345.
10. Kirby, A. J., Lima, M. F. da Silva, D. and Nome, F. (2004). Nucleophilic Attack by Oxyanions on a Phosphate Monoester Dianion: The Positive Effect of a Cationic General Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 126(5), 1350 – 1351
11. de Meis, L., Behrens, M. I., Petretski, J. H. and Politi, M. J. (1985). Contribution of water to free energy of hydrolysis of pyrophosphate. *Biochemistry* 24(26):7783-9.
12. Romero, P. J. and de Meis, L. (1989). Role of water in the energy of hydrolysis of phosphoanhydride and phosphoester bonds. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, Issue 14, 7869-7873.
13. de Meis, L. (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 287-296.
14. de Meis, L., Behrens, M. I., Celis, H., Romero, I., Gomez Puyou, M. T. and Gomez-Puyou, A. (1986). Orthophosphate-pyrophosphate exchange catalyzed by soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases. Role of H<sup>+</sup> gradient. *Eur J Biochem* 158(1):149-57.

15. Behrens, M. I. and de Meis L. (1985). Synthesis of pyrophosphate by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* in the light and by soluble yeast inorganic pyrophosphatase in water-organic solvent mixtures. *Eur J Biochem.* 152(1):221-7.
16. Boyer, P. D., Ross, R. L. And Momsen, W. (1973). A new concept for coupling in oxidative phosphorylation based on the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 70:2873-2839.
17. de Meis, L. (1989) Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds. Energy transduction in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 973(2):333-49.
18. de Meis, L., and A. L. Vianna (1979) Energy interconversion by the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 275-292.
19. Wilkinson, K. D. and Rose, I. A. (1979) Activation of yeast hexokinase PII. Changes in conformation and association *J. Biol. Chem.* 1979 254: 2125-2131.
20. Pedersen, P.L., and Carafoli, E. (1987) Ion Motive ATPases. I. Ubiquity, Properties and Significance to Cell Function. *Trends in Biochem. Sci.* 12, 146-150.
21. Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H. (1989) Location of high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Nature* 339(6224): 476-8.
22. Inesi, G., Cantilina, T., Yu, X., Nikic, D., Sagara, Y., Kirtley, M. E. (1992) Long-range intramolecular linked functions in activation and inhibition of SERCA ATPases. *Ann N Y Acad Sci.* 671:32-47; discussion 48.
23. Hibberd, M. G., and. Trentham, D. R. (1986). Relationships between chemical and mechanical events during muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biochem.* 15:119-161.
24. Goldman, Y. E. and Brenner, B. (1987) Special topic: molecular mechanism of muscle contraction. General introduction. *Annu Rev Physiol.* 49:629-36.
25. Goldman Y. E. (1987) Measurement of sarcomere shortening in skinned fibers from frog muscle by white light diffraction. *Biophys J.* 52(1):57-68.
26. de Meis, L., de Souza Otero, A., Martins, O. B., Alves, E. W., Inesi, G. and Nakamoto, R. (1982). Phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  gradient. Contribution of water activity to the enthalpy and the entropy changes. *J Biol Chem.* 257(9):4993-8.
27. Moraes, V. L. and de Meis, L. (1987). ATP synthesis by the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  in the absence of an ionic gradient. Effects of organic solvent. *FEBS Lett.* 222(1):163-6.
28. Boyer, P. D., Cross, R. L. And Momsen, W. (1973). A new concept for coupling in oxidative phosphorylation based on the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 70:2873-2839.
29. Sakamoto, J. and Tonomura, Y. (1983). Synthesis of enzyme-bound ATP by mitochondrial soluble F1-ATPase in the presence of dimethylsulfoxide. *J Biochem (Tokyo).* 1983 Jun;93(6):1601-14.
30. Gómez-Puyou, A., Gómez-Puyou, M. T. and de Meis, L. (1986). Synthesis of ATP by soluble mitochondrial F1 ATPase and F1-inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur J Biochem.* 159(1):133-40.
31. Cross, R.L., Cunningham, D. and Tamura, J.K. (1984). Binding change mechanism for ATP synthesis by oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Curr Top Cell Regul.* 24:335-44.
32. Boyer, P. D. (1997). Energy, Life and ATP. Nobel Lectures, Chemistry 1996-2000, ed. Ingmar Grenthe, World Scientific Publishing Co.
33. Lowell, B.B. and Spiegelman B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature (London)* 404, 652-660.
34. de Meis, L. (2000). ATP synthesis and heat production during  $\text{Ca}^{2+}$  efflux by sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 35-39.
35. de Meis, L. (2001). Role of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci. Rep.* 21, 113-137.
36. Chinet, A. E., A. Decrouy, and P. C Even. (1993)  $\text{Ca}^{2+}$  dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 455: 663-678.
37. de Meis, L. (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropic energy. *Arch Biochem Biophys.* 306(2):287-96.
38. Dumonteil, E., H. Barré, and G. Meissner (1993) Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am. J. Physiol.* 265 (Cell Physiol. 34): C507-C513.
39. Dumonteil, E., H. Barré, and G. Meissner (1995) Expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport proteins in cold-acclimating ducklings. *Am. J. Physiol.* 269 (Cell Physiol. 38): C955-C960.
40. Jansky, L. (1995) Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol. Rev.* 75: 237-259.

41. de Meis, L., M. L. Bianconi, and V. A. Suzano (1997). Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production. FEBS Lett. 406: 201-204.
42. de Meis, L. (1998). Control of heat produced during ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the absence of a  $\text{Ca}^{2+}$  gradient. Biochem Biophys Res Commun. 243(2):598-600.
43. de Meis, L. (1998). Control of heat production by the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol. 274, C1738-C1744.
44. Wolosker, H., Engelender, S. and de Meis, L. (1998). Adv. Mol. Cell Biol. 23A, 1-31.
45. Mitidieri, F., and de Meis, L. (1999).  $\text{Ca}^{2+}$  release and heat production by the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of blood platelets. Effect of the platelet activating factor. J. Biol. Chem. 274, 28344-28350.
46. Lowell, B. B., Spiegelman, B. M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature. 404 (6778):652-60.
47. de Meis, L. (2001). Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Regulation by ADP. J Biol Chem. 276(27):25078-87.
48. Szoke, A., Scott, W. G. And Hadju, J. (2003) Catalysis, evolution and life. FEBS Lett. 2003 Oct 9;553(1-2):18-20.
49. Arruda, A. P., Da-Silva, W. S., Carvalho, D. P. and De Meis L. (2003). Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Biochem J. 375 (Pt 3):753-60.

## PHOSPHATE COMPOUNDS OF HIGH AND LOW ENERGY

### Abstract.

*Living organisms have evolved several ways to interconvert energy in its different forms, by using phosphate compounds such as adenosine triphosphate (ATP) as biological currency of energy exchange. ATPases are able to convert the energy derived from ATP hydrolysis into work. Also, a significant part of the total energy released may be dissipated in the surrounding environment as heat. In this work, we will review and discuss the processes of energy transduction, the notion of high and low energy phosphate compounds, and the evolution of two concepts: (i) that the energy derived from hydrolysis of phosphate compounds is only liberated before the hydrolysis of the phosphate bond and (ii) that the amount of energy released and the fraction of it that is converted into heat varies with the environment, e. g., if the compound is cleaved in solution or on the enzyme surface. We will also discuss some evidences indicating that ATPases can modulate the conversion of energy during the catalytic cycle determining the fraction of energy derived from the phosphate compound which will be converted into work and the fraction to be converted into heat. This concept is important for the understanding of thermogenesis and its role on cold resistance, control of body weight, and the mechanism several diseases like hyperthyroidism and adiposity, that are associated with misregulation of thermogenesis.*

**Keywords:** adenosin triphosphate, ATP; phosphate bond; ATPases; energy transduction; solvation; phosphate hydrolysis; pyrophosphate; thermogenesis.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL.

Alfredo Saavedra Molina, Elizabeth Calderón Cortés, Erick Sierra Campos,  
Christian Cortés Rojo, Francisco Javier Gaona Zamudio,  
Mónica Clemente Guerrero

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

Morelia, Mich. 58030

[saavedra@zeus.umich.mx](mailto:saavedra@zeus.umich.mx)

### PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF MITOCHONDRIAL NITRIC OXIDE

#### Abstract.

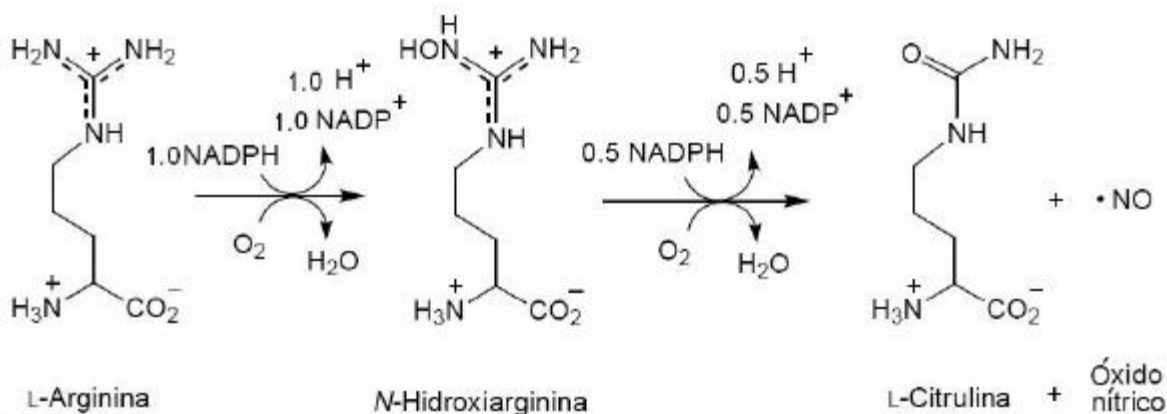
*The important role of nitric oxide (NO<sup>•</sup>) in biology has been subject of many studies in past decades. Some biological properties of NO<sup>•</sup> are mediated through increments of cyclic GMP (cGMP); however, other NO<sup>•</sup> functions are cGMP-independent. NO<sup>•</sup> is a gas that rapidly react with hemoproteins, thiols, and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Mitochondria possess hemoproteins such as cytochrome c oxidase (COX), proteins with thiols such as caspases, and it is the main producer of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Consequently, mitochondria is the main intracellular target for NO<sup>•</sup>. Physiological relevant concentrations of NO<sup>•</sup> react in a reversible manner and oxygen-concentration dependent with the active site of COX suggesting a competitive antagonism between NO<sup>•</sup> and O<sub>2</sub>. This reaction redeem a critical role in the regulation of mitochondrial oxygen consumption of many cell types, tissue and organs. The interaction of NO<sup>•</sup> with mitochondrial thiol proteins, such as caspase-3, is reversible and pH- and redox-dependent. This reaction is important in the mitochondrial machinery that regulate apoptosis. Also, the reaction between NO<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup> is particularly rapid and the product, peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), is a potent oxidant. The reactions of ONOO<sup>-</sup> with possible mitochondrial targets are irreversible and cause mitochondrial dysfunction, oxidative damage and apoptosis. The undesirable apoptotic reactions are involved in pathogenesis such as certain types of cancer. The discovery of the mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) has open new avenues in the field of the NO<sup>•</sup>. mtNOS is a constitutive, active*

enzyme that generates  $\text{NO}^\bullet$  in a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive manner, regulate oxygen consumption, electrochemical transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ), transmembrane  $\text{H}^+$  gradient ( $\Delta\text{pH}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and ATP synthesis. It has been reported the formation of  $\text{ONOO}^-$ , derived of the production of  $\text{NO}^\bullet$  by the  $\text{mtNOS}$ , that cause oxidative stress and the release of cytochrome  $c$  from mitochondria, an important event in apoptosis. In this review we attempt to describe the biological importance of mitochondrial nitric oxide and its pathophysiological role at the mitochondrial level.

**Keywords:** nitric oxide; mitochondria; nitric-oxide synthase; hypertension; free radicals; peroxynitrite.

### El óxido nítrico y la cadena respiratoria

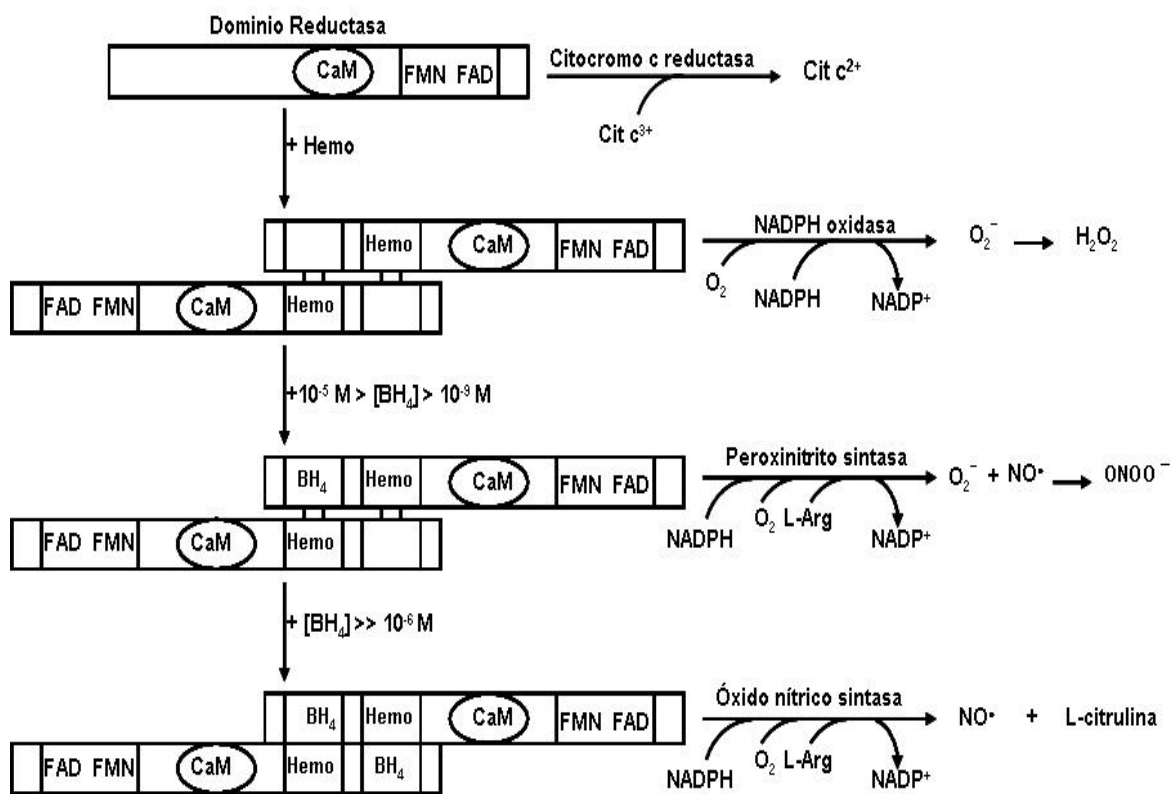
El óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) es un radical libre diatómico, de vida media corta y sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), cuya reacción se muestra en la Figura 1. El  $\text{NO}^\bullet$  es importante en la fisiología de muchos organismos, ya que está implicado en diversos procesos, tales como la neurotransmisión, la vasodilatación y la respuesta inmune. Diferentes isoformas de la NOS (Fig. 2) han sido caracterizadas: la NOS $\alpha$  y la NOS $\beta$  (también denominada, NOS neuronal y endotelial, respectivamente), las cuales se expresan de manera constitutiva (Tabla 1); la NOS $\gamma$  (NOS inducible) es sintetizada en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios; y por último la NOS $\text{mt}$  (NOS mitocondrial), la cual se ha sugerido es una modificación postraduccional de la NOS $\alpha$  (1). El  $\text{NO}^\bullet$  es capaz de reaccionar con metaloproteínas que contienen grupos hemo, con el oxígeno y con especies reactivas de oxígeno (ERO) (1).



**Figura 1. Reacción general catalizada por las NOSs.** La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación del amino guanidino de la L-arginina para generar óxido nítrico y L-citrulina, con la formación del intermediario  $\text{N}^\omega$ -Hidroxi-L-arginina. En esta reacción se transfieren 5 electrones. Tomada y modificada de Ghafourifar y Saavedra-Molina (88).



La cadena respiratoria mitocondrial transporta los electrones provenientes del metabolismo oxidativo hacia un aceptor final ( $O_2$ ) y acopla este proceso al bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. Este último proceso es responsable de la generación del potencial electroquímico transmembranal ( $\Delta\psi$ ) necesario para la síntesis de ATP y la homeostasis iónica en la mitocondria.



**Figura 2. Transiciones estructurales del dominio oxigenasa en la óxido nítrico sintasa neuronal.** El esquema muestra un modelo de activación de la NOSn por el grupo hemo y el cofactor  $BH_4$ . La NOSn en ausencia de los cofactores hemo y  $BH_4$ , actúa como una citocromo c reductasa (arriba). Al unir la NOSn al grupo hemo, la enzima se comporta como una NADPH oxidasa (centro). Por último, dependiendo de la disponibilidad de la  $BH_4$ , la NOSn tiene actividad tanto de peroxinitrito sintasa, como de óxido nítrico sintasa (abajo). Tomada y modificada de Mayer y Hemmens (90).

**TABLA 1.** Características de las isoformas de las NOSs.

| PARÁMETROS ENZIMÁTICOS Y ESTRUCTURALES | HOMODÍMEROS ACTIVOS                                     |                                                                   |                                      |                                                   |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                                        | NOSn (I)<br>neuronal                                    | NOSe (III)<br>endotelial                                          | NOSi (II)<br>inducible               | NOSmt<br>mitocondrial                             |
| Masa molecular                         | 160 kDa                                                 | 135 kDa                                                           | 125-130 kDa                          | 127 kDa                                           |
| Inducibilidad                          | Constitutiva                                            | Constitutiva                                                      | Inducible                            | Constitutiva                                      |
| Unión de Calmodulina (CaM)             | $\sim 30 \times 10^{-9}$ M                              | $\sim 30 \times 10^{-9}$ M                                        | $>> 30 \times 10^{-9}$ M             | $\sim 30 \times 10^{-9}$ M                        |
| Cofactores                             | FMN, FAD, BH <sub>4</sub> , HEMO, Zn                    | FMN, FAD, BH <sub>4</sub> , HEMO, Zn                              | FMN, FAD, BH <sub>4</sub> , HEMO, Zn | FMN, FAD, BH <sub>4</sub> , HEMO, Zn              |
| Sustratos                              | NADPH, L-arg, O <sub>2</sub>                            | NADPH, L-arg, O <sub>2</sub>                                      | NADPH, L-arg, O <sub>2</sub>         | NADPH, L-arg, O <sub>2</sub>                      |
| Variantes proteicas                    | Isoformas $\alpha, \beta, \gamma, \mu$                  | -----                                                             | -----                                | -----                                             |
| Localización celular                   | Citosol                                                 | Membrana plasmática                                               | Citosol                              | Membrana interna mitocondrial                     |
| Modificación post-traducciona          | Presenta sitios de fosforilación                        | Presenta sitios de palmitoilación, fosforilación y miristoilación | Presenta sitios de fosforilación     | Presenta sitios de fosforilación y miristoilación |
| Función fisiológica                    | Neurotransmisión                                        | Vasodilatador                                                     | Citotoxicidad                        | Regulador de la citocromo oxidasa                 |
| Papel en la enfermedad                 | Distrofia muscular ataque, daño de isquemia-reperfusión | Disfunción endotelial hipertensión                                | Choque tóxico inflamación            | Apoptosis                                         |

Tomada y modificada de Elfering (81).

Las proteínas que componen la cadena respiratoria contienen grupos prostéticos oxido-reductores unidos de manera covalente y no covalente, entre los que se encuentran diversos grupos hemo (a, b, c<sub>1</sub> y c), centros hierro-azufre y átomos de cobre (Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>B</sub>) (2). Por lo tanto, como se mencionó antes, el NO<sup>\*</sup> producido por la NOSmt es capaz de reaccionar con estos grupos prostéticos y alterar su actividad.

El blanco más sensible para el NO<sup>\*</sup> en la cadena respiratoria es la citocromo c oxidasa (COX o complejo IV), donde este radical se une al sitio de unión binuclear (hemo a<sub>3</sub>/Cu<sub>B</sub>) del oxígeno de dicho complejo (Esquema 1). La exposición a NO<sup>\*</sup> por períodos cortos de tiempo, y a concentraciones fisiológicas (50-100 nM), inhibe rápidamente al complejo IV mitocondrial de una manera reversible y competitiva con el oxígeno en mitocondrias de corazón (3), terminales nerviosas del cerebro (4), cultivos celulares (5) y el complejo IV aislado (6). Se ha propuesto que el probable significado fisiológico de esta interacción podría ser: a) la regulación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (7,8) b) la regulación de la liberación del citocromo c durante la apoptosis (7) y c) la prevención de hipoxia en tejidos vivos mediante la inhibición de la respiración mitocondrial, con

lo cual se extenderían los gradientes de difusión del  $O_2$  provenientes de los vasos sanguíneos, permitiendo que el  $O_2$  difunda hasta células más distales (9,10).

Por el contrario, la exposición durante tiempos prolongados (de hasta 14 h.) al  $NO^\bullet$ , promueve una inhibición progresiva de la respiración en cultivos celulares de macrófagos y que se vuelve irreversible con el transcurso del tiempo. Bajo estas condiciones, el complejo I es inhibido de manera específica y este efecto no puede ser prevenido ni por la adición de superóxido dismutasa o el atrapador de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>): metionina, lo que en conjunto indica que el complejo I puede ser S-nitrosilado en grupos sulfhidrilo claves, aun sin la intervención aparente de especies reactivas de nitrógeno (ERN)<sup>1</sup> lo que en último término se refleja en la inhibición de la cadena respiratoria y la respiración celular (11) (Esquema 1).

La cadena respiratoria es la principal fuente generadora de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en mitocondrias de mamífero a nivel de los complejos I y III (12). Así, el  $NO^\bullet$  como ya se mencionó antes, puede reaccionar fácilmente con  $O_2^{\bullet-}$  para formar al radical libre peroxinitrito (13). El ONOO<sup>-</sup> puede a su vez reaccionar con grupos -SH de residuos de cisteína (S-nitrosilación) y grupos -OH de residuos de tirosina (nitración). Este hecho implica que el  $NO^\bullet$  también puede actuar a nivel de la mitocondria a través de la formación de ERN. La formación del  $O_2^{\bullet-}$  puede incrementarse mediante la adición de algunos inhibidores de la cadena respiratoria tales como la antimicina A, la rotenona, el cianuro y probablemente, el  $NO^\bullet$ , que actúa de manera análoga al cianuro. De modo que, un aumento en la producción del  $O_2^{\bullet-}$  por alguno de estos agentes, o por disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes (durante el estrés oxidativo), junto con una producción sostenida de  $NO^\bullet$  por parte de la NOS<sub>mt</sub> o por la activación de los macrófagos (los cuales producen  $NO^\bullet$  bajo la acción de ciertos efectores), puede dar lugar a una importante formación de ONOO<sup>-</sup> (14). Mediante este mecanismo, el  $NO^\bullet$  puede inhibir por S-nitrosilación a los complejos I y II (15), y modificar la funcionalidad del citocromo c mediante nitración (16).

Un ejemplo de la posible interacción del  $NO^\bullet$  y la cadena respiratoria durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, es el uso del inhibidor del complejo I, el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP). Este agente tóxico ha sido utilizado como herramienta para conocer algunos aspectos bioquímicos que participan en la muerte celular de las células dopaminérgicas durante la enfermedad de Parkinson. Los efectos tóxicos del MPTP son mediados por la formación de ERO y pueden ser evitados por el inhibidor de la NOS, el 7-nitroindazol, sugiriendo que los efectos del MPTP y del  $NO^\bullet$  son sinérgicos y que podrían involucrar la formación del peroxinitrito (17).

En conclusión, es cada día más evidente que el  $NO^\bullet$  tiene un importante papel fisiológico en la regulación del metabolismo energético mitocondrial de la célula, aun cuando falta por definirse de manera concreta bajo qué condiciones el  $NO^\bullet$  lleva a cabo sus funciones, en tanto que en condiciones patológicas, el  $NO^\bullet$  parece mediar sus efectos a través de diversas reacciones con algunas EROs para dar lugar a la formación de ERN que pueden reaccionar de manera específica e irreversible con residuos que son críticos para el funcionamiento de las enzimas de la cadena respiratoria, lo que culmina con un decaimiento en la producción de energía y de todos los procesos que dependen de ella. Sin embargo, el panorama es más complejo aún, puesto que las acciones del  $NO^\bullet$  sobre la cadena respiratoria parecen depender

<sup>1</sup> Algunos ejemplos de ERN son: ONOO<sup>-</sup> anión peroxinitrito,  $N_2O_3$  trióxido de dinitrógeno,  $NO^\bullet$  anión nitroxilo,  $NO^+$  catión nitrosonio,  $NO_2$  dióxido de nitrógeno,  $NO_2^-$  nitrito,  $NO_3^-$  nitrato).

de un sinnúmero de factores tales como el estado redox de la célula, la concentración de  $\text{NO}^\bullet$ , definida en función de la regulación de las diferentes isoformas de la NOS, la participación de agentes tóxicos externos que pudieran sinergizar las acciones del  $\text{NO}^\bullet$ , por solo mencionar algunos de esos factores. Todo esto hace evidente que existe un largo camino por recorrer en la investigación del  $\text{NO}^\bullet$  y su interacción con la cadena respiratoria.

### **Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el lado oscuro del $\text{NO}^\bullet$**

La acción del  $\text{ONOO}^-$  es rápida e irreversible y no está confinada únicamente a blancos específicos de la cadena respiratoria, siendo capaz incluso de modificar enzimas del ciclo de Krebs como la aconitasa, entre otros blancos celulares. Se ha propuesto que este mecanismo de inhibición de la cadena respiratoria podría tener relevancia fisiopatológica en algunas enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, donde se ha descrito una disminución en la actividad del complejo I y reducción de la concentración de glutatión reducido (GSH) intracelular (11), aun cuando no es claro si este

### **Esquema 1: Estructura y funciones mitocondriales.**

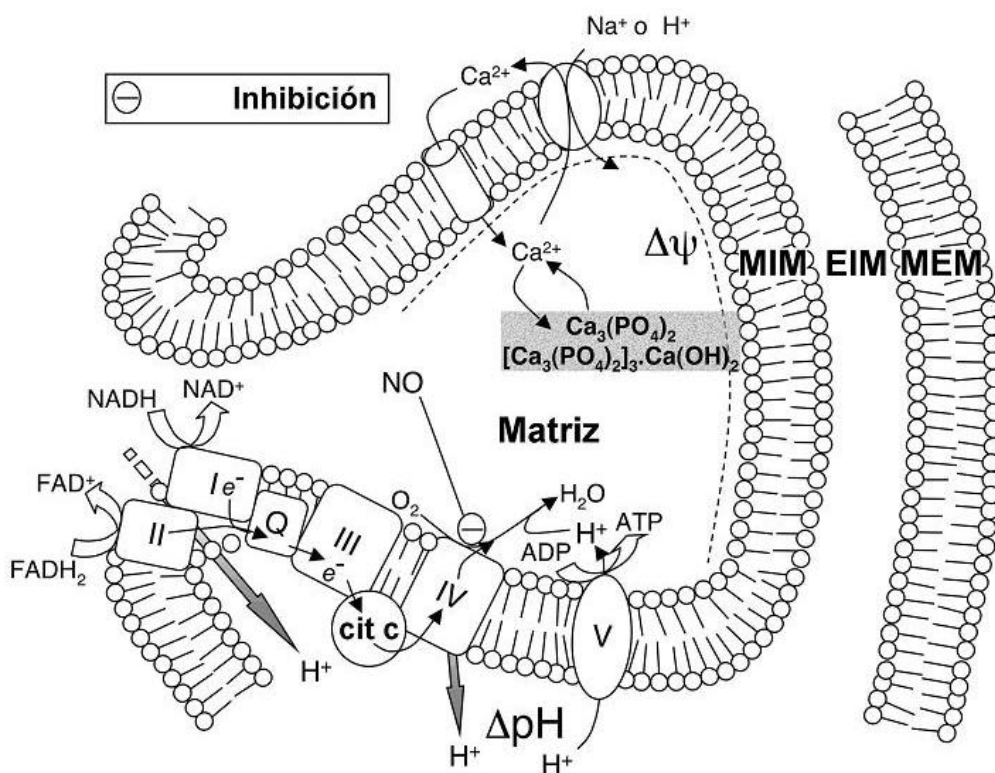
La mitocondria consiste de distintos compartimientos: La membrana externa mitocondrial (**MEM**), la membrana interna mitocondrial (**MIM**), la matriz (**Matriz**) y el espacio intermembranal (**EIM**). Estos compartimientos son diferentes en composición, electroquímica y estado redox. Los complejos de la cadena respiratoria están embebidos en la MIM. La cadena consiste de cuatro complejos (del I al IV), la coenzima Q (ubiquinona), el citocromo c (*cit c*) y la ATP sintasa, la cual se le refiere como el complejo V. El *cit c* es el único miembro de la cadena respiratoria que no está embebido dentro de la MIM. Estos complejos están funcionalmente colocados en un arreglo jerárquico electroquímico basados en sus potenciales redox. La cadena respiratoria posee un amplio espectro de potenciales redox que varía desde -280 mV (complejo I) hasta +250 mV (complejo IV). El ingreso de los electrones a la cadena por el complejo I o el II por la oxidación del NADH o el  $\text{FADH}_2$ , respectivamente, permite que fluyan por la cadena hasta el complejo IV en donde reducen el  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Acoplado al flujo de electrones, los protones son bombeados desde la matriz al EIM. La expulsión de protones establece el potencial transmembranal ( $\Delta\psi$ , negativo adentro) y un gradiente electroquímico ( $\Delta\text{pH}$ , alcalino adentro) a través de la membrana. La MIM es impermeable a los protones, pero reingresan a la matriz a través de la enzima ATP sintasa. El  $\Delta\psi$  es también la fuerza motriz de transporte de cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, la mitocondria puede acumular relativamente grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la concentración intramitocondrial de calcio ionizado ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) se mantiene muy baja mediante al menos, dos mecanismos: a) la formación de depósitos de calcio insoluble en la matriz mitocondrial, los cuales pueden visualizarse mediante microscopia electrónica como gránulos densos a electrones. La estructura química de estos gránulos puede variar en las mitocondrias de diferentes células; sin embargo, estos gránulos generalmente consisten de fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y calcio-apatita  $[(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$ ; b) el intercambio de calcio intramitocondrial con otros cationes como  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$ .

El óxido nítrico compite con el  $\text{O}_2$  por el sitio de unión en el complejo IV y el consumo de  $\text{O}_2$  de una manera reversible. La inhibición del consumo de  $\text{O}_2$  por el  $\text{NO}^\bullet$  disminuye el  $\Delta\psi$  y el  $\Delta\text{pH}$ . Tomado y modificado de Ghafourifar y Saavedra-Molina (88).

proceso tiene un papel primario en la aparición de estas enfermedades o es un fenómeno secundario a dicho proceso (13).

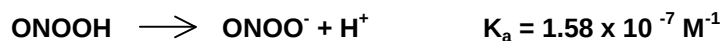
Debido a que el óxido nítrico posee un electrón desapareado, es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular ( $O_2$ ) y el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). De hecho, las reacciones del  $NO^{\bullet}$  con el  $O_2$  y con el  $O_2^{\bullet-}$  están implicadas en la química de su citotoxicidad. La reacción del  $NO^{\bullet}$  con  $O_2$  resulta en la generación de oxidantes reactivos tales como el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y el trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ). Se ha propuesto que el dióxido de nitrógeno inicia la lipoperoxidación (18) y causa la ruptura de las cadenas de ADN (19).

Las especies nitrosantes como el  $N_2O_3$ , pueden reaccionar con tioles o aminas, lo que altera proteínas, formando nitrosaminas carcinogénicas, o desaminar nitrosativamente las bases del ADN (20,21). La ecuación (1) muestra la reacción del óxido nítrico con el superóxido, la cual es extremadamente rápida (22,23).



El peroxinitrito resultante es un potente agente oxidante que tiene la capacidad de reaccionar con una gran variedad de moléculas (24). Esta reacción es mucho más rápida que la reacción del  $\text{NO}^\bullet$  con compuestos hemo ( $k < 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y que es comparable a la velocidad con la cual el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reacciona con las enzimas superóxido dismutasas. La reacción entre el  $\text{NO}^\bullet$  y el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es biológicamente significativa, en al menos dos aspectos. Primero, el  $\text{NO}^\bullet$  y el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pueden antagonizar sus acciones biológicas. Se ha visto que los efectos mediados por el  $\text{NO}^\bullet$  son en ocasiones incrementados cuando se añade superóxido dismutasa a la preparación. Por ejemplo, *in vivo*, la vasodilatación inducida por el  $\text{NO}^\bullet$  puede antagonizarse por la sobreproducción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en el endotelio vascular, que causa vasoconstricción. De hecho, la generación excesiva de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se ha sugerido como una causa de hipertensión (25). Una segunda consideración son los efectos directamente atribuibles a el  $\text{ONOO}^-$ . Una forma molecular protonada de esta última especie es el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), que es un poderoso oxidante que puede reaccionar con varias moléculas biológicas a través de diversos mecanismos. La adición de  $\text{ONOO}^-$  a células, tejidos celulares o fluidos corporales lleva a su rápida protonación, seguida por la merma o depleción de grupos  $-\text{SH}$  (sulfhidrilo) y antioxidantes, la oxidación de lípidos, el rompimiento de las cadenas de ADN, la nitración y la desaminación de las bases nucleotídicas, especialmente la guanina, además de la nitración de residuos aminoácil aromáticos de proteínas; también es particularmente eficiente en oxidar centros  $\text{Fe/S}$ , así como producir los productos esperados por la acción del radical hidroxilo (26,27).

Lo que hace particularmente tóxico al peroxinitrito es su gran estabilidad como un anión a pH alcalino. Este compuesto a concentraciones molares puede ser almacenado por días en el refrigerador sin cambios; su gran estabilidad le permite difundir por la célula y encontrar un blanco en tejidos adyacentes. Aunado a que el  $pK_a$  de la forma *cis*, que es la forma predominante y termodinámicamente más estable es de 6.8, significa que a pH 7.4 solo el 20% podría ser protonado a la forma ácida que corresponde al ácido peroxinitroso con sus efectos deletéreos descritos con anterioridad (27). Lo interesante es que ese 20% es la causa responsable de los efectos nocivos atribuidos al  $\text{ONOO}^-$ . Las posibles conformaciones del  $\text{ONOO}^-$  han sido propuestas en base a cálculos cuánticos y datos de espectros. Los datos cuánticos revelan un enlace entre el nitrógeno y el oxígeno peroxídico con carácter de doble enlace, por lo que alrededor del enlace se definen las conformaciones *cis* o *trans*. Para el anión peroxinitrito, la conformación *cis* es más estable que la *trans*. Hasta el momento actual, no existe un acuerdo de si la interconversión entre la forma *cis* o la *trans* es rápida o lenta, pero análisis con rayos X sugieren que el peroxinitrito cristalizado predomina en la forma *cis*. La ecuación 2 muestra las propiedades ácido-base del peroxinitrito.



Después de todo lo anterior, el  $\text{ONOO}^-$  parece ser un villano; sin embargo, también se han descrito funciones fisiológicas del  $\text{ONOO}^-$  que son benéficas. Por ejemplo: los macrófagos activados tienen la capacidad de producir simultáneamente los compuestos precursores del  $\text{ONOO}^-$ , ( $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Se ha propuesto que el  $\text{ONOO}^-$  es la última especie citotóxica generada en la respuesta inmune (28), por tanto, tiene un papel preponderante en la lucha contra los organismos patógenos en animales y plantas. Particularmente, en plantas se ha demostrado la participación de  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{NO}^\bullet$  en la producción de nitritos y nitratos disponibles (29a).

## El óxido nítrico y su fisiopatología a nivel mitocondrial

El control de las funciones mitocondriales depende de dos variables, la concentración de óxido nítrico y el nivel de oxígeno; cada uno actúa sobre un intervalo de concentraciones y gradientes, por tanto existen puntos críticos en los cuales ambas variables se interceptan. El nivel en estado estacionario del oxígeno en órganos de mamífero es de 5-25  $\mu\text{M}$  (29). Estos niveles de oxígeno están en un margen en el cual las concentraciones fisiológicas de óxido nítrico (50-100 nM) producen la inhibición del 35-45% de la respiración mitocondrial (30); bajo estas condiciones de inhibición severa de la citocromo oxidasa, participa un mecanismo de “feedback” a través de la interacción inicial entre el ubiquinol y el óxido nítrico, el cual es importante en el mantenimiento de la función mitocondrial. Así, el óxido nítrico, el anión superóxido y el anión peroxinitrito desempeñan un papel crucial en la regulación de la función mitocondrial (31). Sin embargo, no está claro si el óxido nítrico tiene una función benéfica o dañina en la mitocondria. A concentraciones semejantes a las requeridas para activar a la guanilato ciclasa, el óxido nítrico se une al sitio de unión del oxígeno en la citocromo oxidasa de manera competitiva. Así, regula el consumo de oxígeno a nivel fisiológico. Obviamente, la regulación fisiológica del consumo de oxígeno representa un efecto benéfico. Sin embargo, si la inhibición por óxido nítrico de la citocromo oxidasa es prolongada, ocasiona la generación del anión superóxido; el anión superóxido puede a su vez reaccionar con el óxido nítrico para formar el anión peroxinitrito (32), el cual inhibe irreversiblemente diferentes componentes de la cadena respiratoria. Por tanto, la presencia del anión peroxinitrito en la mitocondria produce daños celulares irreversibles.

La mitocondria desempeña un papel regulador en la disfunción celular y en las rutas de muerte celular (33,34). La disfunción mitocondrial ha sido reconocida en las enfermedades neurodegenerativas, las que se conocen como “enfermedades mitocondriales” (35,36). Las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, involucran defectos mitocondriales en los diferentes complejos de la cadena respiratoria (37,38) y mutaciones en el ADN mitocondrial (39). Estos defectos, se caracterizan por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el sistema nervioso central, debido a que el cerebro consume aproximadamente el 20% del oxígeno total del cuerpo. Por tanto, la principal ruta de disfunción mitocondrial es a través de la oxidación de los diferentes componentes mitocondriales por las ERO. Además, las neuronas son post-mitóticas, es decir, no sufren mitosis lo que no permite reparar la oxidación del ADN, las proteínas y los lípidos que fueron dañados por las ERO. Por último, a diferencia de otros órganos altamente metabólicos, el cerebro posee bajos niveles tanto en concentración como en actividad de las enzimas antioxidantes, incluyendo también los antioxidantes de bajo peso molecular (40).

Además de las ERO, hay evidencia de la participación del óxido nítrico en una variedad de enfermedades neurológicas (41-43).

La mitocondria, también produce especies reactivas de nitrógeno, debido a que se ha encontrado una enzima óxido nítrico sintasa en la membrana interna mitocondrial (NOSmt) y orientada hacia la matriz (44-46). El óxido nítrico producido por esta NOSmt inhibe el consumo de  $\text{O}_2$  (47,48) y promueve la producción y liberación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en mitocondria, al favorecer la autooxidación del ubiquinol (49). En el cerebro, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por este mecanismo, participa en la señalización celular durante la sinaptogénesis inicial y la plasticidad (50). Al igual que la reacción citoplásmica de la NOS, la reacción entre el óxido nítrico

y el anión superóxido forman el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), la cual también es tres veces más rápida que la dismutación del anión superóxido, en este caso, por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) (51), lo que sugiere la formación intramitocondrial del anión  $\text{ONOO}^-$ . Además de este mecanismo indirecto, el anión  $\text{ONOO}^-$  puede ser generado directamente por la NOSmt, cuando esta última actúa como peroxinitrito sintasa, a través de la generación del anión superóxido a expensas del NADPH en una reacción alterna a la síntesis del óxido nítrico o mediante la generación del anión nitroxilo ( $\text{NO}^\bullet$ ), el cual reacciona con el oxígeno formando el anión  $\text{ONOO}^-$  (52) (ver Figura 2). La capacidad de la NOSmt para actuar como óxido nítrico sintasa o como peroxinitrito sintasa, depende de la disponibilidad y el estado de oxidación del cofactor tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ). El anión nitroxilo también puede ser formado a partir del  $\text{NO}^\bullet$  mediante la ganancia de un electrón del ubiquinol (53,54) o el citocromo c (55).

El anión  $\text{ONOO}^-$ , es un potente oxidante que reacciona con una variedad de componentes mitocondriales, a través de reacciones de oxidación o nitración. Este anión inhibe el transporte de electrones mitocondrial a través de la inactivación de la NADH deshidrogenasa (Complejo I), la succinato deshidrogenasa (Complejo II), además de inhibir a la ATP sintasa (11,56). Aunado a esto, el anión  $\text{ONOO}^-$  lleva a cabo la nitración de tirosinas en varias proteínas mitocondriales, como la aconitasa (57), la SOD-Mn (58,59) y el citocromo c (16). También el anión  $\text{ONOO}^-$  oxida los tioles y el NADH, lo cual induce la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP), provocando la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (60,61). El PTP permite el movimiento libre de un gran número de moléculas hacia dentro y fuera de la mitocondria. Por tanto, la mitocondria se colapsa y provoca la muerte celular (62).

En las neuronas, el anión  $\text{ONOO}^-$  promueve la nitración de los residuos de tirosina en los neurofilamentos, lo cual daña el flujo axonal y provoca la muerte neuronal. Además, el anión  $\text{ONOO}^-$  inhibe irreversiblemente el transportador de glutamato en las células gliales, incrementando los niveles de glutamato extraneuronal.

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central. Al unirse el glutamato a su receptor, activa una variedad de sistemas de transducción de señales, a través de calmodulina y calpaína. Sin embargo, un exceso de glutamato en las neuronas estimula la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  (63), lo cual está involucrado en diversas enfermedades neurológicas (64).

La neurotoxicidad inducida por glutamato es prevenida con inhibidores de las NOS y con la superóxido dismutasa, lo cual indica que la formación del anión  $\text{ONOO}^-$  es crucial en la toxicidad inducida por este neurotransmisor (65,66). Por tanto, el peroxinitrito también está involucrado en las enfermedades neurodegenerativas (67,68).

Los mecanismos de defensa subcelulares contra el anión  $\text{ONOO}^-$  son así cruciales para atenuar la disfunción mitocondrial, debido a que el anión  $\text{ONOO}^-$  parece ser el principal producto de la utilización del óxido nítrico en aerobiosis (69). Si el anión  $\text{ONOO}^-$  es formado bajo estas condiciones, puede producir daño oxidativo en la mitocondria dependiendo de su sitio de generación (14). Se conocen diversos mecanismos de defensa subcelulares para prevenir el daño por  $\text{ONOO}^-$ , entre los cuales se menciona la actividad de la SOD-Mn (15), también por la regulación de la NOSmt a través de la disponibilidad del sustrato y el cofactor tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), o la inhibición por producto (70), así como también por su reacción con el glutatión (71) incluyendo además, su reducción por la actividad de peroxinitrito reductasa



de la glutatión peroxidasa (72). Sin embargo, los cambios químicos y funcionales de algunos componentes mitocondriales pueden ayudar a definir su presencia y su función, ya que es difícil su detección.

### **El óxido nítrico y la presión arterial**

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial, ésta es controlada por el gasto cardíaco y la resistencia periférica; sin embargo, ninguno de estos factores la controla de manera absoluta porque a su vez éstos dependen de otros factores fisiológicos (73-75). La resistencia periférica está determinada por la viscosidad de la sangre y por el calibre de los vasos de resistencia. Por su parte, el endotelio vascular es el principal regulador del tono vascular a través de la liberación de sustancias vasoactivas que controlan la relajación y la contracción del músculo liso vascular (73,76,77). Los trastornos en la regulación del tono vascular conducen a la disfunción endotelial que se asocia con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, y la diabetes mellitus entre otras (77).

La hipertensión es una elevación sostenida de la presión arterial en general y es uno de los problemas de salud con mayor impacto económico y social en el mundo, debido a la relación entre la hipertensión y las muertes por complicaciones vasculares en órganos blanco, como el corazón, el cerebro, el riñón y los vasos sanguíneos (73,75). La hipertensión arterial incrementa el trabajo a que es sometido el corazón, aumenta el riesgo de accidente vascular cerebral, ataque cardíaco, enfermedad renal, etc. (75).

En la hipertensión, la presión diastólica se encuentra de 90 a 95 mmHg y una presión sistólica mayor de 140 mmHg (74,78). En el 90% de los casos no se conocen las causas de la alta presión arterial (hipertensión esencial), aunque en una pequeña proporción pueden identificarse formas secundarias de hipertensión causadas por una serie de enfermedades tales como tumores suprarrenales, enfermedad renal u otras causas específicas (73,74).

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular, da origen a una vasodilatación directa. El agente que desencadena este proceso fue conocido en un principio como el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF, por sus siglas en inglés), en donde se encontró que la acetilcolina actúa como un mensajero que estimula la liberación, por parte del endotelio, de una sustancia que constituye el verdadero vasodilatador (79).

En 1987 Palmer, Ignarro, Khan y Furchgott demostraron que las acciones biológicas del EDRF eran debidas a la liberación endógena del óxido nítrico, lo cual reveló la existencia de una vía bioquímica ubicua (80).

La formación de NO<sup>\*</sup> sintetizado por la óxido nítrico sintasa en células del endotelio vascular regula el tono vasodilatador que es esencial para la regulación del flujo y la presión sanguínea.

## **El óxido nítrico y su relación con la hipertensión**

Debido a la diversidad de efectos fisiológicos que desempeña el NO<sup>\*</sup>, éste se ha considerado como una molécula biológicamente activa. Sin embargo, su producción y sus funciones están alteradas en ciertos procesos patológicos, tales como la diabetes y la hipertensión (82-84).

En condiciones como el envejecimiento y la menopausia, así como en patologías como la hipertensión, la diabetes mellitus, la aterosclerosis, el vasoespasmo y el daño por reperfusión, la activación de las células endoteliales puede llevar a la producción y liberación de factores contráctiles como los derivados de la ciclooxigenasa y los radicales libres de oxígeno. Estos efectos contrarrestan la actividad fisiológica relajante del NO<sup>\*</sup> (76,85), produciendo un efecto patológico, ya que la reacción entre el NO<sup>\*</sup> y el anión superóxido produce el peroxinitrito, el cual como ya se explicó antes, causa inhibición irreversible de la respiración mitocondrial y de diversos componentes mitocondriales, específicamente en los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria, así como la ATP sintasa, la aconitasa, y la creatina cinasa. De igual forma, el ONOO<sup>-</sup> produce lipoperoxidación de la membrana, daño al ADN mitocondrial, así como a otros componentes celulares (15,86).

Asimismo, el efecto relajante del NO<sup>\*</sup> también puede ser afectado por una alteración en la expresión de la enzima NOS, evento corroborado por Chou y cols., quienes mediante un análisis de Western blot y utilizando aortas de ratas hipertensas de diferente edad, encontraron que la actividad y la expresión de las NOS<sub>e</sub> y NOS<sub>i</sub> están alteradas en procesos como la hipertensión y el envejecimiento (82).

De igual forma, la actividad de la NOS<sub>mt</sub> se alteró en la hipertensión, ya que se ha encontrado que la producción basal de NO<sup>\*</sup> intramitocondrial está disminuida en mitocondrias de corazón, riñón y cerebro de ratas hipertensas, lo cual a llevado a pensar que el NO<sup>\*</sup> intramitocondrial desempeña una importante función en la regulación mitocondrial durante la hipertensión (87).

Aunque es mucho lo que se sabe acerca de la química y los efectos fisiológicos de este compuesto, quedan muchas preguntas por responder. Por ejemplo en la cascada de señalización de la reacción de nitración/desnitración de proteínas; la S-nitrosilación de residuos de tirosina o de serina en proteínas para activación o desactivación enzimática; el sistema de GMP cíclico dependiente de NO<sup>\*</sup>, que representa el principal mecanismo de transducción de señales por el cual el NO<sup>\*</sup> ejerce efectos fisiológicos en mamíferos; el sistema de señalización independiente de GMP cíclico, entre otros de suma importancia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen el apoyo económico parcial de la CIC-UMSNH (2004) y de CONACYT (43705). ECC es becaria de la UMSNH. ESC, CCR y FJGZ son becarios de CONACYT.

## REFERENCIAS

1. López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Ronn LC, Akil H y Watson SJ (2000). Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 272:129-133.
2. González-Halphen D y Vázquez-Acevedo M (2002). En: Mitocondria. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. (ME Vázquez Memije, MM Tuena de Gómez-Puyou Eds). México. Editorial Prado. 8:65-87.
3. Borutaité V y Brown GC (1996). Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem J* 315:295-299.
4. Cooper CE y Brown GC (1995). The interactions between nitric oxide and brain nerve terminals as studied by electron paramagnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 212:404-412.
5. Brown GC, Bolaños JP, Heales SJR y Clark JB (1995). Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett* 193:201-204.
6. Brown GC y Cooper CE (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295-298.
7. Brookes P y Darley-Usmar VM (2002). Hypothesis: the mitochondrial NO signaling pathway and the transduction of nitrosative to oxidative cell signals: an alternative function for cytochrome C oxidase. *Free Radic Biol Med* 32:370-374.
8. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schopfer F y Boveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85-92.
9. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP y Lancaster JR (2001). The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:355-360.
10. Brookes PS, Kraus DW, Shiva S, Doeller JE, Barone M, Patel RP, Lancaster JR, y Darley-Usmar V (2003). Control of mitochondrial respiration by NO, effects of low oxygen and respiratory state. *J Biol Chem* 278:31603-31609.
11. Clementi E, Brown GC, Feelisch M y Moncada S 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7631-7636.
12. Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8.
13. Ischiropoulos H y Beckman JS (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111:163-169.
14. Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V y Moncada S (1996). Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314:877-880.
15. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, y Castro L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33:1451-1464.
16. Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Ischiropoulos LH, Freeman BA y Radi R (2000). Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem* 275:21409-21415.
17. Cleeter MW, Cooper JM y Schapira AH (2001). Nitric oxide enhances MPP<sup>+</sup> inhibition of complex I. *FEBS Lett* 504:50-52.
18. Kikugawa K y Kogi K (1987). Oxidation products of linoleate and linoleate exposed to nitrogen dioxide. *Chem Pharm Bull* 35:344-349.
19. Gordsdorf S, Appel KE, Engholm C y Obe G (1990). Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 11:37-41.
20. Wink DA, Nims RM, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook, JA, Krishna MC, DeGraff WG y Mitchell JB (1994). Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects or intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem Res Toxicol* 7:519-525.
21. Goldstein S y Czapski G (1996). Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated NO solutions: The nature of the nitrosating intermediates. *J Am Chem Soc* 118:3419-3425.
22. Huie RE y Padjama S (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res Commun* 18:195-199.
23. Culcasi M, Lafon-Cazal M, Pietri S y Bockaert J (1994). Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J Biol Chem* 269:12589-12593.
24. Pryor WA y Squadrito GL (1995). The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268:L699.

25. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T y Inoue MW (1991). Does  $O_2^{\cdot -}$  underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10045.
26. Halliwell B y Gutteridge JM (1999). Chemistry of biologically important radicals. En: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Science Publications, 3rd edition, New York. pp 73-100.
27. Beckman JS y Koppenol WH (1996).  $NO^{\cdot}$ ,  $O_2^{\cdot -}$ , and  $ONOO^{\cdot -}$ ; the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437.
28. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA y Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.
29. Wittenberg BA y Wittenberg JB (1989). Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol* 51:857-878.
- 29a. Vanin AF, Svistunenko DA, Mikoyan VD, Serezhenkov VA, Fryers MJ, Baker NR y Cooper CE (2004). Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J Biol Chem* 279:24100-24107.
30. Boveris A, Costa LE, Cadenas E y Poderoso JJ (1999). Regulation of mitochondrial respiration by ADP, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol* 301:188-198.
31. Moncada S y Erusalimsky JD (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Review Molecular Cell Biology* 3:214-220.
32. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H y Beckman JS (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842.
33. Murphy A (2000). Mitochondria in human disease. *The Biochemist* 22:29-36.
34. Brown G (2000). Energy, life, and death. *The Biochemist* 22:11-15.
35. Manfredi G y Beal MF (2000). The role of mitochondria in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 10:462-72.
36. Jordan J, Cena V y Prehn JH (2003). Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem* 59:129-141.
37. Parker WD Jr, Parks JK y Filey CM (1990). Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurol* 40:1302-1303.
38. Janetzky B, Hauck S, Youdim MBH, Riederer P, Jellinger K y Pantucek F (1994). Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett* 169:126-128.
39. Shigenaga MK, Hagen TM y Ames BN (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771-10778.
40. Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
41. Li XJ, Sharp AH, Li SH, Dawson TM, Snyder SH y Ross CA (1996). Huntington-associated protein (HAP1): discrete neuronal localizations in the brain resemble those of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:4839-4844.
42. Sawada H, Kawamura T, Shimohama S, Akaike A, Kimura J (1996). Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J Neurosci Res* 43:503-510.
43. Kume T, Kouchiyama H, Kaneko S, Maeda T, Kaneko S, Akaike A, Shimohama S, Kihara T, Kimura J, Wada K y Koizumi S (1997). BDNF prevents NO mediated glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 756:200-204.
44. Ghafourifar P y Richter C (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418:291-296.
45. Tatoyan A y Giulivi C (1998). Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 273: 11044-11048.
46. Riobó NA, Melani M, Sanjuán N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E y Poderoso JJ (2002). The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase in brain development. *J Biol Chem* 277:42447-42455.
47. Brown GC y Cooper CE (1994). Nanomolar concentration of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295-298.
48. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F y Boveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85-92.
49. Poderoso JJ, Lisdero C, Schöpfer F, Riobó N, Carreras MC, Cadenas E y Boveris A (1999). The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem* 274:37709-37716.

50. Yermolaieva O, Brot N, Weissbach H, Heinemann SH y Hoshi T (2000). Reactive oxygen species and nitric oxide mediate plasticity of neuronal calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:448-453.
51. Beckman JS, Chen J, Crow JP y Ye YZ (1994). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 130:371-380.
52. Kirsch M y Groot H (2002). Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *J Biol Chem* 277:13379-13388.
53. Poderoso JJ, Carreras MC, Schöpfer F, Riobó N, Boveris AD y Boveris A (1999). The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radic Biol Med* 26:925-935.
54. Sharpe MA y Cooper CE (1998). Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *J Biochem* 332:9-19.
55. Zhao XJ, Sampath V y Caughey WS (1995). Cytochrome c oxidase catalysis of the reduction of nitric oxide to nitrous oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 212:1054-1060.
56. Radi R, Rodríguez M, Castro L y Terrelli R (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95.
57. Castro LA, Robalino RL, Cayota A, Meneghini R y Radi R (1998). Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 359:215-224.
58. MacMillan-Crow LA, Crow JP y Thompson JA (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37:1613-1622.
59. Yamasuka F, Taka H, Fujimura T y Murayama K (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273:14085-14089.
60. Packer MA y Murphy MP (1994). Peroxynitrite causes efflux from mitochondria which is prevented by cyclosporin A. *FEBS Lett* 345:237-240.
61. Packer MA, Scarlett JL, Martin SW y Murphy MP (1997). Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochem Soc Trans* 25:909-914.
62. White RJ y Reynolds IJ (1996). Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16:5688-5697.
63. Choi DW (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58:293-297.
64. Choi DW (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
65. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS y Snyder SH (1991). Nitric oxide mediate glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6368-6371.
66. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR y Snyder SH (1993). Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651-2661.
67. Beckman JS (1994). Peroxynitrite versus hydroxyl radical: The role of nitric oxide in superoxide dependent cerebral injury. *Ann NY Acad Sci* 738:69-75.
68. Torrealles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M y Torrealles J (1999). Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Rev* 30:153-163.
69. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD y Richter C (1999). Mitochondrial nitric oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274:31185-31188.
70. Giulivi C (2003). Characterization and function of mitochondrial nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 34:397-408.
71. Augusto O, Gatti RM y Radi R (1994). Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinostydomine N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch Biochem Biophys* 310:118-125.
72. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 272:27812-27817.
73. Ganong WF (1992). Fisiología Médica. 13a ed. Edit. Manual Moderno. México. Capítulos 32-33.
74. West JB (1993). Bases fisiológicas de la práctica médica. 12a ed. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. Capítulos 18 y 62.
75. Secretaría de Salud. (2001). Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. 1a ed. S.S México.
76. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L y Salvetti A (1998). Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy?. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:41-47.
77. Pereida RN (2000). El endotelio vascular y la disfunción endotelial. *BEB* 20:79-84.

78. Guyton AC (1992). Tratado de fisiología médica. 8a ed. Edit. Interamericana McGraw-Hill. España. Capítulos 19 y 61.
79. Furchgott RF y Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
80. Moncada S, Higgs A y Furchgott R (1997). XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 49:137-142.
81. Elfering SL, Sarkela TM y Giulivi C (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 277:38079-38086.
82. Chou TC, Yen MH, Li CY y Ding YA (1998). Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31:643-648.
83. Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R y Saavedra-Molina A (2002). Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension. *Mitochondrion* 1:413-423.
84. Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A y Packer L (1998). Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med* 24:85-92.
85. Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD y Richter C (2001). Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept* 10:57-65.
86. Radi R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4003-4008.
87. Calderón-Cortés E, Sierra-Campos E, Cortés-Rojó C, Gaona-Zamudio FJ, Clemente-Guerrero M y Saavedra-Molina A (2004). Role of mitochondrial nitric oxide in rat brain during the development of hypertension. En preparación.
88. Ghafourifar P y Saavedra-Molina A (2004) Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: Nitric oxide, cell signaling, and gene expression. (E Cadenas Ed. ) Marcel Dekker Inc. San Diego, CA. En Prensa.
89. Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-359.
90. Mayer B y Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22:477-481.

## PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

### Resumen

*El importante papel del óxido nítrico (NO•) en biología ha sido sujeto de muchos estudios en las pasadas dos décadas. Algunas propiedades biológicas del NO• son mediadas a través del incremento celular en los niveles de GMP cíclico; sin embargo, existen muchas otras funciones del NO• que son independientes de GMP cíclico. El óxido nítrico es una molécula gaseosa que reacciona rápidamente con hemoproteínas, tioles y el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). La mitocondria es la principal productora celular de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y posee hemoproteínas como la citocromo c oxidasa (COX), proteínas con tioles como las caspasas. Por lo tanto, las mitocondrias pueden considerarse como el principal blanco intracelular del NO•. Concentraciones fisiológicamente relevantes de NO• reaccionan en forma reversible en el sitio activo de la COX de una manera dependiente de la concentración del oxígeno, lo que sugiere un antagonismo competitivo entre el NO• y el O<sub>2</sub>. Esta reacción desempeña un papel crítico en la regulación del consumo de oxígeno mitocondrial en muchas células, tejidos y órganos. La interacción del NO• con las proteínas mitocondriales que contienen tioles, como la caspasa-3, es también reversible, y depende del pH intramitocondrial y el estado redox. Esta reacción participa de manera muy importante en la regulación de la maquinaria mitocondrial involucrada en la apoptosis. La reacción del NO• con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es extremadamente rápida y su producto, el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), es un potente oxidante. Las reacciones del ONOO<sup>-</sup> con posibles objetivos mitocondriales son irreversibles y causan un mal funcionamiento mitocondrial, daño oxidativo y apoptosis. Las reacciones de apoptosis no deseadas, están involucradas en la patogénesis de algunas enfermedades; de hecho, la*

*carencia de apoptosis puede ser el principal mecanismo en algunos tipos de cáncer. Este punto de vista podría quitarnos la idea negativa que tenemos sobre el  $\text{ONOO}^-$  y cambiarla por una idea más positiva. El descubrimiento de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt, por sus siglas en inglés) ha abierto nuevas avenidas en el campo de investigación del  $\text{NO}^\bullet$ . La NOSmt es una enzima constitutiva, muy activa, que genera NO de una manera sensible al  $\text{Ca}^{2+}$ , y que puede regular el consumo de oxígeno, el potencial electroquímico transmembranal ( $\Delta\psi$ ), el gradiente transmembranal de  $\text{H}^+$  ( $\Delta\text{pH}$ ), la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y la síntesis de ATP. Se ha reportado la formación de  $\text{ONOO}^-$ , derivado de la producción del  $\text{NO}^\bullet$  por la NOSmt, causa estrés oxidativo y la liberación del citocromo c de la mitocondria, lo cual es importante para la apoptosis. En esta revisión se describe la importancia biológica que tiene el óxido nítrico mitocondrial y su papel fisiopatológico a nivel mitocondrial.*

**Palabras clave:** óxido nítrico; mitocondria; óxido nítrico sintasa; hipertensión; radicales libres; peroxinitrito.

## Semblanza del Dr. Alfredo Saavedra Molina.



Nació en la Ciudad de Nogales, Sonora, México, en 1950. Es QFB por la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo (1973) y Doctor en Ciencias Biológicas por la Facultad de Ciencias de la UNAM (1987). Ha realizado una estancia posdoctoral en Hahnemann University, Filadelfia, EU y otra en University of North Texas Health Science Center at Fort Worth. Actualmente es Profesor Investigador Titular C del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I. Su trabajo científico se ha publicado en 17 artículos internacionales y 23 nacionales, y tiene una amplia participación en Congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido 11 tesis de posgrado y 9 de licenciatura en la Universidad Michoacana, México, donde también ha impartido 12 conferencias Institucionales y 10 cursos de licenciatura y posgrado. Es miembro regular de diferentes Sociedades Científicas, entre las que se encuentran la American Society for Cell Biology, la Nitric Oxide Society, la American Physiological Society, la Biochemical Society, la American Society for Biochemistry and Molecular Biology y la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ha recibido en dos ocasiones el premio de la International Cell Research Organization de la UNESCO.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## RNA INTERFERENTE: UNA HERRAMIENTA Y UN NOVEDOSO MECANISMO DE REGULACIÓN GÉNICA.

Luis Vaca

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

[lvaca@ifisiol.unam.mx](mailto:lvaca@ifisiol.unam.mx)

### RNA INTERFERENCE: A TOOL AND A NOVEL MECHANISM FOR GENE REGULATION

#### Abstract.

*In the last 7 years our vision about the relevance of RNA molecules in cell Biology has changed dramatically driven by the recent discoveries on a new field known as RNA interference (RNAi). RNA molecules were originally envisioned as simple messengers in charge of transporting the genetic information from the nucleus to ribosomes, in order to produce proteins. Nowadays, the discovery of a new class of tiny RNA molecules (known as microRNAs or miRNAs) and the complex machinery associated to them uncovered new roles for RNA molecules in the selective repression of messenger RNAs (mRNA) in a wide variety of organisms including mammals. miRNAs can simultaneously repress the expression of several mRNAs involved in a complex signal transduction cascade. In plants, a single miRNA determines the shape and size of leafs, while in Drosophila one miRNA regulates the size of the adult fly, by controlling the balance between apoptosis and cell division in this organism. All these new discoveries changed the linear simplistic view of DNA makes RNA and RNA makes proteins. The finding of hundreds of miRNAs explains why genomes have many sequences that do not result in open reading frames (do not produce proteins). Associated to ribosomes, scientists have found a new multiproteic complex in charge of sequestering the mRNAs associated to its miRNA. In this review we highlight the recent findings on RNAi, trying to keep pace with this rapidly moving field. We speculate also on possible uses of RNAi in Medicine as therapeutic tools in the fight against viral infections, cancer and other diseases.*

**Keywords:** RNA interference, RNAi; double-stranded RNA, dsRNA; gene regulation; Dicer; gene silencing; antiviral therapy.



## Introducción

En 2003, la revista *Science* determinó que el descubrimiento más relevante del año había sido el RNA de interferencia (RNAi) por su enorme contribución a la Biología Celular moderna.

El campo de RNAi ha crecido de forma exponencial, basta con realizar una búsqueda de artículos científicos en cualquier base de datos internacional, para darnos cuenta de los cientos de artículos publicados cada año en este campo. En 1998, año en que inicia el revuelo del RNAi se listan 16 artículos, para 2004 se reportan más de 2000. El descubrimiento de la compleja cascada de mensajeros involucrados con el RNAi ha permitido desenmascarar una novedosa forma de regulación génica mediada por el RNA de doble hebra. Este descubrimiento ha reposicionado al RNA como una molécula mucho más versátil de lo que inicialmente se pensó.

Justo cuando se cumplen 50 años de la determinación de la estructura de doble hélice del DNA (en 1953) por Watson y Crick (Premios Nobel 1962), el RNA nos enseña que aun tiene mucho que decir sobre la regulación de genes y el control de la expresión de proteínas. Así pues, no sería sorprendente que los próximos 50 años sean dedicados al RNA y a la compleja maquinaria de regulación dirigida por este último.

### 1. Aprendiendo del color de las petunias.

A finales de los años 80s, un grupo de científicos liderados por el biólogo molecular Rich Jorgensen trabajaban en la obtención de petunias mas coloridas [3]. La estrategia era relativamente simple, introducían en la planta una copia extra del gen que codifica para la enzima chalcona sintasa, la cual participa en la producción de pigmentos de antocianina, los cuales le proporcionan el color púrpura a las petunias [3]. Al sobreexpresar este gen, el grupo de científicos esperaba obtener petunias mucho más púrpuras y de esta forma producir flores más coloridas para la compañía "*DNA plant technology*" de California, en donde trabajaba este equipo de biólogos moleculares [3].

Esta estrategia, además de inteligente, prometía convertirse en un verdadero éxito comercial, ya que introduciendo una, dos o más copias de este gen, uno podría regular los tonos de púrpura en las petunias transgénicas.

Sin embargo, el grupo de científicos quedo descorazonado y perplejo del resultado obtenido: todas las plantas transgénicas obtenidas tenían flores blancas, el color natural cuando no se producen pigmentos de antocianina. Era como si la introducción de una copia extra del gen que codifica para la chalcona sintasa inhibiera al gen endógeno de la planta, resultando en flores blancas.

En el año de 1990, el grupo del Dr. Jorgensen publicó estos hallazgos en una revista especializada denominando al fenómeno co-supresión, y dejaron el asunto de la producción de petunias de lado [3]. A pesar de múltiples intentos, Jorgensen no pudo determinar el por qué la introducción de una copia extra de un gen resultaba en la supresión del mismo gen endógeno presente en la planta.

Mientras tanto, científicos de la Universidad de Roma trabajando con el hongo *Neurospora crassa* intentaban sobreproducir el pigmento naranja que sintetiza este hongo, introduciendo copias extra de genes involucrados en la producción de carotenos (compuestos que proporcionan el color naranja a estos hongos) [4]. Los resultados obtenidos con este hongo eran, al igual que con las petunias de Jorgensen, descorazonadores. Los hongos transgénicos de *Neurospora crassa* perdían su color naranja característico por la sobreexpresión de estos genes, resultando en hongos de color blanquecino [4]. Los resultados obtenidos demostraron que el fenómeno de co-supresión no era algo particular de petunias, sino que parecía ser un fenómeno general en eucariontes. Este grupo de investigadores denominaron al fenómeno como “quelling” (que traducido literalmente del inglés significa supresión). Experimentos realizados por varios grupos habían demostrado para entonces que la supresión era un fenómeno que ocurría a nivel post transcripcional, por lo que se le denominó a este fenómeno Silenciamiento de Genes Postranscripcional o PTGS (del inglés Post Transcriptional Gene Silencing) [4].

El siguiente gran avance en el campo del PTGS vino de un grupo de investigadores trabajando con el nematodo *C. elegans*. En 1995 un estudiante llamado Su Guo quien realizaba estudios de Doctorado en el laboratorio del Dr. Kenneth Kemphues de la Universidad de Cornell, estaba introduciendo oligonucleótidos antisentido al nematodo con el fin de inhibir la expresión de algunos genes involucrados en el desarrollo [5]. Su Guo encontró que cuando introducía el oligo sentido y antisentido juntos, la supresión del gen de interés era mucho más eficiente y duradera [5]. A pesar de determinar que eran las dos secuencias, sentido y antisentido juntas, las que potenciaban el efecto de supresión, el grupo del Dr. Kemphues no pudo explicar el fenómeno.

No fue sino hasta 1998 cuando el grupo del Dr. Craig Mello de la Universidad de Carnegie demostró que el fenómeno de PTGS era producido por la formación de RNA de doble cadena en el nematodo [6]. El Dr. Andrew Fire (quien realizaba estudios posdoctorales con Mello) llamó a este fenómeno RNA de interferencia o RNAi, nombre que conserva hasta la fecha [6].

Actualmente sabemos que el fenómeno de PTGS y quelling en plantas y hongos, junto con el fenómeno de RNAi en animales son uno y el mismo [7]. Este fenómeno está altamente conservado a lo largo de la evolución, presentándose en organismos tan variados y distantes como levaduras, diversas plantas unicelulares y pluricelulares, hongos, insectos, nematodos y mamíferos (incluyendo al humano) [7-9]. Sin embargo, es interesante hacer notar que no existen reportes de RNAi en bacterias.

## 2. La cascada del silencio.

La introducción de RNA de doble hebra (dsRNA) en una célula u organismo inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del RNA mensajero (mRNA) de secuencia homologa al dsRNA originalmente introducido [9]. La primera fase del complejo de señalización está a cargo de una ribonucleasa tipo 3 denominada Dicer [2, 9]. Esta ribonucleasa fragmenta el dsRNA en porciones de 21-25 nucleótidos de longitud, los denominados siRNA o RNA interferentes pequeños. Estos siRNAs inducen la formación de un complejo de proteínas denominado RISC (del inglés RNA-Induced Silencing Complex) [9]. El RISC contiene una helicasa (aún no identificada molecularmente), la cual se encarga de separar las dos hebras del siRNA. Durante este paso, el RISC puede quedarse con la hebra sentido o la

antisentido del siRNA. De quedarse con la hebra sentido, no existiría degradación del mRNA. De hecho, esta es la razón por la cual muchas secuencias de siRNAs no inducen RNAi. El mecanismo por el cual el RISC determina con cual hebra quedarse es complejo, pero descubrimientos recientes de nuestro grupo (manuscrito en preparación) y otros [10] parecen indicar que la helicasa del RISC se queda con la hebra del siRNA que sea más fácil de abrir en su extremo 5', es decir, la hebra que tenga el extremo 5' con la menor  $\Delta G$  en sus 4 últimas bases apareadas.

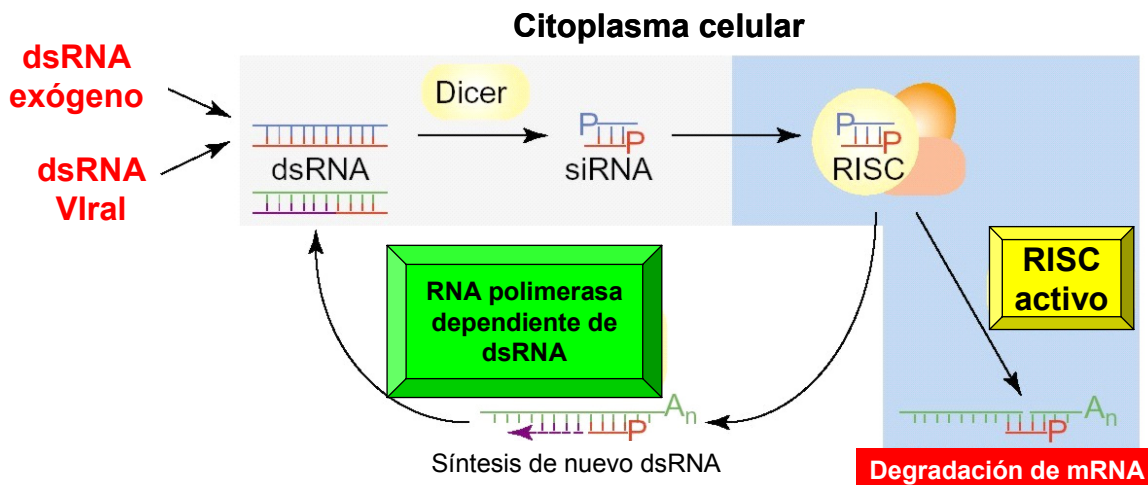
Una vez que el RISC se queda con la hebra sencilla antisentido, una proteína homologa a Dicer (denominada recientemente Dicer2) con actividad de nucleasa se encarga de degradar el mRNA complementario a la secuencia del siRNA [1]. Trabajos publicados este año, indican que Dicer2 forma parte del RISC [1]. Si el RISC se quedara con la hebra sentido, no encontraría un mRNA de secuencia complementaria a la hebra sencilla, por lo que no se daría el fenómeno de RNAi. Al degradarse el mRNA existente en la célula no se producirá nueva proteína, resultando en la depleción de esa proteína en particular [7]. En el nematodo *C. elegans*, existen RNA polimerasas dependientes de dsRNA, las cuales se encargan de amplificar el fenómeno de RNAi, al usar de molde el mRNA degradado para producir nuevo dsRNA, el cual entra a un nuevo ciclo de interferencia al cortarse por Dicer [9]. A la fecha no se ha encontrado actividad de RNA polimerasa dependiente de dsRNA en células de mamífero, en insectos aún queda por demostrarse [9]. Esta compleja cascada de eventos se resume en la figura 1.

A la fecha únicamente se conocen algunos de los componentes del RISC, pero todos ellos están altamente conservados en plantas y animales al igual que Dicer [9].

La figura 2 muestra la comparación estructural de una Dicer de bacteria (*Aquifex aeolicus*), de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y de humano. Como se puede observar en la figura, los dominios de nucleasa en las tres proteínas son casi idénticas estructuralmente. Dicer de humano es mucho más larga que las otras 2 ribonucleasas, conteniendo además un dominio de helicasa único en esta familia.

El complejo RISC ha sido purificado de embriones de *Drosophila* como un conglomerado de 500 kilodaltones (kD). Este complejo muestra, *in vitro*, actividad de endonucleasa y exonucleasa, lo que sugiere la presencia de ambas enzimas. La adición de ATP a la reacción del complejo purificado resulta en la disociación de una parte del complejo, el denominado RISC activo [9]. El complejo en forma activa es el encargado de degradar el mRNA [9].

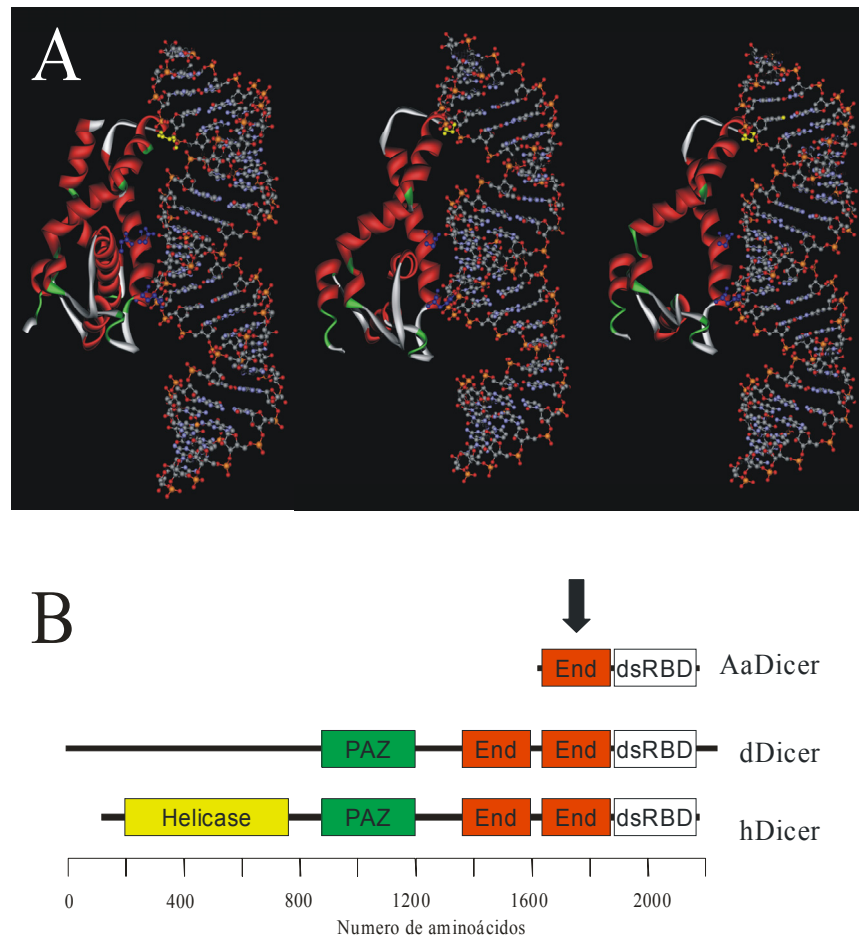
De los miembros identificados a la fecha como parte del RISC sobresalen eIF2c, un factor de inicio de la traducción en animales superiores, que en la planta *Arabidopsis* fue inicialmente identificado y nombrado Argonauta 2 (Argo-2). La familia de Argonautas esta formada por varios miembros y se caracterizan por presentar dominios llamados PAZ y Piwi. El dominio PAZ también está presente en Dicer, tal y como se muestra en la figura 2. Se ha especulado que Dicer podría formar parte del RISC (lo cual quedó probado en tres trabajos muy recientes [1, 2, 11], y que los dominios PAZ presentes en varios miembros del complejo son importantes para la asociación y formación del mismo (esto aún queda por ser probado experimentalmente). A pesar de llevar diferentes nombres, eIF2c (en animales superiores), Argo-2 (en plantas) y RDE-1 (en *C. elegans*) son la misma proteína y forman parte del complejo RISC de silenciamiento en los diferentes organismos mencionados [9]. Lo anterior recalca aún más lo conservada que está la vía de RNAi en diversas plantas y animales.



**Fig. 1. Mecanismo de acción del RNA de interferencia.** El dibujo representa la cascada de eventos iniciados por la introducción de RNA de doble hebra (dsRNA) a una célula. La nucleasa Dicer corta el dsRNA en fragmentos pequeños de 21-25 nucleótidos (siRNA). Estos últimos inician el ensamblaje del complejo RISC, el cual media la degradación del RNA mensajero (mRNA) con secuencia homologa al dsRNA. En plantas y el nematodo *C. elegans*, existe un paso de amplificación mediado por RNA polimerasas dependientes de dsRNA, encargadas de sintetizar nuevo dsRNA.

Otros de los componentes recientemente identificados como parte del RISC en humanos incluyen a la nucleasa llamada *Tudor*, dos helicasas denominadas *Germin3* y *Germin4*, la proteína *VIG* y la "proteína relacionada al cromosoma X frágil" (FMRP) [12]. Estas dos últimas son capaces de unir dsRNA al igual que la familia Argonauta. Mas recientemente se ha identificado a un homologo de Dicer (denominado Dicer2) el cual esta presente en el RISC y parece ser la nucleasa encargada de degradar el mRNA [1, 2, 11].

Como se mencionó con anterioridad, en plantas y *C. elegans* el fenómeno de RNAi se puede amplificar [13]. Este fenómeno se ha denominado RNAi transitivo, y resulta de la amplificación de la cadena de dsRNA original mediante la síntesis complementaria de secuencias aledañas a través de una polimerasa de RNA activada por dsRNA. De esta forma, basta con que una sola molécula de dsRNA entre a una célula de una planta o del nematodo para que la señal se amplifique y resulte en cientos de moléculas de dsRNA complementarias al mRNA. Es por esta razón que en plantas y en *C. elegans* el RNAi es mucho más potente y duradero que en los animales superiores, que carecen de la polimerasa activada por dsRNA [14] (Fig. 1).



**Fig. 2. Comparación de la estructura de 3 enzimas Dicer.** Panel A, representación tridimensional de un siRNA acoplado a la región de endonucleasa de la ribonucleasa tipo III de la bacteria *Aquifex aeolicus* (AaDicer, obtenida del cristal depositado en el RCSB protein data bank: 1I4S (<http://www.rcsb.org/pdb/>), de Dicer de *Drosophila* (dDicer) y Dicer humano (hDicer). Se utilizó el servidor del SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) para ajustar las estructuras de dDicer y hDicer a la de AaDicer mediante minimización de energías. Panel B, La región de endonucleasa usada en la comparación en A se señala en rojo con una flecha en AaDicer. dsRBD (región consenso de unión a dsRNA, en verde se señala el dominio PAZ. La escala inferior muestra el número de amino ácidos.

Una de las grandes incógnitas que faltan aún por resolver tiene que ver precisamente con el fenómeno del RNAi transitivo. ¿Si el fenómeno del RNAi se puede (al menos potencialmente) amplificar continuamente, entonces por qué decae después de un tiempo? Varios investigadores especulan acerca de posibles interruptores de la señal, encargados de impedir que la amplificación de la señal del RNAi se mantenga eternamente. La reciente identificación de una nucleasa específica para el dsRNA denominada ERI-1, pareciera aclarar el misterio [15]. Esta nucleasa degrada el dsRNA impidiendo que entre a un nuevo ciclo de silenciamiento [15]. Recientemente se ha demostrado que esta es la razón por la cual el RNAi no

funciona en neuronas de *C. elegans* [15]. En un principio se especuló que el dsRNA no podía entrar a las neuronas del nematodo; pero hace muy poco se demostró que estas células producen grandes cantidades de esta nucleasa, por lo que el dsRNA se degrada antes de que lo capture el RISC.

### 3. RNAi, microRNAs y RNAs no codificantes.

Si bien el RNAi ha resultado ser una herramienta muy poderosa que ha permitido silenciar una gran cantidad de genes para explorar su función en diversos organismos, lo cierto es que la naturaleza difícilmente generó un sistema tan sofisticado para deleite de los científicos. Un mecanismo tan conservado tiene necesariamente que tener un papel funcional muy importante en los diferentes organismos. En el caso de plantas es generalmente aceptado que el RNAi representa un mecanismo antiviral de defensa contra patógenos. Muchos virus de plantas tienen genomas de dsRNA o producen dsRNA intermediarios durante su replicación. Esto activa el mecanismo de RNAi, resultando en el silenciamiento de los genes virales y previniendo la propagación de la infección viral en la planta.

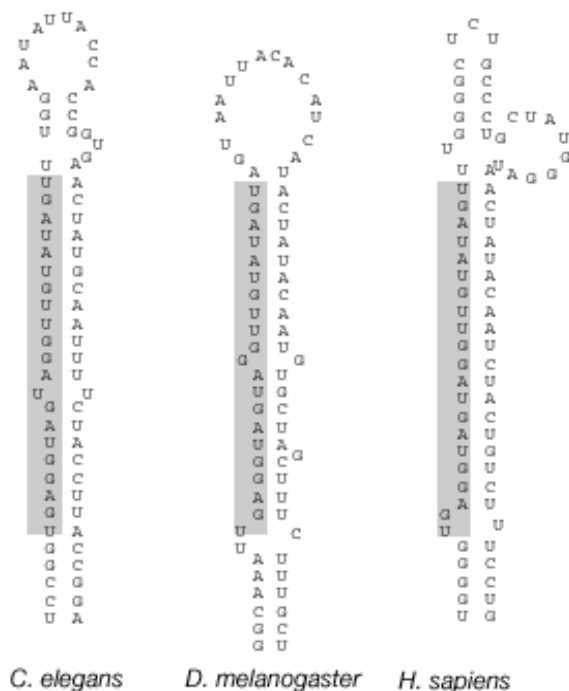
En animales superiores la situación es distinta, ya que poseemos un sistema inmune complejo y eficiente, motivo por el cual no sería muy obvia la necesidad de tener, además de la inmunidad humoral y celular, un sistema de RNAi para combatir infecciones.

Descubrimientos recientes parecen indicar que el fenómeno del RNAi desempeña un papel mucho más sofisticado e interesante en animales, que el de combatir virus y patógenos. El primer descubrimiento en este sentido fue realizado por el grupo del Dr. Víctor Ambros en el año de 1993. A principios de los años 90s, el grupo del Dr. Ambros buscaba mutantes de *C. elegans* que tuvieran problemas durante su desarrollo. Este grupo de investigadores trabajando en la universidad de Harvard estaban interesados en lo que se denomina interruptores maestros, que son genes capaces de regular los tiempos de expresión de múltiples proteínas involucradas en la morfogénesis de animales y plantas.

Estos científicos encontraron un nematodo mutante que presentaba problemas en el curso temporal de la expresión de varios genes esenciales para el desarrollo [16]. Al identificar al gen responsable se sorprendieron al descubrir que dicho gen (denominado por ellos *lin-4*) no codificaba para una proteína, ya que no se trataba de un marco abierto de lectura [16]. El producto de este gen era un RNA de tamaño pequeño, el cual formaba una estructura de asa imperfecta, lo que resultaba en una secuencia de dsRNA de alrededor de 70 nucleótidos [16].

Posteriormente se demostró que *lin-4* se unía a las regiones 3' no traducidas de varios genes involucrados en el desarrollo del nematodo (los cuales comparten estas secuencias repetidas hacia sus extremos 3' no traducidos). El común denominador de estos genes era una serie de secuencias repetidas hacia el extremo 3' que el grupo de Ambros denominó *lin-14* [16, 17].

*lin-4* fue el primer microRNA reportado cuya función se descubrió gracias al uso de mutantes del nematodo. Actualmente se han reportado alrededor de 350 microRNAs presentes tanto en plantas como en animales, e incluso en humanos [18, 19]. Estos microRNAs se encuentran altamente conservados en diferentes especies, la figura 3 muestra el ejemplo de uno de ellos, *let-7* de nematodos, *Drosophila* y humanos.



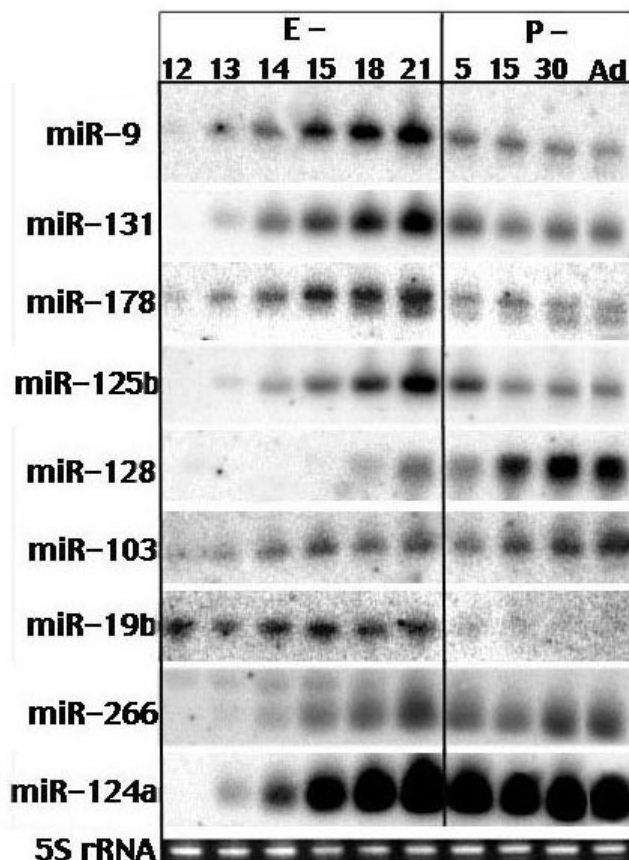
**Fig. 3. Estructura del microRNA *let-7* en 3 organismos diferentes.** Comparación de la estructura tallo-asa imperfecta del microRNA *let-7* en el nematodo *C. elegans*, el insecto *Drosophila* y el humano. Aunque las estructuras son ligeramente diferentes, nótese que la secuencia marcada en gris (la secuencia del microRNA maduro después del corte por Dicer) es idéntica en los 3 organismos. Esta es la región que se une a las regiones 3' no traducidas de los mensajeros blanco.

Los microRNAs se producen en el núcleo de las células, aunque aún se desconoce la identidad de la o las secuencias promotoras responsables de su transcripción [18]. Los microRNAs son sintetizados como precursores en el núcleo (denominados microRNAs primarios) y pueden ser mono o policistrónicos, y son procesados por una ribonucleasa específica y muy conservada denominada Drosha [20]. Posteriormente salen del núcleo a través de los poros nucleares por medio de un sistema de transporte que involucra a la Exportina-5 [21]. Los microRNAs procesados por Drosha se denominan inmaduros o pre-microRNAs y requieren un procesamiento posterior para generar la forma activa o madura [21].

Una vez en el citosol de la célula, los pre-microRNAs se procesan mediante el corte de la enzima Dicer [22], la misma enzima que procesa también a los dsRNAs en el fenómeno de RNAi. El pre-microRNA es cortado formando un dsRNA de 25 nucleótidos (la llamada forma madura) [17, 23, 24]. Este microRNA maduro dirige el ensamblado del RISC y la unión del mRNA al complejo, solo que en este caso el mRNA no es degradado (como en el caso de RNAi), sino que el mRNA se rapta, impidiendo su traducción y la consecuente producción de proteínas [17].

Así pues, *lin-4* es capaz de inhibir la traducción de todos los genes que tengan en su extremo 3' no traducido la secuencia de *lin-14*, que es parcialmente complementaria a *lin-4*. Este mecanismo puede reprimir la expresión de una gran cantidad de genes con un solo inductor, el microRNA *lin-4*. Otros microRNAs reconocen secuencias diferentes en los extremos 3' no traducidos de varios mRNAs. De esta forma, un solo microRNAs es capaz de reprimir la traducción de toda una cascada de señalización [17].

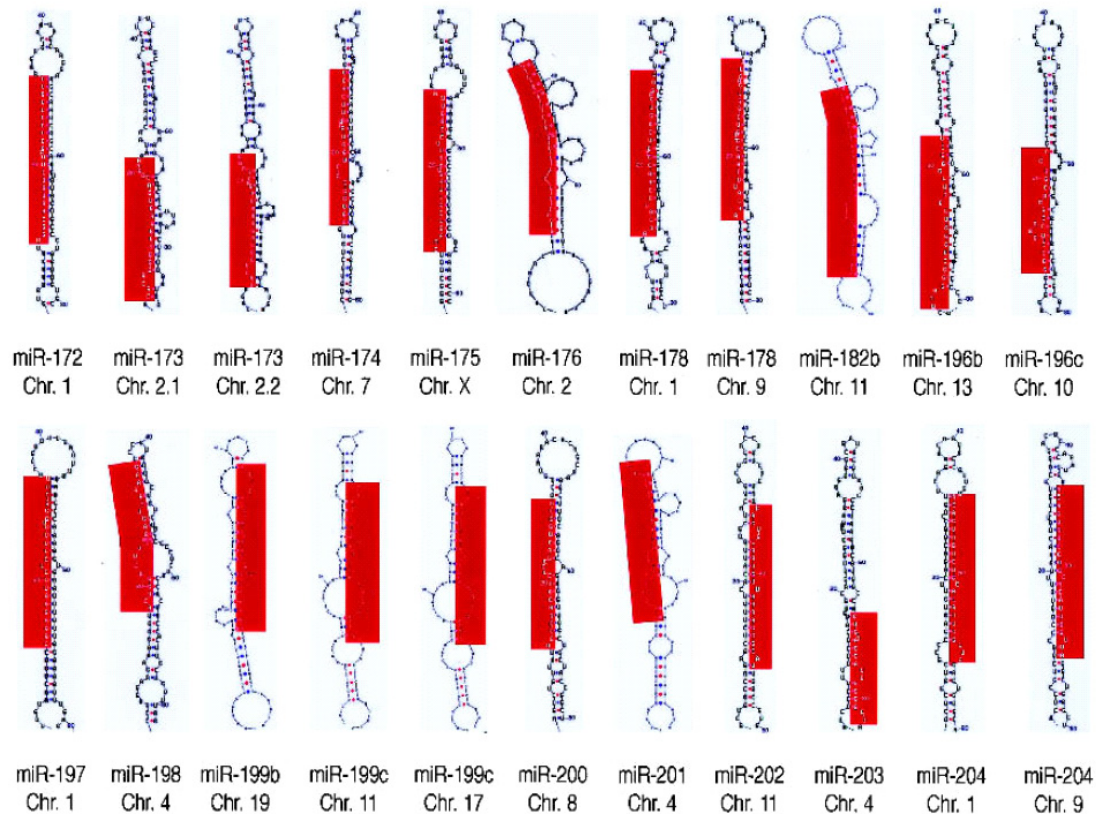
Los microRNAs tienen patrones de expresión que pueden ser célula o tejido específicos [17]. Dentro de una célula o tejido, los microRNAs tienen patrones de expresión temporales muy bien definidos. Así pues, muchos microRNAs se expresan únicamente durante ciertas etapas del desarrollo mientras que otros sólo se expresan en el animal adulto (figura 4). Hay microRNAs específicos de cerebro (tal y como se muestran en la figura 5), mientras que otros sólo los expresan células troncales o madre.



**Fig. 4. Patrón de expresión de varios microRNAs durante el desarrollo del roedor.** La figura muestra los patrones de expresión obtenidos de embriones de 12-21 días de desarrollo fetal (marcados como E) y a los 5, 15 y 30 días posteriores al nacimiento (P). Como control de cargado del Northern se utilizó la subunidad 5S del RNA ribosomal (rRNA). Nótese como mir-9 aumenta durante el desarrollo del embrión y disminuye después del nacimiento del ratón. Mir-19b únicamente se expresa durante la etapa embrionaria y deja de expresarse justo después del nacimiento. Otros microRNAs, como mir-103, se mantienen constantes a lo largo de la vida del animal.

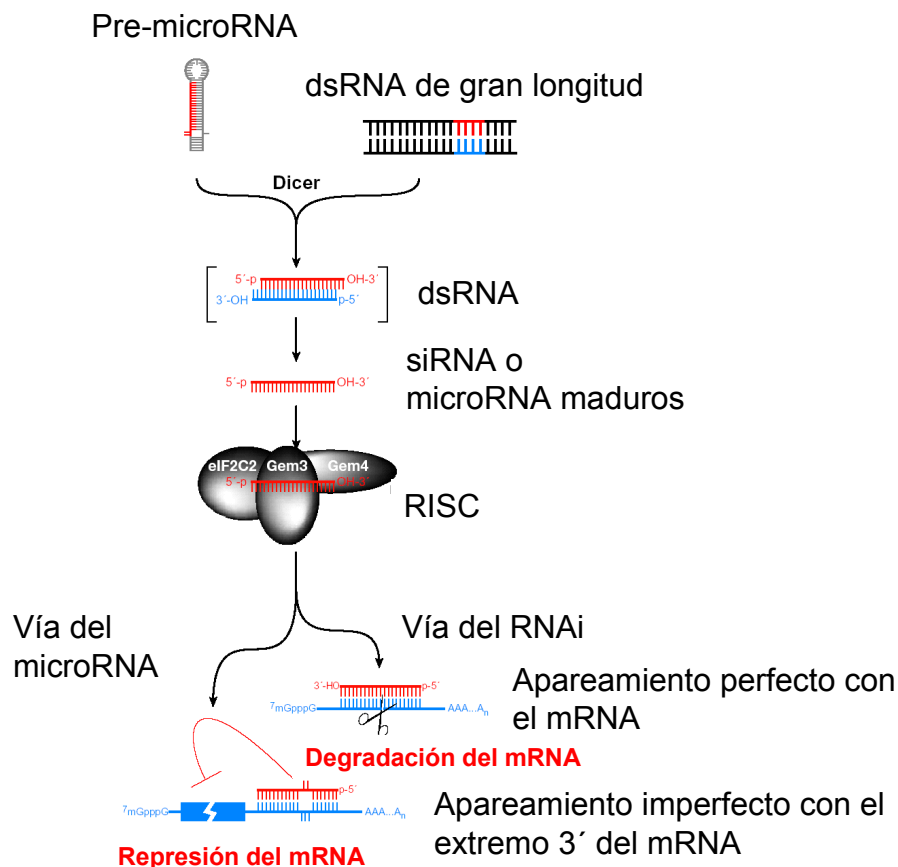
Como se mencionó arriba, existe evidencia muy sólida que indica que las cascadas de RNAi y microRNAs utilizan los mismos sistemas de procesamiento y los mismos efectores [22]. En primer lugar está el caso de Dicer [22], la enzima que procesa dsRNA grandes a siRNAs y que también procesa pre-microRNAs a microRNAs maduros. Posteriormente se ha demostrado que el RISC también participa en el silenciamiento de genes iniciado por microRNAs maduros [17, 19], y no solo en el silenciamiento mediado por siRNAs (figura 6). El resultado final tiene consecuencias similares, en el caso de RNAi el mRNA se degrada y destruye, en el caso de microRNAs se arresta la traducción del mRNA mediante su raptó por el RISC. En ambos casos se deja de producir proteína. Ambos fenómenos son secuencia específicos, es decir, solo se afectan mRNA con secuencias homologas al siRNA o al microRNA. Se podría decir que los microRNAs maduros son el equivalente a siRNAs endógenos.





**Fig. 5. Estructuras de varios microRNAs del cerebro del roedor.** La imagen presenta la caricatura de la estructura de varios microRNAs de expresión exclusiva del cerebro del ratón. La franja roja indica el sitio de corte por Dicer para formar el microRNA maduro. Notese como en todos los casos el corte por Dicer deja un microRNA maduro de alrededor de 21-25 nucleótidos. La posible estructura mostrada de los microRNAs se basa en la estructura de menor energía libre.

El descubrimiento de microRNAs no es trivial. La capacidad de los organismos pluricelulares de producir durante su desarrollo diferentes órganos y células especializadas a tiempos muy específicos requiere la coordinación y control de la expresión de muchos grupos de genes. Los microRNAs son interruptores maestros que coordinan la expresión temporal de muchos genes que a su vez pueden controlar otros grupos de genes. Esta compleja coordinación espacio-temporal permite el desarrollo del sistema nervioso central, del aparato digestivo, y de las extremidades inferiores o superiores en animales, por ejemplo. Estos microRNAs desempeñan varios papeles importantes en el desarrollo del tallo, las flores o bien de la forma de la hoja en plantas [25]. También se ha demostrado que otros microRNAs regulan el tamaño de la mosca *Drosophila* y otros aspectos morfogénicos complejos [26, 27]. A pesar de que se han identificado varios microRNAs en mamíferos, se desconoce a la fecha su función precisa en el desarrollo de animales superiores [18].



**Fig. 6. Convergencias y divergencias en las vías de microRNAs y RNAi.** La caricatura muestra las vías comunes utilizadas por los microRNAs y por los siRNAs usados en experimentos de RNAi. A la izquierda la cascada inicia con el pre-microRNA (la estructura tallo-asa imperfecta similar a los mostrados en la figura anterior). A la derecha se muestra un dsRNA de gran tamaño introducido por el experimentador. Ambos RNAs de doble hebra son procesados por la enzima Dicer para formar los componentes maduros de las vías de microRNA y RNAi. Estos dirigen el ensamblaje del RISC, pero en la vía de microRNA el mensajero (mRNA) no se degrada, sino que se arresta impidiendo su traducción. En la vía de RNAi el mensajero es degradado por el RISC. Se especula que los componentes del RISC podrían variar dinámicamente dependiendo de si la vía fue iniciada por un microRNA o por un siRNA. Evidencia muy reciente parece indicar que este es el caso (ver [1, 2])

#### 4. Usos y promesas del RNAi.

Aunque la cascada de RNAi es esencial para madurar y regular el efecto de microRNAs, también es cierto que los científicos hemos tomado ventaja de este poderoso fenómeno con fines experimentales e incluso terapéuticos. En esta sección hablaremos brevemente de algunos aspectos interesantes de muy reciente desarrollo en donde se utiliza al RNAi para explorar la función de muchos genes de forma simultánea, o bien como una herramienta terapéutica en la lucha contra agentes virales.

#### **4.1 ¿La siguiente generación de agentes antivirales?**

Muy recientemente se ha demostrado el poder del uso de dsRNA para silenciar genes importantes para la replicación y morfogénesis de varios virus que afectan a los animales. La introducción de dsRNA homólogos a regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [28], del virus de la polio [29] y de la hepatitis C [30] en células humanas confiere resistencia a la infección por estos virus.

Más recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que es factible utilizar dsRNA en animales vivos para prevenir infecciones virales por virus muy agresivos [31, 32]. Estos hallazgos han permitido especular sobre el posible uso de fragmentos de dsRNA como vacunas antivirales, o aun en el tratamiento de infecciones virales ya establecidas [32].

Después de estos trabajos iniciales, una gran cantidad de grupos de investigación alrededor del mundo se han dedicado a buscar secuencias de dsRNA que puedan servir en el combate de infecciones por muy diversos virus que afectan a humanos y otros animales [33].

Experimentos con animales de granja han permitido valorar el posible uso de dsRNA para contrarrestar infecciones virales que afectan a la industria alimenticia. La eficacia del uso de dsRNA y de RNAi como herramientas antivirales podría representar el inicio de una nueva era de terapias antivirales. Aunque aun faltan muchas pruebas antes de que el RNAi se utilice como una herramienta en la clínica o en la industria alimenticia. Es necesario determinar, primero, el efecto de la inyección de dsRNA en humanos con el fin de identificar cualquier posible efecto secundario. El uso de dsRNA en animales podría ser, quizá, más seguro y rápido de implementar [32]. Si bien los primeros pasos ya se han dado, aun así falta mucho trabajo experimental antes de que el RNAi se utilice en gran escala.

#### **4.2 El que calla otorga: silenciando genes para explorar su función.**

En los últimos 10 años hemos sido testigos de una verdadera explosión en el área de la Genómica y la Biología Molecular. Después de grandes esfuerzos que involucraron grupos multidisciplinarios alrededor del mundo, hemos podido terminar la secuenciación de varios genomas, entre los que destacan el de la rata, el ratón y (desde luego) el humano.

Ahora se nos presenta uno de los retos más grandes que ha enfrentado la Biología moderna, el de identificar la función de miles de genes con función desconocida. Esta tarea esta lejos de ser simple, por ejemplo, se especula que el genoma humano está formado por alrededor de 40,000 genes de los cuales conocemos la función de menos de la mitad.

En este sentido el RNAi nos brinda una posibilidad insuperable, la capacidad de silenciar muchos genes de forma simultánea y rápida [7, 34, 35]. Trabajos recientes han demostrado que es factible silenciar simultáneamente todos los genes de un cromosoma completo del nematodo *C. elegans*, lo cual le ha dado un significado profundo al termino RNAi genómico [7, 34, 35].

De esta forma no es descabellado pensar que en un futuro cercano grupos de investigadores se den a la tarea de silenciar genes con funciones desconocidas en ratones y otros organismos [7]. Un trabajo sistemático de este tipo permitiría conocer la función de la mayoría de los genes que forman un genoma complejo (como el del ratón) en tan solo unos años

[7]. Conociendo la función de los genes en el ratón, uno podría inferir la función de homólogos de estos genes en humanos.

## 5. Conclusiones

La búsqueda por mejorar una flor de ornamento nos ha llevado a uno de los descubrimientos más interesantes y relevantes de la Biología moderna, el RNA de interferencia. Esta metodología promete facilitarnos el trabajo en la identificación de la función de muchos genes, así como también producir una nueva generación de agentes antivirales muy selectivos y eficientes. Otro uso poco explorado a la fecha del RNAi reside en la inhibición de oncogenes que se encuentran alterados en células cancerígenas [36-38]. Aunque faltan varias barreras por rebasar, como la vía de administración del dsRNA, efectos secundarios en su administración, dosis, contraindicaciones, etc., lo cierto es que experimentos iniciales con RNAi inhibiendo infecciones virales o el crecimiento de tumores han dado resultados muy alentadores.

Finalmente, el uso de RNAi como una herramienta en el silenciamiento de genes muy seguramente impulsará notablemente nuestro avance en la determinación de la función de los miles de genes sin función conocida presentes en los genomas de animales de interés en el laboratorio y del mismo hombre.

La era del RNA apenas inicia, aun faltan muchos secretos por descubrir, como la identidad de todos los integrantes del RISC, el mecanismo de propagación de la señal de silenciamiento para las RNA polimerasas dependientes de dsRNA, etc. En el campo de los microRNAs faltan por determinar los blancos de los cientos de microRNAs identificados a la fecha, la función de esos genes blanco durante el desarrollo en animales superiores, etc. Igualmente interesante será la identificación de enfermedades congénitas debidas a alteraciones en algunos microRNAs, como ha sucedido recientemente con el síndrome de retraso mental asociado al cromosoma X frágil y algunos tipos de cáncer.

## AGRADECIMIENTOS

Parte del trabajo experimental mostrado fue apoyado por un donativo otorgado por la Fundación Miguel Alemán, Fundación Alexander von Humboldt, DGAPA y CONACYT a Luis Vaca. Quiero agradecer el excelente apoyo técnico de Alicia Sampieri. Los modelos mostrados en la figura 2 fueron realizados por el alumno de Doctorado Carlos Fabián Flores Jasso.

## REFERENCIAS

1. Pham, J.W., et al., *A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in Drosophila*. Cell, 2004. **117**(1): 83-94.
2. Tijsterman, M. and R.H. Plasterk, *Dicers at RISC; The Mechanism of RNAi*. Cell, 2004. **117**(1): 1-3.
3. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell, 1990. **2**(4): 279-289.
4. Romano, N. and G. Macino, *Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences*. Mol Microbiol, 1992. **6**(22): 3343-3353.
5. Guo, S. and K.J. Kemphues, *Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early Caenorhabditis elegans embryo*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(4): 408-415.

6. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): 806-811.
7. Agrawal, N., et al., *RNA interference: biology, mechanism, and applications*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): 657-685.
8. Denli, A.M. and G.J. Hannon, *RNAi: an ever-growing puzzle*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(4): 196-201.
9. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): 244-251.
10. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): 326-330.
11. Lee, Y.S., et al., *Distinct Roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways*. Cell, 2004. **117**(1): 69-81.
12. Siomi, H., A. Ishizuka, and M.C. Siomi, *RNA interference: a new mechanism by which FMRP acts in the normal brain? What can Drosophila teach us?* Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2004. **10**(1): 68-74.
13. Tang, G. and P.D. Zamore, *Biochemical dissection of RNA silencing in plants*. Methods Mol Biol, 2004. **257**: 223-244.
14. Stein, P., et al., *RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase*. Rna, 2003. **9**(2): 187-92.
15. Kennedy, S., D. Wang, and G. Ruvkun, *A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in C. elegans*. Nature, 2004. **427**(6975): 645-649.
16. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): 843-854.
17. Ambros, V., *microRNAs: tiny regulators with great potential*. Cell, 2001. **107**(7): 823-826.
18. Carrington, J.C. and V. Ambros, *Role of microRNAs in plant and animal development*. Science, 2003. **301**(5631): 336-338.
19. Ambros, V., *MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing*. Cell, 2003. **113**(6): 673-676.
20. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): 415-419.
21. Bohnsack, M.T., K. Czapinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. Rna, 2004. **10**(2): 185-191.
22. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): 2056-2060.
23. Ma, Z.L., H.Y. Yang, and P. Tien, *[Progress of miRNA and its functions in eukaryotes]*. Yi Chuan Xue Bao, 2003. **30**(7): 693-696.
24. Huttenhofer, A., J. Brosius, and J.P. Bachellerie, *RNomics: identification and function of small, non-messenger RNAs*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(6): 835-843.
25. Hake, S., *MicroRNAs: a role in plant development*. Curr Biol, 2003. **13**(21): R851-R852.
26. Hipfner, D.R., K. Weigmann, and S.M. Cohen, *The bantam gene regulates Drosophila growth*. Genetics, 2002. **161**(4): 1527-1537.
27. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell, 2003. **113**(1): 25-36.
28. Jacque, J.M., K. Triques, and M. Stevenson, *Modulation of HIV-1 replication by RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6896): 435-438.
29. Dector, M.A., et al., *Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs*. EMBO Rep, 2002. **3**(12): 1175-1180.
30. Kapadia, S.B., A. Brideau-Andersen, and F.V. Chisari, *Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): 2014-2018.
31. Valdes, V.J., et al., *Using double-stranded RNA to prevent in vitro and in vivo viral infections by recombinant baculovirus*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): 19317-19324.
32. Flores-Jasso, C.F., et al., *Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference*. Virus Res, 2004. **102**(1): 75-84.
33. Wang, Q.C., Q.H. Nie, and Z.H. Feng, *RNA interference: antiviral weapon and beyond*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(8): 1657-1661.
34. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): 325-330.
35. Maeda, I., et al., *Large-scale analysis of gene function in Caenorhabditis elegans by high-throughput RNAi*. Curr Biol, 2001. **11**(3): 171-176.
36. Ait-Si-Ali, S., V. Guasconi, and A. Harel-Bellan, *[RNA interference and its possible use in cancer therapy]*. Bull Cancer, 2004. **91**(1): 15-18.

37. Lima, R.T., et al., *Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells*. Cancer Gene Ther, 2004.
38. Woessmann, W., et al., *RNA interference: new mechanisms for targeted treatment?* Rev Clin Exp Hematol, 2003. 7(3): 270-291.

## RNA INTERFERENTE: UNA HERRAMIENTA Y UN NOVEDOSO MECANISMO DE REGULACIÓN GÉNICA

### Resumen

*En los últimos 7 años una verdadera revolución en el campo de la Biología ha posicionado a los RNAs en un papel central, gracias al descubrimiento del llamado RNA interferente o RNAi. Originalmente las moléculas de RNA se consideraban simples mensajeros encargados de transmitir la información genética del núcleo a los ribosomas, para efectuar la síntesis de proteínas. Actualmente, el descubrimiento reciente de una nueva clase de RNAs, los denominados microRNAs o miRNAs, así como un complejo multiproteico asociado a estos últimos, ha permitido dilucidar nuevos papeles para los RNAs en la represión de la traducción. Una sola de estas moléculas pequeñas de RNA (el miRNA) puede regular la expresión de varios genes simultáneamente, controlando de esta forma, la expresión de cascadas de transducción completas. En plantas, por ejemplo, un solo miRNA está a cargo de controlar la forma y tamaño de las hojas, mientras que en la mosca Drosophila un miRNA controla el tamaño del animal adulto, al regular el balance entre la división celular y la apoptosis. Todos estos descubrimientos transformaron nuestra visión lineal y simplista de una molécula de DNA, una de RNA y una proteína. Los cientos de miRNAs que se han reportado a la fecha nos permiten comprender el por qué de tantas secuencias en los genomas que no codifican para proteínas. Muchas de estas secuencias invertidas repetidas se transcriben formando los miRNAs. En asociación cercana a ribosomas, los científicos han descubierto una maquinaria novedosa (complejo multiproteico) de represión dirigida por miRNAs. En el presente trabajo revisaremos los aspectos más relevantes del RNAi, un campo que evoluciona a una velocidad vertiginosa. Igualmente especularemos sobre posibles usos de tecnología derivada del RNAi en el campo de la Medicina, como herramientas terapéuticas en el tratamiento de infecciones virales, cáncer y otras patologías.*

**Palabras clave:** RNA interferente, RNAi; RNA de doble cadena, dsRNA; regulación génica; Dicer; silenciamiento de genes; terapia antiviral.

## Semblanza del Dr. Luis Vaca.



Medico Cirujano por la Universidad Autónoma Metropolitana. En 1989 obtuvo el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica y en 1994 de Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Nacional Autónoma de México, además de una segunda maestría en The Institute for Computer Sciences, Houston, TX. EUA en agosto de 1994. Actualmente es Investigador Titular C en el Departamento de Biología Celular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y es Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

Su área de investigación es sobre la homeostasis de calcio en células no excitables, los canales iónicos, los sistemas de transducción de señales celulares ( $IP_3$ , proteínas G, etc.), la mutagénesis dirigida en canales iónicos y los estudios de estructura-función en canales iónicos y uso de RNA interferente para silenciar canales iónicos *in vitro* e *in vivo*. Ha publicado 39 artículos internacionales que han recogido 1025 citas internacionales. Ha desarrollado diversos programas de computación relacionados con la adquisición y análisis de datos electrofisiológicos, y para calcular la difusión iónica en membranas, entre otros. Ha sido tutor de 9 tesis de posgrado y 5 de licenciatura. Ha impartido 4 cursos de posgrado en The Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EUA y 7 en los posgrados de la Universidad Nacional Autónoma de México. Es revisor de las siguientes revistas científicas internacionales: American Journal of Physiology; Cell Physiol; American Journal of Physiology: Heart and Circ. Physiol; Journal of Membrane Biology; Circulation Research; y Cell Calcium Biophysical Journal. Ha recibido diversos premios y distinciones, tales como la Medalla Gabino Barreda, el Cystic Fibrosis Foundation Fellowship, EUA; el American Heart Association Grant-in-Aid from the National Center; Training Grant from the National Institutes of Health (NIH); el Premio Alexander von Humboldt; y el Premio Miguel Alemán en Investigación en Salud 2001. El Dr. Luis Vaca es miembro de diferentes Sociedades Científicas, entre las que se encuentran la New York Academy of Sciences; la Biophysical Society; la American Physiological Society; la American Heart Council on Basic Science; la International Society on Toxicology y la Sociedad Mexicana de Bioquímica.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## ESTRUCTURA, FUNCIÓN E INGENIERÍA MOLECULAR DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DIGESTIÓN DE CARBOHIDRATOS.

Julio Polaina

Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos  
Apartado de Correos 73, E46100-Burjasot (Valencia), España  
[jpolaina@iata.csic.es](mailto:jpolaina@iata.csic.es)

### STRUCTURE, FUNCTION AND MOLECULAR ENGINEERING OF ENZYMES INVOLVED IN CARBOHYDRATE DIGESTION.

#### Abstract.

*Carbohydrate-hydrolysing enzymes (carbohydrases or glycoside hydrolases) have outstanding biochemical relevance due to the importance of carbohydrates, both quantitatively and qualitatively, as constituent of living material. Current classification of glycoside hydrolases, based on the homology of their amino acid sequences, includes nearly 100 families and reveals important structural and phylogenetic relationships among these enzymes. Enzymatic hydrolysis of the glycosidic bond takes place by the action of two residues present in the catalytic centre: a proton donor and a nucleophile/base. In the last few years, the three-dimensional structure of a large number of glycoside hydrolases have been resolved. Comparative analyses have shown the existence of structural similarities among different enzyme families allowing their classification in superfamilies of clans. Carbohydrases, like other enzymes, have an increasing commercial value because of their use in food, chemical and pharmaceutical industries. Progress of studies on protein structure and function, based on the development of new biological disciplines like genomics, proteomics and bioinformatics, has produced a great advance of protein engineering that shall led to the designing and production of enzymes with novel properties.*

**Keywords:** carbohydrate digestion; carbohydrases; glycoside hydrolases; protein engineering; glycosidic bond.



## 1. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos son el tipo de compuesto biológico más abundante puesto que forman parte de la materia viva en cantidad muy superior a proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Las formas de carbohidratos más abundantes en la Naturaleza son los polisacáridos, macromoléculas constituidas por la polimerización de unidades moleculares de azúcares sencillos o monosacáridos. El principal monosacárido es la glucosa, cuya polimerización da lugar a dos grandes grupos de polisacáridos de gran importancia para la vida: la celulosa y el almidón. Ambos compuestos están constituidos fundamentalmente por cadenas lineales de moléculas de glucosa, unidas por enlaces glicosídicos que enlazan el carbono 1 de un residuo de glucosa con el carbono 4 del siguiente residuo. La orientación espacial de este enlace, a su vez determinada por la configuración ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del átomo de carbono anomérico situado en la posición 1 de la molécula de glucosa, prefigura las propiedades estructurales y la función biológica del polisacárido resultante. La unión de dos moléculas de glucosa por un enlace  $\alpha 1 \rightarrow 4$  da lugar al disacárido maltosa, mientras que si el enlace es  $\beta 1 \rightarrow 4$  el disacárido resultante es celobiosa (Figura 1).

La polimerización de sucesivas moléculas de glucosa mediante uno u otro tipo de enlace da lugar al almidón y a la celulosa, respectivamente. Estos dos polisacáridos tienen funciones distintas. El almidón es una molécula de reserva energética, utilizada como materia prima para la obtención de energía por muchos seres vivos. La celulosa es el principal componente de la pared celular vegetal y contribuye de manera determinante a la consistencia y resistencia estructural de las plantas. Aparte de celulosa y almidón, existen otros importantes polisacáridos como el xilano, el manano y la quitina, constituidos por la polimerización de monosacáridos diferentes a la glucosa como son la xilosa, la manosa y la acetilglucosamina. El xilano es, junto a la celulosa, un importante material estructural de las plantas. El manano es un constituyente de la pared celular de hongos. La quitina forma parte de la pared celular de hongos y del exoesqueleto de los artrópodos.

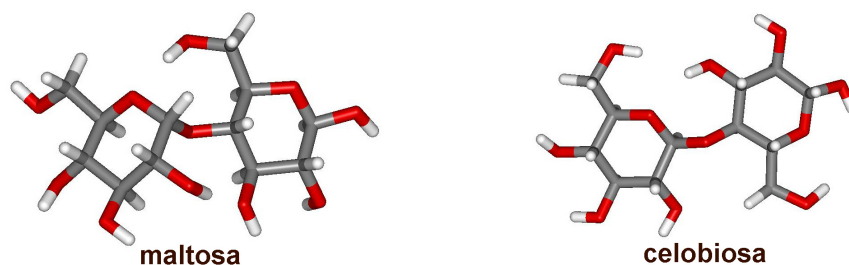
La mayoría de los azúcares sencillos (monosacáridos, disacáridos, etc.) no existen como tales en la Naturaleza en cantidad apreciable, sino que se encuentran formando parte de polisacáridos. No obstante, hay algunos relativamente abundantes y muy importantes por su relación con la nutrición humana y animal. Es el caso de la glucosa, que es el azúcar de la uva, cuya fermentación da lugar al vino; la lactosa o azúcar de la leche y la sacarosa, azúcar común o de mesa.

Con frecuencia, los azúcares se presentan unidos mediante enlaces glicosídicos a compuestos químicos de diferente naturaleza. Es frecuente su unión a grupos que contienen nitrógeno, fósforo o azufre. Por ejemplo, la acetilglucosamina, cuya polimerización da lugar a la quitina, contiene nitrógeno. Otro ejemplo de gran significación es la unión de ribosa y desoxiribosa al ácido fosfórico y a una base nitrogenada, para constituir los nucleótidos y los ácidos nucleicos. También es frecuente que los carbohidratos se presenten en forma conjugada, unidos a proteínas o a lípidos.

## 2. CARBOHIDRASAS: CLASIFICACIÓN

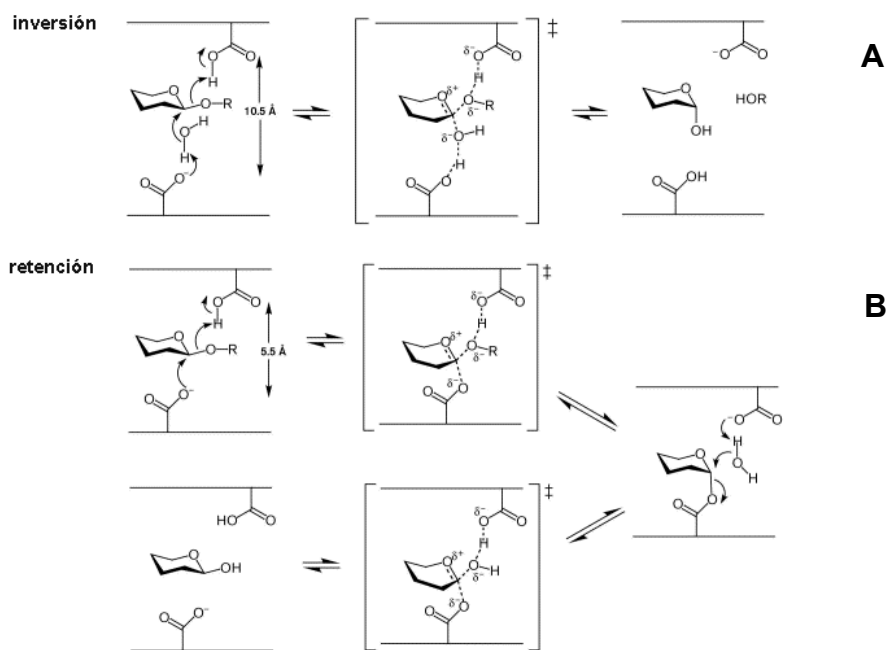
Las carbohidrasas constituyen un grupo muy amplio y variado de enzimas cuya característica común es la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico que forma el eslabón de enlace de los azúcares. Con mayor propiedad bioquímica se denominan glicosil hidrolasas. Al igual que el resto de enzimas, las glicosil hidrolasas se clasifican siguiendo las recomendaciones originalmente establecidas por el "Nomenclature Committee" (NC) de la "International Union of

Biochemistry” (IUB), posteriormente adoptada por otras organizaciones bioquímicas internacionales, como la “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) y la “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB). Esta clasificación establece un Catálogo de Enzimas (“Enzyme Catalog”, abreviado EC) que asigna a cada enzima un código numérico basado en el tipo de reacción catalizada y en la especificidad de sustrato. Las glicosil hidrolasas son definidas como (EC 3.2.1.x), donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glicosídico, y el cuarto (x) indica el tipo de sustrato. Aunque esta clasificación es de gran utilidad, no aporta información sobre aspectos muy importantes de las enzimas como son su estructura molecular y sus relaciones filogenéticas. Para suplir estas limitaciones, Henrissat y colaboradores han establecido una clasificación de las glicosil hidrolasas complementaria a la anterior, basada en la similitud de sus secuencias de aminoácidos. Esta clasificación, que en su primera edición (15) distinguía 35 familias, ha ido ampliándose en el transcurso de los años, a medida que aparecen publicados datos de secuencia de nuevas enzimas (8), y en la actualidad cuenta con cerca de 100 familias. Una versión actualizada está disponible en Internet, en la dirección (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>). La metodología utilizada para la clasificación parte de la elaboración de una matriz de datos con la secuencia primaria de todas las glicosil hidrolasas de secuencia conocida, obtenida de la base de datos SWISSPROT (<http://www.expasy.org/sprot/>). El conjunto de secuencias es analizado con una serie de programas informáticos para establecer su homología y relación filogenética. El resultado ofrece información muy valiosa. Además de hacer evidente las relaciones de parentesco, permite obtener modelos de la estructura tridimensional de las enzimas, mediante técnicas de modelado comparativo con proteínas homólogas de estructura resuelta, ya que la similitud de secuencia entre proteínas (estructura primaria) implica un parecido aún más notable en su estructura tridimensional (estructura terciaria; (7)). Algunas familias cuentan con gran número de enzimas, implicadas en procesos biológicos muy diversos y presentes en todo tipo de organismos vivos, mientras que otras familias están constituidas por enzimas que podrían considerarse peculiaridades evolutivas, responsables de funciones muy particulares, o presentes solamente en un reducido número de organismos. Una característica fácilmente apreciable es que la clasificación presenta cierto sesgo cronológico, manifestado porque las familias con un número de orden más bajo corresponden, en términos generales, a tipos enzimáticos más ubicuos y significativos que ya aparecían incluidos en la clasificación inicial de 35 familias, realizada en 1991. A medida que se han ido caracterizando nuevos tipos de enzimas, se ha puesto de manifiesto la existencia de nuevas familias, hasta las más de 90 descritas hasta ahora, muchas de las cuales corresponden a enzimas menos abundantes en la naturaleza, o poco significativas y pobremente caracterizadas.



**Figura 1.** Representación de las moléculas de maltosa y celobiosa. Estos azúcares ilustran los dos tipos principales de enlace que dan lugar al almidón y a la celulosa. La diferencia entre ambos disacáridos estriba en la orientación del enlace glicosídico establecido entre los átomos de carbono 1 y 4 de los dos residuos de glucosa enlazados:  $\alpha$ , en la maltosa y  $\beta$ , en la celobiosa.

Es interesante resaltar el carácter complementario que tienen la clasificación de enzimas en base a similitud de secuencia, que aporta información evolutiva y estructural, y la clasificación de la IUB, que refleja la función enzimática y el tipo de reacción catalizada. Haciendo uso simultáneo de ambas clasificaciones, podemos distinguir un primer grupo de enzimas involucrados en la hidrólisis de enlaces glicosídicos presentes en los azúcares más sencillos (disacáridos). Es el caso de enzimas clasificados en familias muy extensas y bien caracterizadas, como por ejemplo las familias 1, 2 y 3 de la clasificación de Henrissat. La familia 1 incluye enzimas presentes en todo tipo de seres vivos: arqueas, bacterias y eucariotas (hongos, plantas y animales) y se caracteriza por hidrolizar enlaces  $\beta$ -glicosídicos de disacáridos como la celobiosa y la lactosa. En el caso de muchas bacterias se trata de  $\beta$ -glucosidasas (celobiasas) que actúan en la etapa final de los procesos naturales de descomposición de la celulosa, hidrolizando la celobiosa generada por la acción de endo y exo celulasas. A éste grupo también pertenece un enzima de gran significación como es la lactasa intestinal humana. En la familia 2 se incluyen enzimas con actividad  $\beta$ -galactosidasa (lactasa) o  $\beta$ -glucuronidasa, descritas en bacterias, hongos y animales, pero no en plantas. Una enzima perteneciente a esta familia tiene gran relevancia por su empleo en estudios bioquímicos. Se trata de la  $\beta$ -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* de la bacteria *Escherichia coli*. Esta enzima es utilizado como marcador de expresión genética en la mayoría de plásmidos empleados como vectores de clonación para ingeniería genética. La familia 3 incluye  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -xilosidasas presentes en bacterias, hongos y plantas, pero no en animales.



**Figura 2.** Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico. El esquema representa la reacción que ocurre en el sitio catalítico de las glicosil hidrolasas que operan mediante: **A**, mecanismo de inversión. **B**, Mecanismo de retención. Adaptado de Rye and Withers (26).

Un segundo grupo de familias relacionadas por su función son aquellas que incluyen enzimas involucradas en la digestión de la celulosa. En este grupo están, entre otras, las familias 5-12. Algunas de estas familias, como la 5 y la 10, incluyen enzimas presentes en bacterias, hongos y plantas. Otras, la 6, 11 y 12, están representadas en bacterias y hongos. En los casos de las familias 7 y 8, todas las enzimas caracterizadas pertenecen a hongos o a bacterias, respectivamente. No todas las enzimas incluidas en este grupo de familias son celulasas; hay muchas enzimas con otro tipo de actividad. Por ejemplo, hay xilanasas clasificadas en las familias 5, 8, 10, 11 y 12. El hecho de que enzimas pertenecientes a una misma familia, homólogas en secuencia y por tanto con estructura tridimensional parecida, sean activas frente a substratos distintos, como son la celulosa y el xilano, se explica por la relación estructural existente entre estos dos polisacáridos. Si bien la unidad monomérica es distinta en uno y otro caso: una hexosa, la glucosa, en la celulosa y una pentosa, la xilosa, en el xilano, los sucesivos enlaces  $\beta$ -glicosídicos que constituyen ambos polisacáridos se estructuran espacialmente de forma similar.

Un tercer grupo significativo de familias son las que agrupan enzimas relacionadas con la hidrólisis del almidón. La mayoría de las amilasas están clasificadas en las familias 13, 14 y 15. Cada una de estas familias incluye de forma preferente cada uno de los tres principales tipos de actividad amilasa:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y glucoamilasa, respectivamente. Los enzimas de la familia 13 están representados en todo tipo de organismos vivos. La presencia de enzimas de la familia 14 se limita a bacterias y plantas, y las de la familia 15 a bacterias y hongos.

Una peculiaridad interesante de la clasificación por homología de secuencia es la existencia de cuatro familias distintas, las designadas 22-25, que incluyen enzimas con actividad lisozima. Esta enzima es un importante agente antibacteriano que actúa hidrolizando el enlace  $\beta$ -glicosídico existente entre unidades consecutivas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico en el entramado glicoproteico que forma la pared celular de muchas bacterias. La familia 22 incluye enzimas muy extendidas en el Reino Animal. Las otras tres enzimas incluyen distintas formas de lisozima bacteriana. Entre las enzimas de la familia 24 existen un conjunto de ellas codificadas por genes incorporados en genomas de virus bacteriófagos.

Respecto a la hidrólisis de otros polisacáridos relevantes, las quitinasas aparecen clasificadas en las familias 18 y 19. La familia 18 incluye enzimas presentes en organismos de todo tipo, mientras que la familia 19 incluye predominantemente quitinasas de plantas, relacionadas con el mecanismo de defensa frente a la infección por hongos. La mayor parte de las mananasas aparecen en la familia 26, si bien hay enzimas con esta actividad en las familias 5 y 44.

### 3. MECANISMOS DE HIDRÓLISIS DEL ENLACE GLICOSÍDICO

La hidrólisis del enlace glicosídico catalizada por las distintas variedades de glicosil hidrolasas está mediada por la acción de dos residuos catalíticos presentes en el centro activo, uno de los cuales actúa como donador de protones y el otro como nucleófilo o base. En la mayor parte de los casos son dos residuos carboxílicos. El enlace glicosídico puede hidrolizarse de dos formas distintas, atendiendo a cual sea la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis. Una primera posibilidad es que la configuración anomérica cambie. A la reacción hidrolítica que se desarrolla de esta forma se la designa como mecanismo de inversión (Figura 2A). La posibilidad alternativa es que la configuración anomérica se mantenga. Es lo que se denomina mecanismo de retención (Figura 2B). En las glicosidasas que operan mediante inversión, la distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos es de aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas que retienen la configuración del enlace, la separación es alrededor de 5 Å. El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque

de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno. El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento. En este proceso tiene lugar el ataque del residuo nucleófilo al carbono anomérico. Como resultado tiene lugar la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glicósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glicosídico, y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua que deshace el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (10,17,26,30).

#### 4. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE CARBOHIDRASAS

La extensa investigación bioquímica desarrollada con carbohidrasas ha proporcionado excelentes sistemas modelo para el estudio de problemas relacionados con la estructura tridimensional de las proteínas y su función. Una glicosil hidrolasa, la lisozima de la clara de huevo, fue la segunda proteína, y la primera enzima, cuya estructura tridimensional fue determinada (5).

Las carbohidrasas generalmente son muy apropiadas para ser empleadas como enzimas modelo en la investigación bioquímica, debido a que su actividad suele ser fácilmente medible y a que son susceptibles de ser estudiadas con una metodología relativamente sencilla. En el caso de enzimas de origen bacteriano, sus genes carecen de intrones y pueden ser clonados en *Escherichia coli* directamente, sin necesidad de obtener la secuencia de cDNA a partir del mRNA. En muchos casos, la expresión en *E. coli* de genes heterólogos que codifican carbohidrasas se pone de manifiesto mediante un sencillo análisis colorimétrico, que permite la selección directa del gen. Por ejemplo, la bacteria *Paenibacillus polymyxa* (anteriormente clasificada como *Bacillus polymyxa*) produce dos  $\beta$ -glucosidasas distintas, pero con secuencias homólogas, clasificadas en la familia 1 (EC 3.2.1.21). Para clonar estos genes, se transformó *E. coli* con plásmidos que contenían fragmentos aleatorios de DNA de *P. polymyxa*. Las colonias transformantes se incubaron en un medio que contenía un análogo del sustrato natural del enzima (celobiosa), el *p*-nitrofenil- $\beta$ -glucosido, cuya hidrólisis libera nitrofenilo de color amarillo (Figura 3). El desarrollo de color permitió identificar colonias de *E. coli* portadoras de los genes buscados (14). La relativa sencillez metodológica del trabajo con glicosil hidrolasas ha permitido que en los últimos años se haya determinado la estructura tridimensional de un elevado número de estas enzimas. En la actualidad hay al menos, 52 familias, más de la mitad de las que han sido caracterizadas, de las cuales se ha resuelto la estructura tridimensional de al menos una enzima representativa de cada familia. Es llamativo el hecho de que a pesar de que todas las glicosil hidrolasas hidrolizan el mismo tipo de enlace, estas enzimas muestran una extraordinaria diversidad estructural.

El análisis comparativo de las estructuras tridimensionales resueltas ha revelado relaciones entre proteínas de distintas familias que presentan motivos estructurales comunes. De este análisis surge una clasificación de las familias en "clanes", denominados también "superfamilias". Los clanes agrupan enzimas de distintas familias, entre las cuales no puede establecerse homología discernible de estructura primaria, pero cuyas estructuras tridimensionales presentan elementos comunes que revelan una remota relación filogenética. El clan más numeroso, con diferencia sobre los demás, es el denominado GH-A, caracterizado por una estructura de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> también denominado "TIM-barrel" (por corresponder a la estructura de la enzima "Triose-phosphate isomerase"). Este motivo estructural es además, con gran diferencia, el más frecuente en el conjunto de glicosil carbohidrasas, ya que está presente en 24 de las 52 familias con estructuras resueltas. Pertenecen al clan GH-A las enzimas incluidas en las familias 1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79 y 86. Todas ellas tienen en común dos propiedades relevantes: El hidrolizar sustratos  $\beta$ -glicosídicos y el operar mediante un mecanismo que retiene la configuración anomérica. Los dos residuos catalíticos de estas

enzimas están situados en las cadenas  $\beta$  cuatro y siete, de las ocho que constituyen el barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> que caracteriza su estructura. Por este motivo, al clan GH-A también se le denomina clan 4/7. La Figura 4 muestra la estructura terciaria de una enzima representativa del clan GH-A, la  $\beta$ -glucosidasa A de *P. polymyxa*, perteneciente a la familia 1. Puede observarse la característica configuración en barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Otros clanes caracterizados por la presencia de este mismo motivo son los GH-D (familias 27 y 36), GH-H (familias 13, 70 y 77) y GH-K (familias 18 y 20).

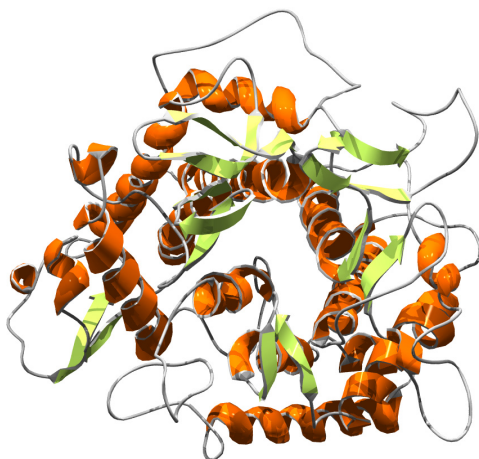


**Figura 3.** Análisis de actividad  $\beta$ -glicosidasa en colonias de *E. coli* crecidas en la superficie de un medio de cultivo que contiene dos compuestos cromogénicos: *p*-nitrofenil glucósido (PNPG) y 5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal), análogos de los disacáridos celobiosa y lactosa, respectivamente. Las colonias de *E. coli* son portadoras de plásmidos que contienen distintas versiones del gen *bglA*, que codifica la  $\beta$ -glucosidasa A de *P. polymyxa*. La hidrólisis de PNPG produce coloración amarilla y la de X-gal, azul. La hidrólisis simultánea de ambos sustratos da lugar al color verde.



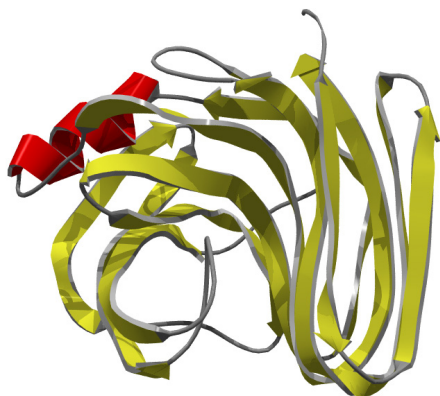
**Figura 4.** Estructura de la unidad monomérica de la  $\beta$ -glucosidasa A de *P. polymyxa* (código PDB: 1BGA). En rojo se muestran las  $\alpha$ -hélices, en amarillo las cadenas  $\beta$  y en gris la zona sin estructura secundaria definida (27).

Un motivo estructural diferente es el barril ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> cuya presencia ha sido caracterizada en cuatro familias que a su vez se subdividen en dos clanes distintos, los designados GH-L (familias 15 y 65) y GH-M (familias 8 y 48). Las enzimas de las familias 15 y 65 operan mediante un mecanismo de inversión sobre enlaces  $\alpha$ -glicosídicos. Entre las enzimas de la familia 15, el sustrato más característico es el almidón y entre las de la familia 65, la trehalosa. Las familias 8 y 48 incluyen glucanasas bacterianas de distinto tipo. La Figura 5 muestra una estructura representativa de barril ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>, correspondiente a una enzima de la familia 15.



**Figura 5.** Modelo estructural del dominio catalítico de la glucoamilasa Sta1 de *Saccharomyces cerevisiae*. En naranja se muestran las  $\alpha$ -hélices, en amarillo las cadenas  $\beta$  y en gris la zona sin estructura secundaria definida (1).

Existen un conjunto de familias que presentan dominios estructurales caracterizados por la ausencia, en cantidad significativa, de elementos en  $\alpha$ -hélice. En estas familias ellas se dan tres motivos diferentes: “ $\beta$ -jelly roll”, “6-fold  $\beta$ -propeller” y “5-fold  $\beta$ -propeller”. El motivo “ $\beta$ -jelly roll” caracteriza a los clanes GH-B (familias 7 y 16) y GH-C (familias 11 y 12). Los enzimas de las familias incluidas en ambos clanes tienen en común el tipo de sustrato, celulosa o xilano, y el mecanismo de hidrólisis por retención. La Figura 6 muestra la estructura de un miembro representativo del clan GH-C, la xilanasa A de *Bacillus circulans*, perteneciente a la familia 11.



**Figura 6.** Estructura tridimensional de la xilanasa A de *B. circulans*. (código PDB: 1BCX). En rojo se muestran las  $\alpha$ -hélices, en amarillo las cadenas  $\beta$  y en gris la zona sin estructura secundaria definida (29).



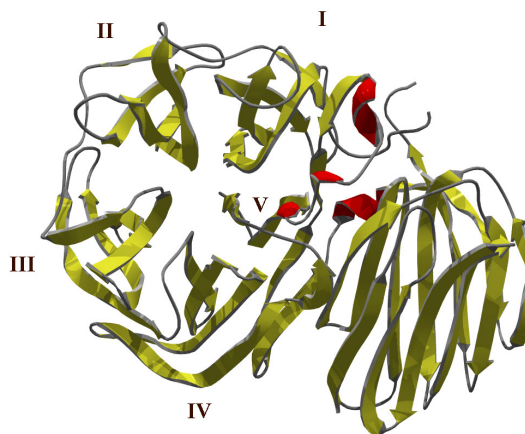
El motivo “6-fold  $\beta$ -propeller” caracteriza al clan GH-E (familias 33, 34 y 83). La actividad enzimática característica de estas tres familias es sialidasa o neuraminidasa. Esta actividad desempeña un importante papel en la hidrólisis de glicoproteínas. La Figura 7 representa la estructura de la neuraminidasa de *Salmonella typhimurium*, perteneciente a la familia 33.

**Figura 7.** Estructura tridimensional de la neuraminidasa de *S. typhimurium* (código PDB: 1DIL). En rojo se muestran las  $\alpha$ -hélices, en amarillo las cadenas  $\beta$  y en gris la zona sin estructura secundaria definida (9). Pueden observarse las seis hojas o aspas que conforman la “hélice propulsora”



El motivo “5-fold  $\beta$ -propeller” caracteriza a los clanes GH-F (familias 43 y 62) y GH-J (familias 32 y 68). La actividad más característica de las enzimas del clan GH-F es arabinofuranosidasa y la del clan GH-J es invertasa. La Figura 8 muestra la estructura de la invertasa de la bacteria *Thermotoga maritima*, perteneciente a la familia 32.

**Figura 8.** Estructura tridimensional (monómero) de la invertasa de *T. maritima* (código PDB: 1TUW). Esta estructura es representativa del motivo “5-fold  $\beta$ -propeller”. La numeración I-V indica las cinco hojas o aspas que conforman la “hélice propulsora”. En rojo se muestran las  $\alpha$ -hélices, en amarillo las cadenas  $\beta$  y en gris la zona sin estructura secundaria definida. (2).





## 5. APLICACIONES INDUSTRIALES DE ENZIMAS QUE DIGIEREN CARBOHIDRATOS

Las enzimas se han convertido en herramientas insustituibles para la obtención industrial de productos de índole muy diversa. Enzimas de distinta naturaleza y actividad son utilizadas por muchas industrias de alimentos, químicas o farmacéuticas. Determinadas especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Mucor*, se cuentan entre los principales organismos productores de enzimas industriales, aunque también se obtienen enzimas a partir de bacterias, plantas y animales.

Los polisacáridos son constituyentes fundamentales de muchos alimentos y su hidrólisis representa una etapa esencial en el proceso productivo de industrias panaderas, lácteas, cerveceras, etc., para las cuales el uso de carbohidrasas es de gran importancia práctica. Por ejemplo, la fabricación de pan requiere la fermentación de los azúcares presentes en la masa de harina por parte de la levadura. El componente fundamental de la harina es el almidón, cuya fermentación industrial es facilitada por la adición de amilasas, enzimas de las que carece la levadura. También se añaden otras enzimas, como xilanasas, que mejoran la textura del pan (25). Las industrias lácteas fabrican distintos productos en los que la lactosa ha sido hidrolizada a galactosa y glucosa mediante la adición de lactasas. La razón por la que es conveniente la digestión enzimática de la lactosa es que en humanos, particularmente en adultos, es muy frecuente la deficiencia en esta enzima, que se manifiesta en un síntoma denominado intolerancia a la lactosa. En las industrias cerveceras se usan amilasas y  $\beta$ -glucanasas, entre otras enzimas. Al igual que la fabricación de pan, la producción de la cerveza es un proceso fermentativo realizado por una levadura del género *Saccharomyces* que carece de capacidad amilolítica. En la fabricación tradicional de cerveza, el almidón del grano de cebada se digiere por acción de la actividad  $\alpha$ -amilasa sintetizada por el propio grano al germinar (malta), pero la adición de amilasas es una práctica generalizada en la mayoría de las industrias cerveceras. También es frecuente el empleo de  $\beta$ -glucanasas (celulasas) para digerir el material celulósico que acompaña al almidón procedente de la cebada. La presencia de glucano produce una elevada viscosidad del mosto de cerveza, lo que causa problemas para su filtración (24).

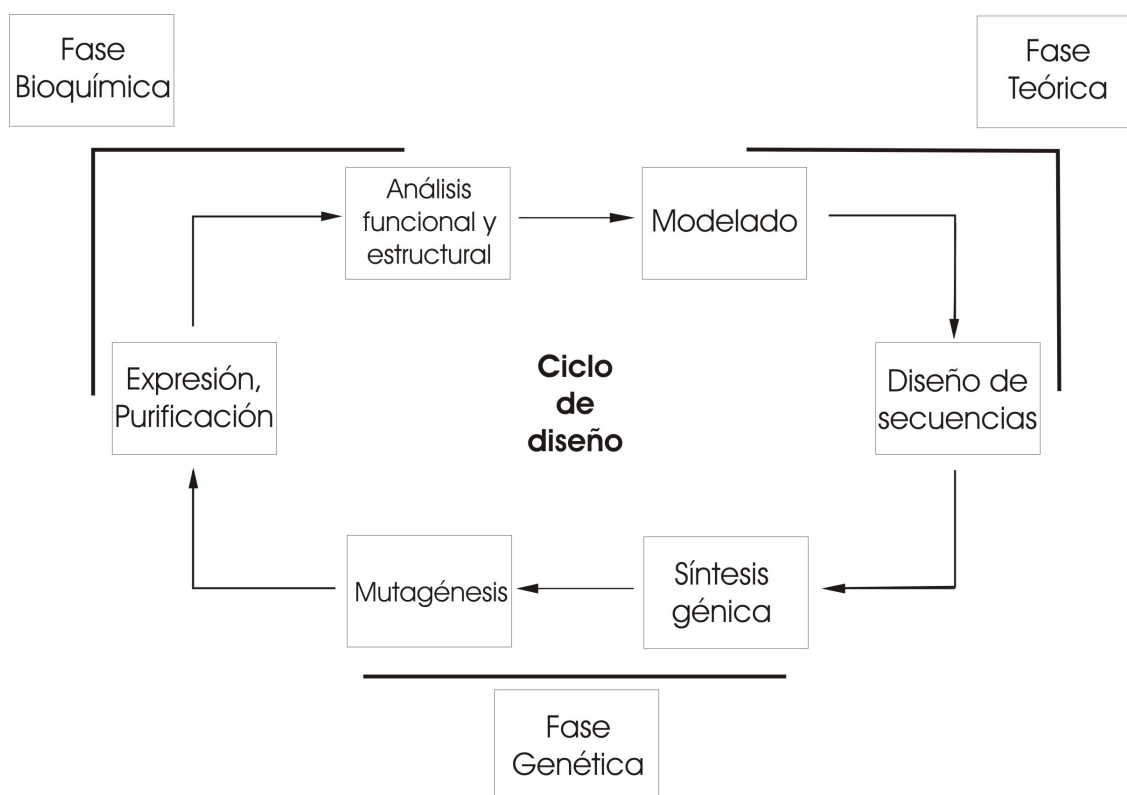
La industria de procesamiento de almidón consume enormes cantidades de carbohidrasas:  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa principalmente, pero también pululanasa y xilanasas. La hidrólisis enzimática del almidón es esencial para dos tipos de procesos industriales. Uno de ellos es la obtención de azúcares sencillos, oligo y monosacáridos, empleados para elaborar distintos tipos de alimentos: bebidas, dulces, etc. Por otra parte, el almidón se utiliza como materia prima para la obtención de etanol, cuya importancia como combustible líquido, sustitutivo de la gasolina, crece de forma notable.

Las fábricas de detergentes son otras industrias que consumen enzimas en cantidades ingentes. En este caso, son determinantes las actividades lipasa y proteasa, pero también son importantes distintas carbohidrasas, como amilasas, celulasas y mananasas. Las industrias que fabrican productos para la alimentación animal hacen un amplio uso de enzimas que aumentan la digestibilidad de las materias primas de origen vegetal mediante el empleo de celulasas y xilanasas. Finalmente, las industrias papeleras y textiles también emplean amilasas, celulasas y xilanasas con distinta finalidad. Por ejemplo, en la fabricación de papel, la eliminación de xilano por adición de xilanasas juega un importante papel en el refinado de la celulosa, contribuyendo a blanquear la pasta de papel (22,23).

## 6. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

Las propiedades funcionales de una proteína derivan de su estructura, que en último término está determinada por la secuencia nucleotídica del gen que la codifica. El desarrollo de

la biología molecular durante los últimos 25 años ha aportado una plétora de procedimientos experimentales y computacionales que permiten analizar y manipular el material genético. Esto hace técnicamente posible, al menos en teoría, reescribir el texto de una secuencia génica para modificar a voluntad las propiedades de la proteína codificada. La principal limitación para conseguir este objetivo es que la relación entre estructura y función de las proteínas es de una gran complejidad, y en la mayor parte de los casos es imposible saber *a priori* que alteración estructural sería necesaria realizar para conseguir determinado cambio de función. En términos operativos, podemos definir la ingeniería de proteínas como la modificación estructural realizada mediante la manipulación del gen codificante, por la cual se consigue un cambio funcional determinado. La máxima expresión de la ingeniería de proteínas es el diseño de proteínas, que consiste en la definición y creación *de novo* de una secuencia proteica cuya estructura la haga apta para desempeñar determinada función. La ingeniería de proteínas opera de forma iterativa, siguiendo un proceso cíclico que alterna etapas en las que se planean y ejecutan los cambios a realizar con otras en las que se evalúa el resultado de los mismos. A este proceso se le ha denominado ciclo de diseño (Figura 9)



**Figura 9.** Ciclo de diseño. Modificado de Blundell et al. (6).

La parte experimental de la ingeniería de proteínas comienza por el aislamiento del gen que codifica la proteína sobre la que queremos actuar e implica la generación de mutaciones en la secuencia del mismo, que se verán traducidas en cambios de la secuencia proteica. En el caso de que se tengan hipótesis razonables sobre que cambios concretos pueden ocasionar el efecto funcional buscado, éstos se introducen mediante mutagénesis dirigida, lo cual da lugar a

sustituciones definidas de aminoácidos. A esta aproximación metodológica se la suele designar “diseño racional”. En algunos casos, el efecto deseado puede obtenerse combinando dominios o motivos estructurales provenientes de distintas proteínas, para generar una proteína híbrida o quimera. Sin embargo, la situación más frecuente cuando se plantea modificar la función de una proteína es que no pueda precisarse que tipo de cambio estructural es preciso realizar para obtener el efecto deseado. En estos casos, una estrategia que ha tenido extraordinario auge en los últimos años ha sido la evolución dirigida. Esta aproximación experimental mimetiza a escala de laboratorio el proceso de evolución natural, alternando etapas de mutación génica aleatoria con otras de selección fenotípica, aunque en la evolución dirigida el sujeto de la mutagénesis no es un individuo sino un gen concreto, o un conjunto de genes. Este método tiene algunos requerimientos: Por ejemplo, el gen que codifica la proteína que se quiere modificar debe expresarse funcionalmente en un huésped adecuado, normalmente *E. coli*, *S. cerevisiae*, u otro microorganismo fácilmente manipulable. Otro requerimiento es disponer de un procedimiento eficaz para seleccionar, o a menos poder ensayar la función buscada (11). Las técnicas de biología molecular han proporcionado dos herramientas muy eficaces para realizar la mutagénesis aleatoria de genes aislados. Una es la conocida como “error-prone PCR” consistente en la amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del gen que codifica la proteína de interés en condiciones que inducen a la DNA-polimerasa a cometer errores (16). El otro procedimiento es el “DNA-shuffling”, que consiste en la fragmentación de la secuencia que se desea mutagenizar mediante digestión con DNAsa, seguida de un reensamblaje de la misma mediante PCR (28). Algunos ensayos funcionales pueden ser considerablemente complejos, a la par que encontrar el mutante que conduce a la modificación deseada puede implicar un número muy elevado de ensayos. Para solventar estas dificultades cobra un creciente auge el empleo de procesos robotizados o “high throughput screening” (32).

La fase bioquímica del ciclo de diseño tiene un objetivo inmediato consistente en la purificación de la proteína, como etapa previa para la resolución de su estructura tridimensional. Los logros registrados por la ingeniería de proteínas en los últimos años son en gran medida debidos al progreso de las técnicas que conducen a la resolución estructural, como son la resonancia magnética nuclear y muy particularmente la cristalografía de rayos X. Este progreso ha conducido desde la resolución de moléculas relativamente simples, como mioglobina, hemoglobina y lisozima a la solución estructural de estructuras supramoleculares como virus completos o ribosomas. Las coordenadas atómicas que definen las estructuras de todas las proteínas cuyos datos se han publicado, se encuentran disponibles en una base centralizada de datos, el “Protein Data Bank” (<http://www.pdb.org>). La determinación de la estructura de una proteína es la mejor herramienta disponible para explicar como ejerce su función. Por ejemplo, la topología del centro activo de una enzima y la disposición de los residuos catalíticos permiten visualizar como la enzima interacciona con el sustrato para facilitar la reacción que cataliza. Las hipótesis derivadas de este estudio pueden abordarse experimentalmente ensayando la actividad en variantes de la enzima portadoras de mutaciones definidas. En el caso de muchas proteínas, los ensayos funcionales suelen ser más complejos que un simple ensayo enzimático y frecuentemente requieren el empleo de técnicas de biología celular.

Junto a los progresos de las técnicas que permiten la resolución estructural de proteínas, otro factor decisivo par el desarrollo de la ingeniería de proteínas han sido la emergencia de las nuevas disciplinas de genómica y proteómica. La secuenciación sistemática de genes de distintas especies ha suministrado la estructura primaria de un ingente número de proteínas. Existen distintas bases de datos que almacenan las secuencias de genes y proteínas y también hay numerosos recursos informáticos “on line” que permiten el análisis comparativo de las mismas. Entre ellos, merece especial mención el “National Center for Biotechnology Information” (National Institutes of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Uno de los principales retos de la bioinformática es poder predecir de manera fiable la estructura tridimensional de una proteína en base a su secuencia primaria. Aunque este objetivo dista de conseguirse de forma plena, a la fecha se han conseguido avances muy importantes

utilizando técnicas de modelado comparativo, que deducen la estructura terciaria de una proteína mediante comparación con otras proteínas de secuencia homóloga y estructura conocida. Existen en Internet diversos servidores informáticos que proporcionan modelos estructurales de proteínas a partir de su secuencia. Un recurso especialmente recomendable es SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). La estrecha vinculación existente entre la estructura de una proteína y su función hace insoslayable el disponer de una sólida información estructural para acometer con cierta garantía de éxito cualquier planteamiento de ingeniería de proteínas.

## 7. MODIFICACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE CARBOHIDRASAS MEDIANTE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

Como cualquier otro tipo de molécula proteica, las carbohidrasas son susceptibles de ser modificadas mediante las técnicas de ingeniería de proteínas. La ingeniería de carbohidrasas tiene dos vertientes bien definidas. Una determinada por la investigación básica, debido al hecho de que con frecuencia estas enzimas sirven como modelo para distintos estudios bioquímicos. La otra vertiente es biotecnológica, derivada de la importancia comercial de muchos de estos enzimas, cuya estructura puede ser modificada para mejorar su rendimiento en los procesos industriales en los que son empleadas.

Las carbohidrasas han servido como modelo experimental para el estudio de un importante problema bioquímico, como es la estabilidad conformacional de las proteínas. El trabajo de B. W. Matthews y colaboradores con la lisozima del fago T4 permitió dilucidar algunos de los factores estructurales que determinan la resistencia de las proteínas a la desnaturalización térmica. Una vez resuelta la estructura tridimensional de la enzima, estos autores utilizaron el análisis racional para diseñar e introducir variaciones en la secuencia, que aumentarían la resistencia a un incremento de temperatura. Sus resultados demostraron que la estabilidad térmica se ve favorecida por la introducción de puentes disulfuro, que actúan reduciendo la diferencia de entropía entre las conformaciones nativa y desnaturalizada de la proteína. Efectos análogos fueron demostrados para sustituciones de aminoácidos que estabilizan elementos de estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices) y otras que incrementan el número de interacciones hidrofóbicas en el núcleo de la proteína (19-21). Una aproximación experimental mediante mutagénesis aleatoria y evolución dirigida, realizada con las dos  $\beta$ -glucosidasas homólogas de *Paenibacillus polymyxa*, sirvió para identificar distintos cambios estructurales producidos por determinadas sustituciones de aminoácidos que favorecen la estabilidad de las proteínas. La combinación de las mutaciones individuales condujo a la obtención de nuevas variantes de estas enzimas con resistencia térmica notablemente incrementada (4;13). Mediante una aproximación parecida, Flores y Ellington (12) generaron y analizaron variantes termoresistentes de la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*. Sus resultados aportan interesantes conclusiones sobre la relación entre la estabilidad de la estructura cuaternaria de las proteínas y su termoresistencia.

La evolución molecular ha demostrado ser una metodología particularmente útil para modificar la especificidad de sustrato, lo que permite obtener nuevas capacidades enzimáticas. Utilizando esta aproximación se ha conseguido convertir una fucosidasa en galactosidasa (31). Modificar la especificidad de sustrato es un objetivo difícil de conseguir mediante diseño racional y mutación dirigida, porque el cambio necesario generalmente requiere una reestructuración del sitio catalítico que afecta a varios residuos e implica un número muy elevado de interacciones atómicas. No obstante, existen casos en los que se han obtenido importantes éxitos. Por ejemplo, se ha conseguido convertir una xilanasa en glucanasa (3).

Un importante hito en la ingeniería de glicosil hidrolasas ha sido la transformación de enzimas hidrolíticas en sintéticas, susceptibles de ser utilizadas para la biosíntesis industrial de oligosacáridos. Un caso notable ha sido la manipulación realizada con una  $\beta$ -glucosidasa de

*Agrobacterium* sp. en la que se ha cambiado el glutámico portador del carboxilo nucleofílico por alanina. La enzima modificada es incapaz de hidrolizar el enlace glicosídico de su sustrato (celobiosa), pero es capaz de catalizar la transferencia de residuos glicosídicos activados, a un receptor. El resultado es la conversión de una glicosil hidrolasa en una glicosil sintasa (18).

## 8. CONCLUSIONES

Muchas de las observaciones apuntadas en el presente texto sobre aspectos estructurales y funcionales de los carbohidratos y sobre la ingeniería molecular de estas enzimas son extrapolables a otras proteínas. Especial énfasis merece la intrínseca relación existente entre estructura y función, hecho del cual se deriva la necesidad de conocer la estructura de una proteína para comprender y poder planificar la modificación de su función. Los importantes avances registrados en los últimos años en distintas facetas de la biología molecular, en particular en las áreas de genómica, proteómica y bioinformática, han generado un extraordinario acervo de información, disponible en bases de datos electrónicas a las que puede accederse vía Internet, de gran utilidad práctica para obtener información sobre una determinada proteína o enzima de interés.

## 9. REFERENCIAS

- 1.- Adam A C, L Latorre-Garcia, and J Polaina (2004) Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). *Yeast* 21: 379-388.
- 2.- Alberto F, C Bignon, G Sulzenbacher, B Henrissat, and M Czjzek (2004). The three-dimensional structure of invertase ( $\beta$ -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem.* 279:18903-18910.
- 3.- Andrews S R, S J Charnock, J H Lakey, G J Davies, M Claeysens, W Nerinckx, M Underwood, M L Sinnott, R A Warren, H J Gilbert HJ. (2000) Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Tyrosine 87 and leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of *Pseudomonas cellulosa* xylanase 10A. *J. Biol. Chem.* 275:23027-23033.
- 4.- Arrizubieta M J, and J Polaina (2000) Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a  $\beta$ -glucosidase by random mutagenesis and *in vitro* recombination. *J. Biol. Chem.* 275: 28843-28848.
- 5.- Blake CC, D F Koenig, G A Mair, A C North, D C Phillips, and V R Sarma VR (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 22:757-761.
- 6.- Blundell T L, G Elliott, S P Gardner, T Hubbard, S Islam, M Johnson, D Mantaounis, P Murray-Rust, J Overington, J E Pitts, et al. (1989) Protein engineering and design. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 324:447-460.
- 7.- Clothia, C and Lesk AM (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* 5:823-826
- 8.- Coutinho, P M and B Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12.
- 9.- Crennell S J, E F Garman, C Philippon, A Vasella, W G Laver, E R Vimr, and G L Taylor (1996) The structures of *Salmonella typhimurium* LT2 neuraminidase and its complexes with three inhibitors at high resolution. *J Mol Biol.* 259:264-280.
- 10.- Davies G., and B. Henrissat (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853-859.
- 11.- Farinas E T, T Bulter, and F H Arnold (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:545-551.
- 12.- Flores H, and A D Ellington (2002) Increasing the thermal stability of an oligomeric protein, beta-glucuronidase. *J Mol Biol.* 18;315:325-337.
- 13.- González-Blasco, G, J Sanz-Aparicio, B González-Perez, J A Hermoso, and J Polaina (2000) Directed evolution of  $\beta$ -glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. *J. Biol. Chem.* 275: 13708-13712.

- 14.- González-Candelas L, M C Aristoy, J Polaina, and A Flors (1989) Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing  $\beta$ -glucosidase activity in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 55:3173-3177.
- 15.- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J. 280:309-316.
- 16.- Liao XB, and Wise JA. (1990) A simple high-efficiency method for random mutagenesis of cloned genes using forced nucleotide misincorporation. Gene. 88:107-11.
- 17.- Ly HD, and S G Withers (1999) Mutagenesis of glycosidases. Annu Rev Biochem. 68:487-522.
- 18.- Mackenzie L F, Q P Wang, R A J Warren, and S G Withers (1998) Glycosylases - mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. J. Am. Chem. Soc. 120:5583-5584.
- 19.- Matsumura M, Bechtel WJ, Matthews BW (1988) Hydrophobic stabilization in T4 lysozyme determined directly by multiple substitutions of Ile 3. Nature. 334:406-410.
- 20.- Matsumura M, Signor G, Matthews BW. (1989) Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. Nature. 342:291-293.
- 21.- Nicholson H, Bechtel WJ, Matthews BW. (1988) Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with alpha-helix dipoles. Nature. 336:651-656.
- 22.- Oakley A J, T Heinrich, C A Thomson, and M C Wilce (2003) Characterization of a family 11 xylanase from *Bacillus subtilis* B230 used for paper bleaching. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 59:627-636.
- 23.- Pastor F I, X Pujol, A Blanco, T Vidal, A L Torres, and P Diaz (2001) Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp BP-23: evaluation of its performance in pulp refining. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:61-68.
- 24.- Polaina, J (2002) Brewer's yeast: Genetics and Biotechnology. In: Applied Mycology and Biotechnology, Vol. II. Chapter 1, pp.1-17. Khachatourians; G G, and Arora, D K (eds.). Elsevier Science, Amsterdam, Holanda.
- 25.- Randerz-Gil F, P Sanz, and J A Prieto (1999) Engineering baker's yeast: room for improvement. Trends Biotechnol. 17:237-244.
- 26.- Rye C S, and S G Withers (2000) Glycosidase mechanisms. Curr Opin Chem Biol. 4:573-580.
- 27.- Sanz-Aparicio J, J A Hermoso, M Martinez-Ripoll, J L Lequerica, and J Polaina (1998) Crystal structure of  $\beta$ -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity of family 1 glycosyl hydrolases. J. Mol. Biol. 275:491-502.
- 28.- Stemmer W P. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature 370:389-391.
- 29.- Wakarchuk W W, R L Campbell, W L Sung, J Davoodi, and M Yaguchi (1994). Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. Protein Sci. 3:467-475.
- 30.- Zechel DL, and S G Withers (2001) Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases. Curr Opin Chem Biol. 2001 5:643-649.
- 31.- Zhang J H, G Dawes G, and W P Stemmer. (1997) Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:4504-4509.
- 32.- Zhang Y X, K Perry, V A Vinci, K Powell, W P Stemmer, and S B del Cardayre (2002) Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. Nature 415:644-646.

## **ESTRUCTURA, FUNCIÓN E INGENIERÍA MOLECULAR DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DIGESTIÓN DE CARBOHIDRATOS.**

### **RESUMEN**

Las enzimas que hidrolizan carbohidratos (carbohidrasas o glicosil hidrolasas) tienen una singular relevancia bioquímica, debida a la importancia cuantitativa y cualitativa de los carbohidratos como constituyentes de la materia viva. La clasificación actual de glicosil hidrolasas, basada la homología de sus secuencias polipeptídicas, distingue cerca de 100 familias diferentes y revela importantes relaciones estructurales y filogenéticas entre estas enzimas. La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico tiene lugar mediante la acción de dos residuos presentes en el centro catalítico, uno que opera como donador de protones y otro como nucleófilo o base. En los últimos años se ha resuelto la estructura tridimensional de un elevado

número de glicosil hidrolasas. Análisis comparativos han puesto de manifiesto la existencia de similitudes estructurales entre distintas familias de estas enzimas, lo que ha permitido agruparlas en superfamilias o clanes. Las carbohidrasas, al igual que otras enzimas, han adquirido un gran valor comercial por su creciente uso en numerosas industrias de alimentos, químicas o farmacéuticas. El progreso en los estudios de la estructura y función de las proteínas, fundamentado en el desarrollo de nuevas disciplinas biológicas, como genómica, proteómica y bioinformática, ha originado un gran avance de la ingeniería de proteínas que permite diseñar y producir enzimas con nuevas propiedades.

**Palabras clave:** digestión de carbohidratos; carbohidrasas; glicosil hidrolasas; ingeniería de proteínas; enlace glicosídico.

## Semblanza del Dr. Julio Polaina.



Es Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla (1976) y Doctor en Biología (1980) por la misma Universidad. Ha realizado investigación postdoctoral en el Solar Energy Research Institute (actualmente National Renewable Research Laboratory), Golden, Colorado, USA (1980-1982); Carlsberg Laboratory, Copenhagen, Dinamarca (1982-1985) e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Valencia, España (1986-1988). Desde 1988 es Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el IATA de Valencia. Ha participado como profesor en cursos de postgrado impartidos en las Universidades de Valencia, Sevilla y Murcia (España), Universidad de los Andes, Mérida (Venezuela) y Universidade de Pernambuco, Recife (Brasil). Hasta la fecha, ha publicado 33 artículos científicos y ha dirigido seis tesis de doctorado. Ha sido revisor de distintas revistas científicas internacionales y evaluador de proyectos para agencias nacionales e internacionales. En la actualidad es responsable del Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas del IATA. Su grupo de investigación sigue dos líneas de trabajo, una relacionada con la ingeniería molecular de carbohidrasas y otra sobre biotecnología de procesos fermentativos producidos por levaduras y hongos filamentosos.

Teléfono: 963.90.00.22, extensión 2003; Fax: 963.63.63.01;

[jpolaina@iata.csic.es](mailto:jpolaina@iata.csic.es)

[www.iata.csic.es/jpolaina](http://www.iata.csic.es/jpolaina)





---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## IXTLI, UN ESPACIO PARA EL APRENDIZAJE Y DESCUBRIMIENTO ASISTIDOS POR LA REALIDAD VIRTUAL

Geneviève Lucet Lagriffoul<sup>1</sup> y Daniel Espinosa Jiménez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dirección de Cómputo para la Investigación, Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. México 04510, D.F., México.

<sup>2</sup>Departamento de Visualización, Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. México 04510, D.F., México.

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

[danepin@labvis.unam.mx](mailto:danepin@labvis.unam.mx)

### IXTLI, AN ENVIRONMENT FOR VIRTUAL REALITY AIDED LEARNING AND DISCOVERING

#### Abstract.

*Virtual reality is explained as a well-founded, newly visualization medium, able to expand human capacities to understand and explain abstract phenomena. Software and hardware technologies are defined and described, and their history is told. Biochemistry hasn't been careless to such advances, as we can tell through the development of bioinformatics, and some cases are reviewed. Immersive visualization services we can offer, along with the technology and facilities of the IXTLI Visualization Observatory of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), are described.*

**Keywords:** bioinformatics, stereoscopy, human-machine interfaces, IXTLI project, immersive and non-immersive virtual reality, videoconference systems.

#### Introducción

Si bien el cómputo tiene ya muchas décadas de desarrollo, falta mucho por hacer para adoptar esta herramienta en todas las actividades de investigación y de docencia. El hecho de que el uso primordial del cómputo sea el cálculo, ha implicado que sea más difundido en las áreas científicas y tecnológicas, tales como la física, astronomía, química e ingeniería. Sin embargo, más difícil ha sido introducir novedosas tecnologías computacionales no sólo en éstas sino en muchas otras áreas. Actualmente contamos con tecnologías en las que la interacción



con la computadora es más natural, y con capacidad de presentar en forma más conveniente la información.

Los desarrollos en computación gráfica e interfaces han sido fundamentales para facilitar el uso del cómputo en todas las áreas; sin embargo, la integración masiva del cómputo a la docencia tendrá apenas unos 15 años en México.

La realidad virtual hace uso de todas las ramas de las ciencias computacionales, en especial la representación de datos en forma gráfica, o incluso en forma de sonidos, así como también de los mecanismos para la interacción natural con la computadora para manipular esta información. Tomando en cuenta que si bien la base de todos estos sistemas sigue siendo el cálculo a partir de la abstracción matemática de los modelos, nuestra mente extrae información mediante todos sus mecanismos de percepción. La realidad virtual tiene décadas de desarrollo y es una importante área de investigación en evolución porque representa el futuro de la interacción humano-máquina. Además, es ideal para interaccionar, manipular y comprender, del modo más natural posible, información extremadamente compleja. Sin embargo, como toda innovación, desde sus inicios ha sido una tecnología limitada a sectores de muchos recursos, y seguramente la evolución tecnológica generalizará su uso.

### **Conceptos Generales de la Realidad Virtual**

El término de “realidad virtual” se presta a muchas interpretaciones, sobre todo por el antagonismo aparente entre las dos palabras “realidad” y “virtual”, lo cual es fomentado por la fantasía y películas de ciencia ficción. El hecho de reemplazar la percepción del mundo real por la percepción de un mundo generado por computadora e interaccionar con él, desboca la imaginación en cuanto a los posibles alcances de esta tecnología.

Técnicamente hablando, la realidad virtual es una interfaz humano-máquina muy avanzada que permite experimentar de manera multisensorial, una simulación computarizada de manera interactiva<sup>1</sup> y en tiempo real<sup>2</sup>. Consta de equipamientos, instalaciones, software, hardware y aplicaciones diseñadas para tal fin. En el proceso cognitivo asistido por esta herramienta, resaltan dos factores principales: el aspecto sensorial en la percepción del mundo virtual (la inmersión) y las formas de interacción del usuario con él.

### **La inmersión y la percepción sensorial**

El sentido más involucrado en la mayoría de las experiencias de realidad virtual es la percepción visual, a menudo enriquecida con la percepción auditiva y táctil, y de manera aún experimental y muy limitada puede incluir el sentido del olfato y el gusto. Somos capaces de entender aquello que conocemos a través de nuestros sentidos. A partir del modelado de fenómenos mediante relaciones matemáticas, se crean representaciones computacionales que

---

<sup>1</sup> Interactivo: expresa la posibilidad del usuario para comunicarse con la computadora y modificar la respuesta del programa ejecutado por el sistema.

<sup>2</sup> Tiempo real: cualidad de un sistema que soporte la comunicación prácticamente instantánea entre una acción del usuario y la respuesta del sistema.

se manifiestan en forma de gráficas 3D, sonidos, estímulos táctiles, olores y sabores, los cuales son controlados en última instancia por cálculos matemáticos. Esto crea impulsos sensoriales para vivir experiencias a partir de abstracciones matemáticas.

La inmersión visual se logra sintetizando en cierto grado un espacio ajeno al que se encuentra el usuario. Existen varios métodos para generar esta sensación, cubriendo el campo visual con imágenes generadas por computadora, ya sea a través de lentes y pantallas de cierto tamaño y forma o por el uso de cascos de realidad virtual.

La estereoscopia es otro factor de gran importancia para generar la sensación de estar realmente dentro de una imagen tridimensional. De hecho es una de las cualidades más atractivas de la realidad virtual. Ésta consiste en enviar a cada ojo la imagen que le corresponde tomando en cuenta la distancia que los separa, creando así la sensación de profundidad y de relieve característica del espacio tridimensional en el que vivimos. Pero no siempre fue así. El primer visor de escenas generadas por computadora montado en la cabeza o HMD por sus siglas en inglés (*Head Mounted Display*), fue desarrollado por Ivan Sutherland entre 1966 y 1967 en el Lincoln Laboratory del MIT y era binocular pero no estereoscópico. Entre fines de los 60s e inicios de los 70s creó nuevos visores que soportaban ya gráficos vectoriales estereoscópicos. No obstante, esto no hubiese sido posible sin las contribuciones de uno de los más renombrados científicos del siglo XIX, Sir Charles Wheatstone. Sus estudios pioneros sobre estereoscopia y fisiología de la visión le condujeron a la invención de un dispositivo que llamó estereoscopio; tras caracterizar la visión como un equivalente visual a la percepción acústica. Su principio de estereoscopia partió de las observaciones de Euclides relativas a que cada ojo percibe una imagen ligeramente distinta. Wheatstone fue el primero en entender las bases de la percepción visual al suponer que el cerebro determinaba la perspectiva a partir de tales diferencias y lo probó con su dispositivo que permite ver una imagen tridimensional al combinar necesariamente en la mente dos imágenes planas de escenas con diferente perspectiva. Esto permitió entender los principios de la visión binocular; asimismo la estereoscopia se integró a la fotogrametría unos años después del descubrimiento de la fotografía. Las tecnologías desarrolladas para percibir en 3D los gráficos creados por computadora, incluyen la generación de los pares de imágenes estereoscópicas. Tales pares de imágenes se muestran en pantallas independientes para cada ojo en los visores montados en la cabeza. O bien, en el caso de la estereoscopia activa, se intercalan los pares de imágenes en el mismo despliegue en sistemas de realidad virtual de proyección. Sincronizando los lentes estereoscópicos, cuyas pantallas de cristal líquido tapan la vista de cada ojo en forma alterna coincidiendo con la fuente de los gráficos, se logra que cada ojo vea las perspectivas apropiadas de la escena y nuestro cerebro percibe un espacio 3D.

De manera similar, el sonido altamente espacializado, controlado e incluso sintetizado por computadora, nos permite relacionar espacios visuales tridimensionales con espacios auditivos. Estas simulaciones pueden ser de sonidos naturales reconocibles o integrar datos distintos como por ejemplo la intensidad de un campo de fuerzas en un punto dado, reforzando la simulación mecánica si fuese el caso.

Mediante el uso de sensores, se puede medir acciones físicas tales como movimientos y fuerzas físicas ejercidas por el usuario. La simulación de fuerza a través de dispositivos hápticos, que se definen como dispositivos de entrada y salida de estímulos físicos (generados tanto por el usuario como por la computadora), puede hacernos experimentar no sólo fuerzas o energía, sino también conocer los límites de los objetos (palpar) y la colisión con ellos. La retroalimentación

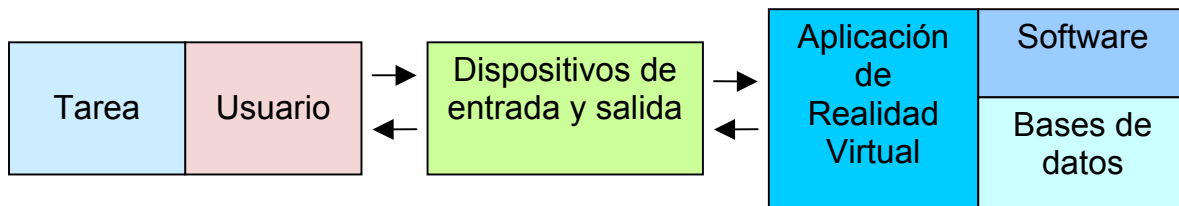
táctil hace posible percibir objetos, incluso de modo experimental, su dureza y temperatura. Todas estas tecnologías han mostrado ser importantes en varios usos educativos, tales como la simulación de cirugía o la capacitación para operaciones industriales.

### **Los Diferentes Niveles de Inmersión**

Existe una discusión para determinar los criterios básicos de inmersión e interacción que permiten definir una tecnología como de realidad virtual o no. Por ejemplo, ciertas aplicaciones han sido catalogadas como realidad virtual no inmersiva. Se trata de visualizaciones experimentadas a través de monitores comunes de computadoras, y que pueden ser interactivas, tridimensionales e incluso estereoscópicas. La década pasada vio nacer un lenguaje de descripción, animación e interacción con gráficos 3D llamado VRML (por las siglas en inglés de *Virtual Reality Modeling Language*) que se hizo muy popular en el ámbito científico, incluyendo aplicaciones de bioinformática. Se han creado visores intérpretes gratuitos de este lenguaje, que funcionan dentro de los navegadores de Internet. Este tipo de aplicaciones requieren de poco poder de cómputo y ofrecen mundos virtuales en la red, muy versátiles, capaces de presentar modelos que resultan de datos distribuidos, haciendo realidad en buena medida el concepto de ciberespacio. Debido a que pueden usarse en computadoras personales estándares, estas aplicaciones encuentran un amplio campo de acción a pesar de lo limitado de la experiencia del usuario. En realidad basta diferenciarlas con la cualidad de inmersión. Son aplicaciones de realidad virtual inmersiva aquellas que son experimentadas con varios de nuestros sentidos, en especial la visión, la audición y el tacto. La calidad del sonido tridimensional contribuye mucho a la sensación de inmersión. Los entornos de realidad virtual de inmersión total se conocen como cuevas (CAVE), y consisten en cuartos donde cada uno de los muros, el piso y el techo reciben una imagen proveniente del mundo virtual, para recrear el espacio que rodea el usuario.

### **Interacción**

Hemos revisado las tecnologías para crear inmersión dentro del mundo virtual, el canal de comunicación por el cual el sistema, ilustrado en la figura 1, muestra un mundo virtual a los humanos. Veamos ahora el proceso complementario, esto es: cómo nos comunicamos con el sistema, cómo nos movemos dentro del espacio tridimensional, y cómo lo manipulamos y modificamos. De la misma forma que en la inmersión, la interacción debe ser tan natural como sea posible, reproduciendo la forma con la que el humano interacciona con su ambiente, es decir, mediante el habla y acciones físicas con su cuerpo. Un buen sistema de interacción aumenta considerablemente la sensación de inmersión. Cada tipo de acción puede requerir de dispositivos periféricos específicos, por ejemplo el que se emplea para simular una cirugía es distinto al empleado para explorar un espacio arquitectónico. Estos van desde el empleo de guantes de datos a sistemas de captura de movimiento ya sea mediante sensores ubicados sobre el cuerpo y registrados espacialmente, o mediante el reconocimiento de movimientos registrados por una cámara y procesados mediante técnicas de visión por computadora. Aunque muchas técnicas requieren dispositivos portados por el usuario, obstaculizando una interacción natural, la tendencia va hacia el aligeramiento de éstos o incluso, a su desaparición.



**Figura 1.** Un sistema de realidad virtual tiene cinco componentes típicos. Los dispositivos de entrada y salida proveen la comunicación bidireccional del humano con el sistema.

Para tener un sistema computacional en tiempo real, no debe haber un retardo apreciable entre entradas y salidas del sistema, es decir, entre las acciones del usuario (interacción con el mundo virtual) y la respuesta del sistema (alteración del mundo virtual debido a las acciones del usuario). Típicamente el tiempo de respuesta debe ser menor a 50 milisegundos. El tiempo en que tarda en responder el sistema, conocido también como latencia, es más notable mientras más rápidos son los movimientos del usuario, y en general, es muy evidente si llega a ser de 100 milisegundos. En ese período de tiempo, tras una acción del usuario, el sistema debe correlacionar la información de posición proveniente de sensores con la nueva vista estereoscópica de gráficos tridimensionales y la espacialización conveniente del sonido si lo hay. Mientras más complejo es el mundo virtual y/o mayor definición sensorial se desee, más tiempo toma en regenerarlo tras cada cambio, por lo que la latencia es un aspecto importante en el diseño de dichos sistemas aún con las mejores supercomputadoras de nuestra época. Una respuesta retrasada puede tener implicaciones negativas en la experiencia del usuario al crearle por ejemplo, fuertes mareos.

En la búsqueda de crear la interfaz más natural posible hacia los mundos virtuales se ha escrito una historia de proezas tecnológicas e invenciones muy diversas. Por supuesto que el desarrollo de la realidad virtual comparte la historia del desarrollo de las computadoras electrónicas y de las gráficas por computadora, así como de los dispositivos de interacción con ellas y el desarrollo de los videojuegos. Saber cómo ha evolucionado nos permitirá entender la importancia de aprender a aplicar este medio.

## EL DESARROLLO DE LA REALIDAD VIRTUAL

### Hardware

Concentrándonos más en algunos aspectos tecnológicos, tomemos en cuenta que la primera patente de un visor montado en la cabeza para un periscopio fue registrada en los Estados Unidos en 1916 a nombre de Albert B. Pratt, treinta años antes de la era de las computadoras electrónicas digitales que inicia con la ENIAC, en la Universidad de Pensilvania para uso de la armada de los Estados Unidos. Un gran avance en simuladores de la realidad ocurrió en 1956 con el *Sensorama Simulator* de Morton Heilig, patentado en 1962, como un sistema de despliegue multisensorial para experimentar situaciones previamente grabadas con imágenes, sonido, vibración, viento e incluso... ¡olores! El sistema permitía experimentar video

3D a partir de las tomas con dos cámaras de 35 mm. El sonido era estéreo y los efectos de viento programados eran reproducidos por pequeños ventiladores cercanos a la cabeza del usuario, y el asiento vibraba. Al simular un recorrido, el usuario podía sentir los cambios en el viento, las piedras del camino y hasta el olor a comida. En 1960, Heilig patentó también una televisión estereoscópica montada en la cabeza, que incluía sonido estéreo y la posibilidad de almacenar y reproducir olores. Las ideas que plasmó en sus inventos fueron revolucionarias en su época.

Este tipo de ideas siguieron en desarrollo, en 1961 en Philco se desarrolló un HMD (*Head Mounted Display*)<sup>3</sup> donde el movimiento de la cabeza controlaba un sistema de videocámara remoto, constituyendo uno de los primeros sistemas de telepresencia<sup>4</sup>. En 1966, Ivan Sutherland también usó un par de tubos de rayos catódicos (es decir dos pequeños cinescopios) montados en los oídos pero con un soporte mecánico auxiliar debido a su peso; estaban dotados de potenciómetros para medir la dirección de la vista del usuario. No eran dispositivos muy cómodos comparados a los actuales. Sutherland se propuso reemplazar en su HMD, el video de cámaras mediante gráficas generadas por computadora, y los primeros equipos de este tipo (1973) podían desplegar escenas generadas en tiempo real de unos 200 a 400 polígonos, a una tasa aproximada de 20 cuadros por segundo, un gran logro de su época, aunque ahora nos parezca muy limitado en comparación con las aplicaciones actuales.

De la década de los 70s a inicios de los 80s, los avances en simuladores de vuelos para fines militares fue uno de los principales rubros de aplicación, investigación y desarrollo en realidad virtual, pues era muy atractivo reemplazar los costosos simuladores analógicos específicos para una aeronave, por versiones en software. Los primeros simuladores de vuelo desarrollados desde los inicios de la aviación en el siglo XX, eran básicamente aeronaves modificadas, simples simuladores mecánicos. No fue sino hasta 1929, que se diseñó y construyó un simulador mecánico ex profeso para entrenamiento en instalaciones fijas, con mecanismos que retroalimentaban al usuario, en tanto mejoraban la experiencia de la realidad sintética que recreaba. Los simuladores de vuelo basados en HMD comenzaron con el Super Cockpit desarrollado en la base de la Fuerza Aérea de Wright Patterson, entre 1981 y 1985. Muchos de estos trabajos fueron clasificados como secretos militares; sin embargo, los recortes en los fondos de la defensa favorecieron la migración de estas tecnologías e investigadores al sector civil.

Hubo también importantes avances en la academia y el sector privado. En 1977, un guante de datos que determinaba la flexión de los dedos fue creado en el Electronic Visualization Lab de la Universidad de Illinois en Chicago. Un dispositivo similar mejorado y digital fue anunciado en 1981 en los Laboratorios Bell de AT&T. Ese mismo año, James Clark, un profesor de Stanford, junto con seis estudiantes suyos fundó Silicon Graphics, Inc., mejor conocida como SGI, para producir computadoras gráficas avanzadas que siguen siendo usadas en muchas instalaciones de realidad virtual de nuestros días. La tesis de doctorado de Sara Bly (1982), exploró la representación con sonido de grandes conjuntos de datos, una técnica llamada sonificación, sentando las bases del sonido generado y controlado por computadora en realidad virtual.

---

<sup>3</sup> Sistema de visión montado sobre la cabeza, con dos pequeñas pantallas frente a los ojos.

<sup>4</sup> Telepresencia: presencia a distancia con diversos mecanismos de retroalimentación sensorial necesaria para percibir y actuar en forma remota.

En los 80s, la NASA jugaría un papel crucial en el desarrollo de aplicaciones de realidad virtual dado que necesitaba simuladores para entrenar a sus astronautas. En 1981, desarrolló un prototipo de visor montado en la cabeza usando despliegues de cristal líquido, y lo nombraron VIVED (del inglés *Virtual Visual Environment Display*). Tras esto crearon el primer sistema de realidad virtual que constaba de una computadora DEC PDP 11-40, una computadora gráfica Picture System 2 de Evans & Sutherland y un sistema de rastreo sin contacto Polhemus que registraba el movimiento de la cabeza del usuario y transmitía dichas lecturas a la PDP 11-40, el cual a su vez pasaba estos datos a la computadora gráfica para recalculas las imágenes estéreo para el VIVED.

El proyecto de la NASA se fortaleció más cuando en 1985 Dave Nagel y Scott Fisher fundaron el VIEW Lab. Se incorporó un guante con sensores, creado antes por Thomas Zimmerman y Jaron Lanier como elemento de interfaz de programación virtual para no programadores. En 1988, Fisher y Elizabeth Wenzel desarrollaron el hardware para manejar hasta cuatro fuentes de sonido 3D virtual. Para entonces, usando una computadora Hewlett-Packard 9000, el sistema pudo soportar toda la generación de superficies con sombreado plano en vez de sólo modelos de alambre, renombrándose al proyecto VIVED como VIEW (del inglés *Virtual Interface Environment Workstation*). Los desarrollos que promovieron dieron lugar a diversos proyectos con los que financiaron a las primeras compañías de realidad virtual.

### **Software**

En cuanto al desarrollo del software, en los 80s SGI desarrolló una biblioteca en C para gráficos 3D llamada IRIS GL. Con el surgimiento de C++, un lenguaje de programación orientado a objetos que se basó en C, y partiendo de la premisa de que la dificultad de programar en C los gráficos 3D desalentaba la creación de aplicaciones, SGI se propuso crear una biblioteca de gráficos orientado a objetos que se encargara de un buen desempeño gráfico mientras que ofreciera una gran facilidad de uso. Así nació el proyecto IRIS Inventor entre 1988 y 1989, conducido por Rikk Carey. Ambas bibliotecas, IRIS GL e IRIS Inventor, importantes contribuciones de SGI, fueron soluciones propietarias exclusivas de sus computadoras.

### **EL INICIO DE LA ERA COMERCIAL**

La primera compañía en vender productos de realidad virtual fue VPL Research, Inc. En 1987, lanzó a la venta el DataGlove, guante de interacción con los modelos virtuales, el cual vendería hasta su cierre en 1992. Introdujeron también el primer sistema comercial de despliegue montado en la cabeza, EyePhones, basado en LCDs (pantallas de cristal líquido, por sus siglas en inglés, Liquid Cristal Displays) con una resolución de 360x240 pixeles y pesaba 2.4 kg. En 1989, imponen el término realidad virtual al introducir el primer sistema completo para ello, llamado RB-2 (*Reality Built for 2*), que incorporaba un EyePhones, un DataGlove, el sistema de rastreo espacial para el HMD, una estación de trabajo de control y conexiones para un sistema gráfico SGI 4D/310 VGX y, opcionalmente, un sistema de sonido 3D. Pero todos sus productos y sistemas eran costosísimos. Mientras tanto, Mattel introdujo el Powerglove, un guante capaz de saber su posición en 3D, torsión y posición de los dedos, como accesorio para las consolas Nintendo. Resultó un fracaso comercial, pues aunque ayudó a vender casi un millón de videojuegos nuevos ese año, no hubo muchos juegos que lo usaran y se dejó de producir en

1993. Sin embargo, resultó un dispositivo popular de bajo costo para proyectos de realidad virtual para aficionados que aún hoy en día buscan conseguirlos.

A comienzos de 1991, la compañía británica Division, Ltd., introdujo la primera estación de trabajo comercial equipada para realidad virtual, llamada Vision, integrando en ella los componentes necesarios en menor espacio. Le siguió el modelo Provision 100, la cual era un sistema multiprocesador, escalable, capaz de generar 35,000 polígonos sombreados por segundo.

En cuanto al software, todos estos sistemas requerían programación específica que alargara los tiempos de desarrollo y puesta a punto de las aplicaciones, y se buscaban maneras de facilitar la programación. Por ejemplo en 1992 Sense8 Co, introdujo la primera versión del WorldToolKit (WTK), una biblioteca en C para realidad virtual. También destacó el Virtual Reality Toolkit (VRT3) desarrollado por Dimension Technology (posteriormente Superscape PLC) capaz de correr en varias plataformas y que se programaba en forma visual, lo cual facilitaba su uso pero a su vez lo limitaba.

## EL INICIO DE LA ERA INDUSTRIAL

En 1990, W-Industries introdujo el primer sistema de juegos computarizados de realidad virtual para dos jugadores usando HMDs y una plataforma para cada jugador. Sin embargo, en 1997, esa empresa quebró. También en 1990, dos empleados del NASA VIEW Lab, Mark Bolas y Ian McDowall fundan Fakespace, Inc., comenzando con el diseño de HMDs más sofisticados, para posteriormente desarrollar dispositivos de entrada y despliegues de realidad virtual estacionarios basados en proyectores como los sistemas RAVE (*Reconfigurable Advanced Visualization Environment*, entornos reconfigurables de visualización avanzada, por sus siglas en inglés) y luego el CAVE (entorno de realidad virtual inmersiva basada en proyecciones en muros y de ahí la analogía con una cueva) al fusionarse más tarde con Pyramid Systems.

El mercado para realidad virtual seguía siendo muy pequeño, y las estaciones de trabajo gráficas más veloces; dotadas del sistema Reality Engine de SGI, eran capaces de generar 300,000 polígonos por segundo pero costaban más de \$100,000 USD en 1993. Muchas compañías pioneras eran también muy pequeñas, a menudo sin recursos para mejorar sus productos, pues se basaban en capital privado y de riesgo que pocas podían mantener. Así, compañías como Division Ltd., Superscape PLC, VPL y otras sucumbieron. El problema fue que a pesar de lo espectacular de los logros en tecnología y aplicaciones, el mercado esperaba mucho más de ellos de lo que realmente podían hacer, y la ficción iba más allá de la realidad. El resultado fue un entorno incierto para los desarrolladores, debido a la falta de soporte técnico y nulas posibilidades de actualizar ciertos equipos. La atención pública y los fondos para estos proyectos se redujeron aún más con la explosión por el interés en la Internet y las aplicaciones Web a mediados de los 90s. Sin embargo el interés en realidad virtual volvió a despegar a fines de los 90s, en parte debido al crecimiento sostenido en el desempeño de los aceleradores gráficos para PCs. Mientras que en 1997, una estación Intergraph basada en Intel generaba 100,000 polígonos por segundo, el Infinite Reality 2 de SGI lograba unos 13 millones de polígonos por segundo. Para el 2001, una PC basada en el procesador Pentium III y hardware gráfico de NVidia, una compañía fundada en 1993, alcanzaba los 31 millones de polígonos por segundo, mientras que en ese mismo año, el hardware gráfico desarrollado por NVidia para la

consola de juego XBox alcanzaba los 150 millones de polígonos por segundo. El avance en gráficos en computadoras personales ha superado el desempeño de las supercomputadoras gráficas de hace pocos años a un precio muy bajo, de modo que en la actualidad, una amplia gama de aplicaciones de realidad virtual resultan viables y atractivas para un mercado muy grande. Las actuales supercomputadoras gráficas se han especializado en aplicaciones de muy alto desempeño que requieren muchos recursos como memoria, un ejemplo de ello es el hardware gráfico InfiniteReality4 de SGI dotado con 1 GB de memoria de textura o la posibilidad de combinar 16 InfinitePerformance de SGI en un solo canal de gráficos para alcanzar 283 millones de polígonos por segundo, además de otras excelentes características. Mientras que las supercomputadoras gráficas retienen un sector muy especializado del mercado de gráficos, los gráficos 3D interactivos estéreo están disponibles para prácticamente todos.

Otro factor importante en la evolución de la tecnología y software de realidad virtual que permitió pasar de proyectos de investigación de la milicia y agencias gubernamentales a proyectos de aplicación práctica en general, ha sido la continua mejora en otros dispositivos e interfaces usados en realidad virtual. En 1993, los HMD basados en LCDs ofrecían resoluciones de 360x240 píxeles (CGA), en 1995 tenían la calidad de una señal de televisión (NTSC), y para 1997 alcanzaban resoluciones de 640x480 (VGA). En 1999, los HMD alcanzaron resoluciones de 1024x768 píxeles (XGA) y mientras que los primeros HMD pesaban varios kilogramos, hacia 1999 rondaban los 300 gramos y tenían un menor precio. Por otro lado, desde mediados de los 90s se introdujeron despliegues amplios que abarcaban la pared. Todavía hay mucho por avanzar para reducir los costos de estas tecnologías y mejorarlas, pero la industria de la realidad virtual opera con más vigor si se considera que el mercado se incrementó de \$500 millones de USD en 1996 a \$1,400 millones de USD en el 2000; algunas estimaciones indican un crecimiento del mercado de alrededor del 20% anual, y que en el 2005 podría ser de unos \$3,400 millones de USD.

Respecto a los avances en el software para gráficos 3D, SGI siguió posicionando sus bibliotecas de gráficos y así, IRIS GL fue el precursor de OpenGL, una especificación de funciones gráficas de bajo nivel muy poderoso y bajo control desde 1992 de un consejo para la revisión de su arquitectura, formado por los principales miembros de la industria dedicada a los gráficos por computadora. Por su parte, IRIS Inventor fue revisado y su especificación fue publicada bajo el nombre de OpenInventor. SGI licenció su especificación a dos compañías: Template Graphics Systems (TGS) y Portable Systems, la cual fue absorbida después por TGS. Uno de los inconvenientes de OpenInventor fue que era difícil modificar la escena para optimizarla de modo comparable a lo que se puede hacer con OpenGL. Esto motivó que parte del grupo de SGI que trabajaba en Inventor se separara en 1991 para crear el proyecto IRIS Performer, y desarrollar una biblioteca de gráficos donde el énfasis estuviese en el desempeño más que en la facilidad de uso. Performer definió su grafo de escena de manera tal que pudiese reacomodarlo al vuelo por razones de desempeño, haciendo posible que para generar una imagen final pudiese recorrer el grafo de escena en varias pasadas ejecutándose en hilos de ejecución simultánea, facilitando el render<sup>5</sup> en paralelo en varios canales gráficos a la vez; su poder y flexibilidad de uso lo mantienen vigente hoy en día.

<sup>5</sup> Render: generación o síntesis de imágenes por computadora a partir de la descripción de una escena vista desde una cámara virtual. Una escena incluye objetos geométricos, sus texturas, efectos y luces.



Por otro lado, el 25 de mayo de 1994 se celebró una reunión en la que se propuso la creación de VRML, un lenguaje de descripción de mundos virtuales. Hubo varias propuestas, pero una basada en un lenguaje tipo script similar al de OpenInventor fue la base de la especificación de VRML 1.0. SGI reunió a sus equipos de desarrolladores de bibliotecas gráficas en uno solo y así nació el proyecto Cosmo3D. Las misiones de ese grupo fueron por un lado dar soporte a VRML, con lo cual surgió cosmo3dplayer, un visor de mundos virtuales descritos en VRML que fue muy popular. Por otro lado intentaron combinar las especificaciones de Inventor y Performer en uno solo para crear la plataforma del software futuro de SGI, bajo el nombre de Cosmo3D. Pero tras su primera versión beta, SGI se reunió con Intel e IBM para crear OpenGL++, basado en Cosmo3D. El proyecto murió cuando al poco tiempo SGI decidiera aliarse con Microsoft en un proyecto similar denominado Fahrenheit, con la misión de unir las bibliotecas de gráficos de Microsoft, Direct3D, con OpenGL. El proyecto también se abandonó. De todas estas iniciativas al final nos quedaron por separado OpenGL, Open Inventor y Performer como herramientas muy poderosas, portables y populares para la creación de gráficos. VRML evolucionó a su segunda versión en 1997, agregando mecanismos de animación e interacción muy atractivos de manera que muchas aplicaciones hoy en día son capaces de almacenar gráficos en ese formato. Todos ellos son herramientas de software que se siguen usando ampliamente en la actualidad para aplicaciones de realidad virtual. La especificación de VRML fue revisada en el 2000 y tras eso fue la base de X3D, un lenguaje equivalente, pero basado en etiquetas, similar al estilo de HTML, que agregó nuevas características, pero aún no es soportado tan ampliamente como lo es VRML. En los últimos años, han surgido varias iniciativas en la comunidad de software libre para crear bibliotecas de gráficos 3D que resuelvan problemas importantes en cuanto a gráficos distribuidos y realidad virtual. Mientras, en el ámbito comercial, ha surgido software especializado para facilitar la creación de aplicaciones de visualización científica en entornos de realidad virtual tales como Amira, basado en el OpenInventor de TGS. Sin duda el tiempo nos seguirá trayendo aún numerosos avances en esta área del software.

Este crecimiento ha sido acompañado de un intenso intercambio científico, tecnológico y de aplicaciones a nivel internacional. Una de las primeras conferencias internacionales sobre el tema, "Interfaces para los mundos reales y virtuales", se celebró en Francia en 1992. Ese mismo año en los Estados Unidos, se celebró la primera conferencia *Medicine Meets Virtual Reality*. Y en 1993 la IEEE organizó su primer congreso en esta área llamado *Virtual Reality Conference*. En la década de los 90s, las conferencias anuales de gráficos por computadora (SIGGRAPH) no cesaron de mostrar innovaciones en equipo y aplicaciones de realidad virtual, se desarrollaban HMDs mejores y mucho más baratos, innovaciones en hardware gráfico y sistemas de rastreo montados en el techo (1991), innovaciones en realidad virtual basada en proyecciones en lugar de HMDs se mostraron con el CAVE desarrollado por el Electronic Visualization Lab (Universidad de Illinois, Chicago) y The Virtual Portal, de Sun Microsystems. Otra versión de realidad virtual basada en proyección estéreo sin distorsión para una persona sobre un despliegue tipo mesa se mostró allí en 1994, bajo el nombre de Responsive Workbench, desarrollado por GMD, y comercializado un año después por Fakespace bajo el nombre de Immersive Workbench. También en 1995, Pyramid Systems comercializó el CAVE y el ImmersaDesk. El Immersive Workbench para dos usuarios se introdujo en 1996. En 1996 se inaugura el VR-CUBE, un sistema tipo CAVE de 6 lados, en el Real Instituto de Tecnología de Suecia. Otro CAVE de 6 lados se creó en la Universidad Estatal de Iowa en el 2000.

Respecto al negocio del entretenimiento, en 1998, Disney inauguró su primer centro de juegos y espectáculos de realidad virtual llamado DisneyQuest, haciendo uso de HMDs y

proyecciones. Sin embargo en 2001 DisneyQuest de Chicago cerró, y los planes para abrir se suspendieron.

## **Aplicaciones de la Realidad Virtual**

Las áreas beneficiadas por el uso de la realidad virtual son múltiples, sin embargo hace unos años, el alto costo de las instalaciones y el alto nivel técnico requerido para su funcionamiento la limitaban a sectores muy especializados. Su actual masificación hace difícil proporcionar una lista exhaustiva de usos ya que abarca casi todas las áreas del conocimiento e incluso entretenimiento. La industria aeroespacial y automotriz la utilizan para el diseño de aviones y coches, revisando interiores, aerodinamismo y simulando accidentes; la industria petrolera, para revisar la información correspondiente a las capas geológicas, estudiar la acumulación de petróleo y las óptimas formas de extraerlo. Su potencial didáctico a través de la simulación de situaciones la hace excelente para el entrenamiento de pilotos, astronautas y militares. La arquitectura y el diseño industrial son campos muy prometedores para aplicar la realidad virtual en el proceso de diseño de productos, al poder visualizarse los proyectos antes de su construcción. Aprovechando la inmersión, es factible estudiar fobias y sus terapias. Todas las áreas que requieren el estudio de moléculas encuentran en la visión estereoscópica y la manipulación 3D, una retroalimentación importante para entender sus propiedades.

No hay que olvidar tampoco una importante industria que gira alrededor de la industria de los videojuegos. De hecho, su auge económico lo hace un motor para el desarrollo de nuevas técnicas y dispositivos más económicos y confiables.

Así como el desarrollo de la realidad virtual comparte gran parte de la historia de la computación, en especial de los gráficos por computadora, del mismo modo la bioinformática ha ido recorriendo un largo camino al lado de esos y otros avances tales como diversas técnicas de visualización científica y otras áreas de las ciencias de la computación.

## **La Bioinformática**

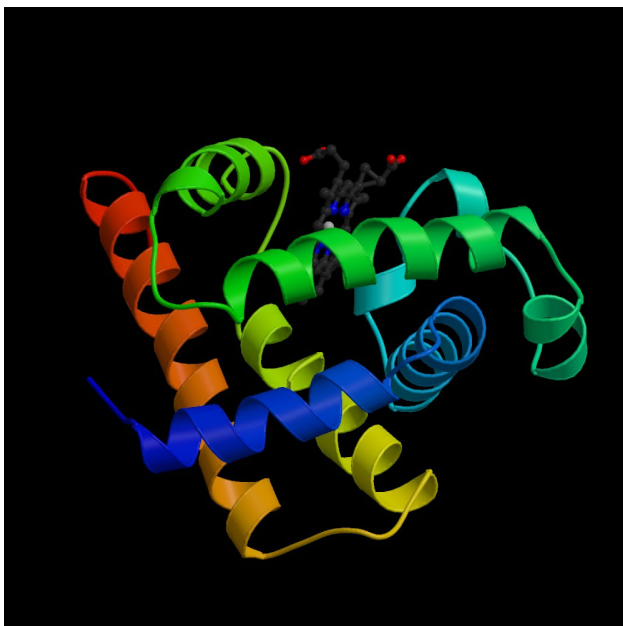
La bioquímica es una de las ramas que hace un uso vigoroso de la visualización y que ha sido muy beneficiada con la incorporación de técnicas de realidad virtual inmersiva. Una de las bases del estudio de las proteínas es el hecho de que la estructura permite elaborar inferencias acerca de la función de la proteína. Y la ubicación tridimensional precisa de los grupos funcionales dentro de la estructura, es una pieza clave para estudiarla. La evolución de esta ciencia ha recorrido un largo camino desde que se determinó la primera estructura tridimensional de una proteína en 1957, la mioglobina, que corresponde a la proteína con capacidad para almacenar oxígeno en músculos (ver figura 2). En la década de los 60s, surgieron los primeros pioneros en visualización de proteínas, como Irving Geis, con ilustraciones hechas a mano. Pero no fue hasta 1982 que Arthur Lesk y Karl Hardman, fueron pioneros en usar las computadoras para generar diagramas esquemáticos automatizados a partir de las deducciones experimentales de las coordenadas espaciales de átomos dentro de proteínas. La incorporación de la computación en los análisis de datos, estructuras y relaciones biológicas ha dado origen a la bioinformática.

Desde entonces se ha automatizado la generación de una diversidad de diagramas esquemáticos para visualizar la estructura molecular más allá del nivel de átomos, como por ejemplo las estructuras secundarias e incluso terciarias y cuaternarias de proteínas. La visualización de esta información ha pasado de complejas y enormes maquetas de alambres, barras y esferas hasta la graficación de estructuras macromoleculares. El camino ha sido largo, desde el uso de un osciloscopio controlado por computadora para mostrar una imagen rotatoria de una estructura proteínica en 1968, hasta la evolución de los gráficos por computadora que acompañan a las aplicaciones de visualización molecular. Los primeros sistemas de gráficos vectoriales introducidos comercialmente por Evans and Shuterland en 1969 (por ejemplo el LDS1, Sistema de dibujo de líneas 1), aunque limitados a representaciones de líneas, probaron su utilidad invaluable para graficar datos complejos. Con el advenimiento de los sistemas de gráficos de barrido, vino una nueva generación de programas para visualizar moléculas, como el programa FRODO escrito originalmente para una computadora DEC PDP 11/40 con un monitor Vector General 404 por Alwyn Jones y colegas suyos, y portado después al E&S Picture System 2, capaz de generar imágenes a color interactivas de alta calidad, junto con mapas de densidad de electrones y estructuras y edición de modelos cristalográficos.

A la par de los programas muy complejos y con muchísimas funciones, se programaron visores más sencillos como el programa RasMol, desarrollado por Roger Sayle a comienzos de los 90s, que introdujo una serie de ideas nuevas en gráficos interactivos. KINEMAGE, otro programa más reducido que RasMol, incorporó vistas preseleccionadas con anotaciones y etiquetas de estructuras.

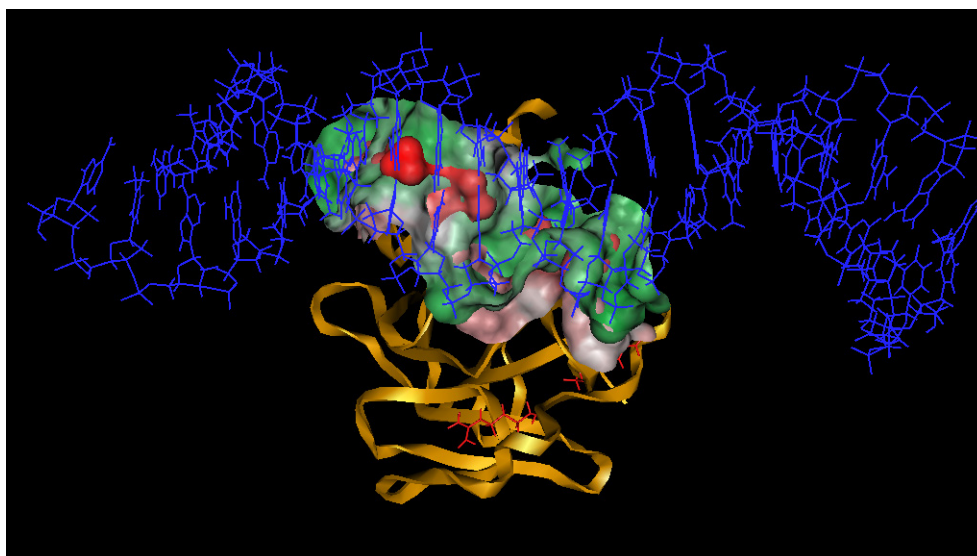
Las representaciones visuales van desde los clásicos modelos de alambre y representaciones con sólidos como barras y esferas sólidas. El siguiente nivel son representaciones abstractas, por ejemplo de estructuras secundarias de proteínas, como los cilindros o cintas espirales para  $\alpha$ -hélices y cintas planas para láminas  $\beta$ , introducidos por Jaen Richardson en 1985. Grasp, introducido por Nichols en 1993 para sistemas SGI, fue de los primeros programas en desplegar superficies moleculares interactivas de potenciales electrostáticos. La figura 3 ilustra algunas de estas técnicas.

Las estaciones gráficas de Silicon Graphics de los 80s, constituyeron la plataforma de *facto* para visualizar moléculas. Desde entonces hay toda una historia de cómo la bioquímica ha avanzado junto con la evolución de las aplicaciones basadas en líneas de comandos a aquellas con interfaces gráficas de usuario. La evolución de la tecnología en cómputo (PCs, Internet) ha hecho posible miniaplicaciones basadas en Web y Java. De igual modo se han popularizado las bases de datos en línea de moléculas, como el banco de datos de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) creado en octubre de 1971 y que reúne a la fecha aproximadamente 24,000 macromoléculas. La bioinformática ha cobrado aún mayor importancia dentro del contexto de la gran cantidad de datos por analizar de manera sensorial para los humanos, que constituye la forma más eficiente posible. Una enorme cantidad de estudios tanto académicos como comerciales se han emprendido para estudiar el genoma y la búsqueda de nuevos fármacos para combatir viejas y nuevas enfermedades. En el extranjero se han ido desarrollando sistemas de cómputo de realidad virtual inmersiva que integran diversos avances en diversas áreas y tecnologías para hacer lo más fácil y funcional posible este tipo de estudios. Hay una gran cantidad de proyectos de investigación básica y aplicada, académica y comercial, en áreas tales como genómica y diseño de drogas, que se han beneficiado del VRML y muchas otras tecnologías. Proyectos tales como SARAgene (2002), se dedican a la exploración del genoma en



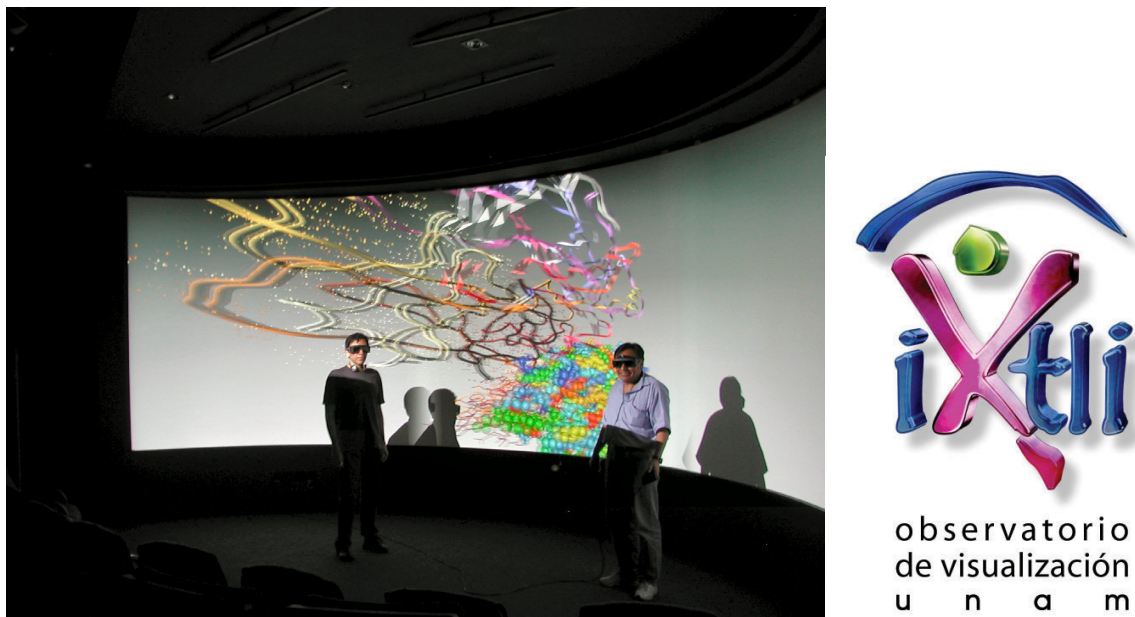
**Figura 2.** Mioglobina, la primera proteína cuya estructura fue determinada a alta resolución. Fuente: The Protein Data Bank.

ambientes virtuales para el diseño de fármacos. Este proyecto fue emprendido por la compañía SARA y Johnson & Johnson, en el cual se han empleado entornos de visualización inmersiva para albergar un sistema muy avanzado de realidad virtual apoyado en extensas bases de datos, para poder realizar estudios muy complejos donde se involucran alrededor de 100,000 compuestos químicos en un día. El sistema integra también sonido y videoconferencia, de tal manera que la explotación de este recurso es colaborativa.



**Figura 3.** Uno de los primeros modelos creados en VRML (1994), combinando la visualización de estructuras secundarias con modelos de alambre y superficies moleculares. (Tomado de: <http://www.ch.ic.ac.uk/rzepa/vrml/brickmann/panel1b.wrl/> ).

Por otro lado, algunos de los sistemas de visualización científica comerciales más complejos tales como AVS y AMIRA han incorporado módulos especializados para la visualización de información molecular, facilitando en algunos casos además, el uso de hardware más especializado para visualizaciones inmersivas de realidad virtual.



**Figura 4.** Uno de los primeros proyectos de realidad virtual en la DGSCA (sala IXTLI) para visualizar macromoléculas del dengue 2 mexicano. Foto: cortesía de la Dra. Blanca Ruiz, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 2004.

## EL PROYECTO DE SERVICIOS DE REALIDAD VIRTUAL INMERSIVA “IXTLI”

No existen modelos estándares para un espacio de realidad virtual, éste se diseña según las necesidades y el uso que se le quiera dar. Es deseable un sistema que pueda ser escalonado para ofrecer soluciones individuales o grupales, y las soluciones tecnológicas son muy variadas. Hay muchas configuraciones posibles, en cuanto a pantallas, sistemas de proyección, de estereoscopia, de interacción, configuración de las computadoras o flexibilidad de uso del conjunto. Además, el uso pretendido de la instalación define si el factor más importante es la sensación de inmersión, la interacción, el hecho de ver despliegues amplios o la posibilidad de colaboración a distancia.

En el diseño de IXTLI se tomó en cuenta que la sala sería un servicio para una comunidad académica multidisciplinaria, incluyendo las ciencias, humanidades y artes. Se consideró también que los esquemas de uso implican la impartición de clases a grupos numerosos de estudiantes, reuniones de trabajo para proyectos de investigación de análisis y discusión de fenómenos en grupo, y que una sesión de trabajo podría requerir la integración de múltiples medios, incluida la necesidad de comunicación con otros grupos a distancia.

## Descripción

Para recibir grupos de estudiantes de 40 alumnos, se decidió que la sala tuviera una forma de auditorio, sin embargo, para que desde cualquier lugar se pudiera vivir la inmersión era importante cuidar la visibilidad hacia la pantalla, así que la inclinación del auditorio fue diseñada tomando en cuenta la isóptica. De esta manera, las personas ubicadas en las primeras filas no estorban la visión de los asientos traseros. Asimismo, es factible remover la primera hilera de asientos para instalar mesas de trabajo y favorecer el trabajo de grupo. A nivel visual se decidió que la sala fuese totalmente oscura y que el único elemento visible fuese la pantalla, ningún equipo electrónico debía resaltar y ningún elemento decorativo se permitió. Por lo tanto, todo queda del mismo color para no distraernos del ambiente que muestra la pantalla.

Igualmente importante fue el cuidado de la acústica de la sala, aislándola de los ruidos exteriores para que la experiencia sonora de la realidad virtual no se perturbara. La pantalla curva puede amplificar los efectos de eco. Para evitar este problema, el resto de los muros fueron recubiertos de paneles aislantes.

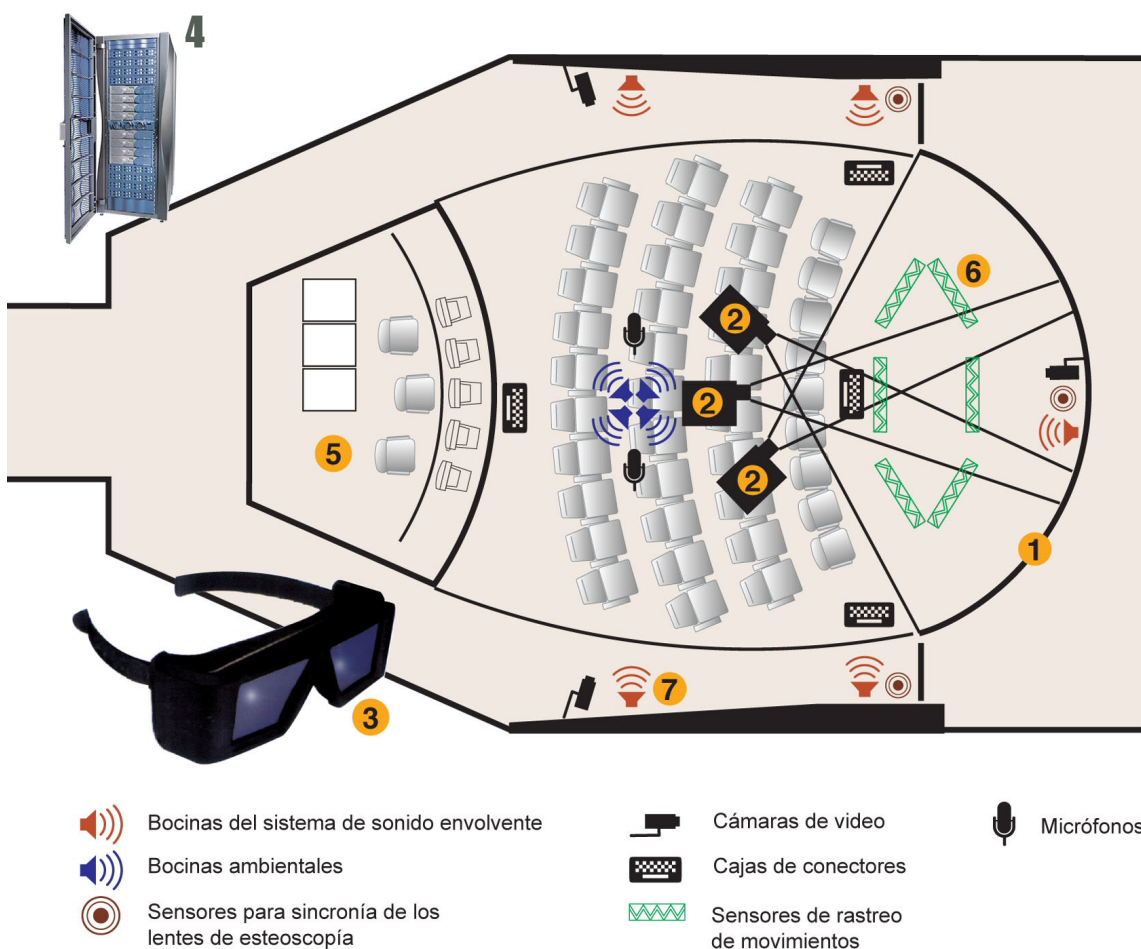


**Figura 5.** (a) Supercomputadora gráfica Onyx 350 ubicada en un entorno de clima controlado dentro de la DGSCA. (b) Rack al interior de la cabina de la sala IXTLI, que alberga los controles del sistema de sonido y fuentes de video alternas como DVD y VHS entre otros.



Atrás de los asientos, se ubica la cabina donde están instalados los componentes con los cuales el operador necesita interaccionar. Hay dos racks donde se encuentran la mezcladora de sonidos, una videocasetera, dos reproductores de DVD y switches. Sobre la mesa, cinco monitores y tres teclados permiten interaccionar con las computadoras que envían las imágenes proyectadas en la pantalla. Dos paneles de tipo *touchscreen* (pantallas de contacto) controlan todo el sistema, desde seleccionar las múltiples fuentes de imágenes posibles para cada uno de los monitores instalados, hasta el sistema de cámara o la iluminación de la sala.

La supercomputadora gráfica Onyx 350 de SGI (ver figura 5a), donde se procesa la información gráfica desplegada en la pantalla, está ubicada en la sala de supercómputo a unos 15 metros de distancia, en óptimas condiciones de temperatura y humedad y libre de polvo.



**Figura 6.** Plano de la sala IXTLI. Componentes del sistema: (1) pantalla curva, (2) proyectores, (3) lentes estereoscópicos, (4) fuentes de imágenes, (5) Cabina de control, (6) sistema de rastreo y (7) sistema de audio.

## Inmersión

La inmersión visual se obtiene mediante la combinación de los proyectores, la pantalla, los lentes estereoscópicos y la ambientación oscura. Tres proyectores Christie Digital ubicados en el techo, envían las imágenes a la pantalla para integrar una sola con una resolución de 3840 x 1024 píxeles. La pantalla es curva y mide 2.55 m de altura por 8.90 m de arco, cubriendo un ángulo de 140 grados (figura 4). La curvatura aumenta mucho la inmersión en la imagen al hacerla envolvente, criterio fundamental para las áreas que se retroalimentan por el aspecto sensorial. El acabado de la pantalla tiene propiedades especiales para reflejar la luz de manera uniforme, sin puntos de brillo. Se escogió un sistema de estereoscopía activa, con lentes sincronizados a la computadora mediante tres emisores ubicados en la parte inferior media de la pantalla y en los laterales superiores. La estereoscopía activa presenta una calidad de profundidad mucho mayor que la estereoscopía pasiva.

La inmersión auditiva es lograda por un sistema de sonido envolvente 5.1, es decir, cinco bocinas y un *subwoofer* ubicados alrededor de la sala. Este sistema de sonido permite combinar espacio visual con espacio auditivo (figura 5b). Es totalmente independiente del sistema de sonido empleado para reforzar la voz de los conferencistas.

## Interacción

La forma más tradicional de interactuar con una computadora es mediante un teclado, lo cual es posible hacerlo desde la cabina de control y en las partes delanteras y traseras de la sala. Adicionalmente, se cuenta con periféricos más propios de la tecnología de realidad virtual: un sistema de rastreo (*tracking system*) y un guante. El sistema de rastreo es un Intersense VET-900. Consta de cinco barras en el techo que ubican de manera muy precisa, al milímetro y con coordenadas XYZ, la posición espacial de un *mouse* tridimensional y de unos sensores montados sobre lentes estereoscópicos. Así, al mover la cabeza o la mano que sostiene el *mouse*, el movimiento queda registrado y el programa puede traducirlo como interacción con el modelo tridimensional. La interacción incluye entonces movimientos corporales naturales. Las tres cámaras ubicadas en el techo fueron colocadas para apoyar los desarrollos futuros en interfaces humano-máquina mediante el reconocimiento de movimientos, sin periférico alguno. Estos mecanismos sumados al reconocimiento de voz, abrirán un patrón de interacción cada vez más natural. Se cuenta también con un guante conectado a la PC. La figura 6 ilustra el sistema completo.

## Fuentes de imágenes

Las imágenes proyectadas sobre la pantalla pueden venir de tres computadoras, de una videocasetera VHS, de los dos reproductores de DVDs, de las cámaras o del sistema de videoconferencia. Todo bajo control de un switch de video (figura 7).

La computadora principal para el cálculo de imágenes es una Onyx 350 de SGI equipada con 12 procesadores, tres *pipes* (canales de salida) gráficos, dos *rastermanagers* (controladores de imágenes) por *pipe*, 24 Gbytes por *pipe* y 2.5 TBytes de almacenamiento. La arquitectura de dicho equipo está optimizada para el cálculo de gráficos en tiempo real, repartiendo el proceso



entre los procesadores, definiendo las partes visibles del modelo para cada *pipe* gráfico, y para que los rastermanagers almacenen y calculen píxeles de las texturas.

Sin embargo, se puede proyectar también imágenes que provengan de una PC con dos procesadores (es decir, dual), de una Macintosh G5 dual o de una laptop que se conecte en la parte delantera de la sala. En el caso de la primera, la estereoscopía se alcanza solamente en dos tercios de la pantalla, aunque es posible aprovechar toda la pantalla en monoscopía.

Una ventana en la pantalla puede corresponder a la señal de imágenes enviada por videoconferencia y otra a la recepción de la señal de videoconferencia. Adicionalmente, se puede ver lo que está capturando las cámaras de la sala. La integración de la sala a un sistema de videoconferencia facilita la colaboración a distancia de los académicos que requieren compartir visualizaciones y ambientes virtuales. Cualquiera de las fuentes de imágenes puede ser enviada por la señal de videoconferencia.

Se puede mostrar así siete ventanas adicionales a la imagen tridimensional que queda en el fondo, ubicarlas en cualquier lugar de la pantalla y cambiarlas de tamaño, y en cada una de ellas tener alguna de las fuentes de imagen descrita anteriormente. Esta forma de trabajo da una flexibilidad total a lo que se quiere ver en la pantalla y en qué momento, ya que cada ventana puede aparecer o desaparecer cuando se desee.

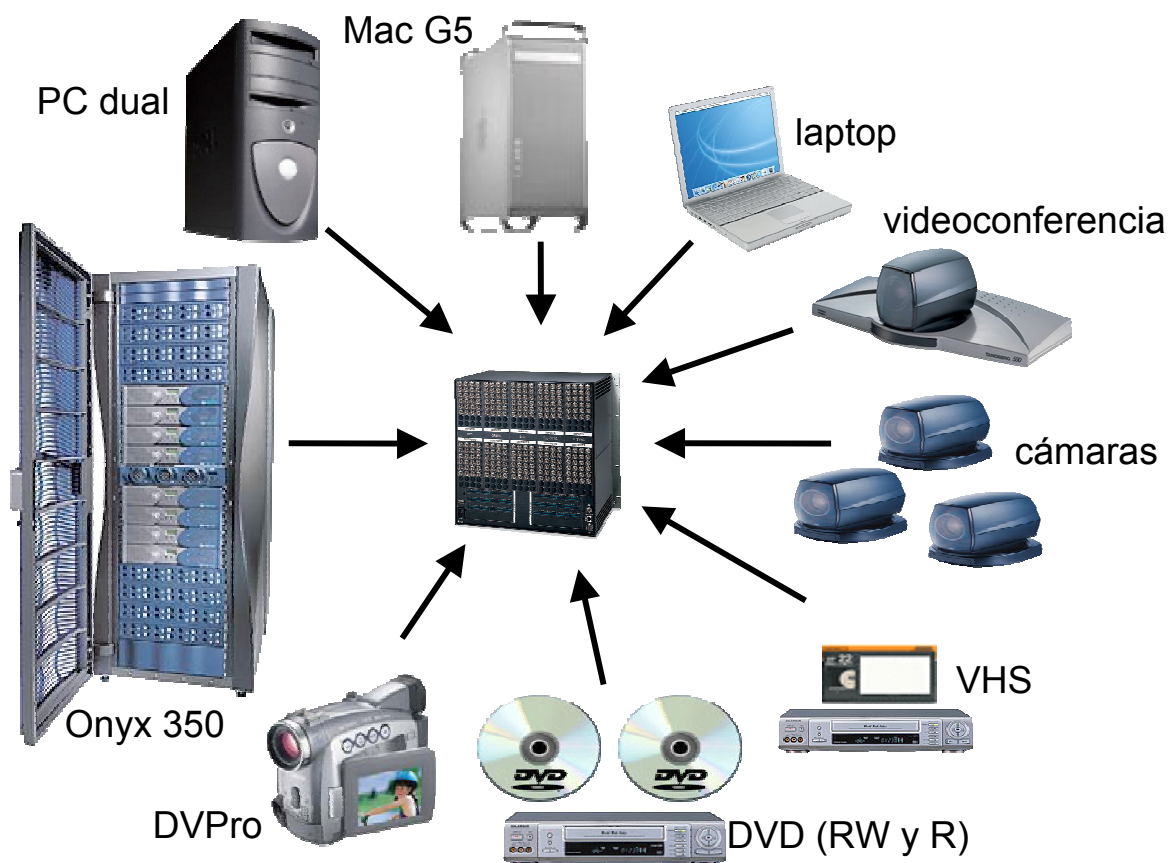
Estas imágenes no solamente son visibles en la pantalla, sino que pueden ser enviadas a monitores ubicados en la cabina de control, en la parte delantera central de la sala, en la sala de preparación y a un monitor instalado en el Departamento de Visualización (figura 8). Un esquema de uso consistiría en tener la señal de la Onyx de fondo en la pantalla, un archivo de presentaciones ejecutándose en una laptop en un esquina, una imagen de video en la parte central, apareciendo en algún momento de la clase, una ventana con el grupo que toma la clase a distancia y en otra ventana, ver cuál es la señal que se está enviando (figura 9).

## **Conectividad**

Todo el sistema de cómputo tiene conexiones de red Gigabit, tanto la Onyx como la PC y la Macintosh salen al backbone de la UNAM sobre Internet e Internet2. El sistema de videoconferencia está conectado vía FastEthernet, a 100 Mbits, como se ilustra en la figura 10.

## **Software disponible**

El software instalado en los equipos está a disposición de la comunidad académica para visualizar sus modelos, además de que es posible instalar software adicional, según las necesidades específicas. Algunos de estos programas son comerciales mientras que otros son de dominio público, y se listan en la Tabla 1.



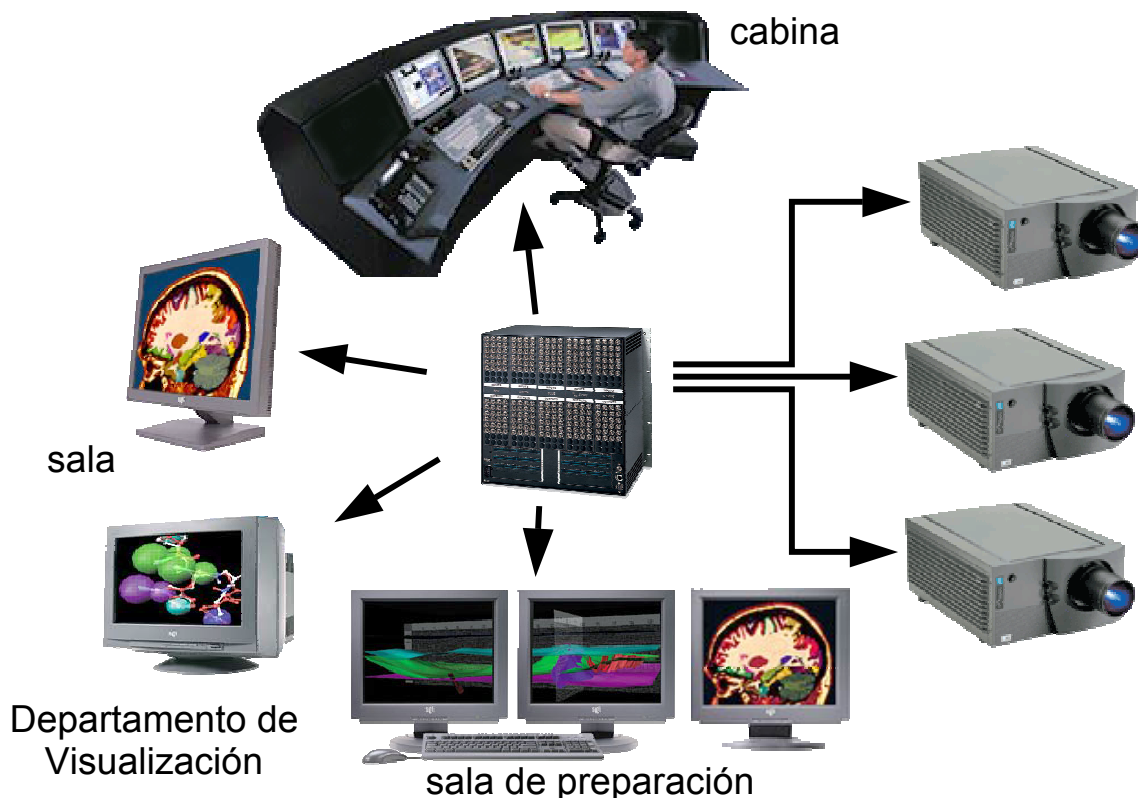
**Figura 7.** El switch de video (al centro) controla todas las fuentes de video de la sala IXTLI.

### Usos de las instalaciones

El propósito fundamental del proyecto IXTLI consiste en la interacción inmersiva con modelos virtuales 3D ya sea para impartir clase o con fines de investigación. La manipulación de la información y su visualización en grande e inmersión, proporcionan una forma de entendimiento de fenómenos complejos que solamente se pueden entender con gráficas tridimensionales estereoscópicas. El beneficio principal puede venir de la inmersión dentro de un mundo tridimensional, lo cual sería el caso por ejemplo de áreas como la arquitectura; pero también puede darse por la facilidad de manipulación de la información, el poder girar y acercarse a los objetos como las moléculas; y las amplias visualizaciones, es otra de las aportaciones de la sala, facilitan la exploración de la información.

Poder tener al mismo tiempo múltiples fuentes de imágenes, permite correlacionar datos distintos desde diferentes medios, analizar un caso teniendo sus diferentes componentes; es el caso de los sistemas de información geográfica, donde bases de datos se enlazan a gráficas

vectoriales, imágenes y estadísticas. Poder modificar una variable y ver en tiempo real sus consecuencias, permite inducir sobre comportamientos sociales y económicos.



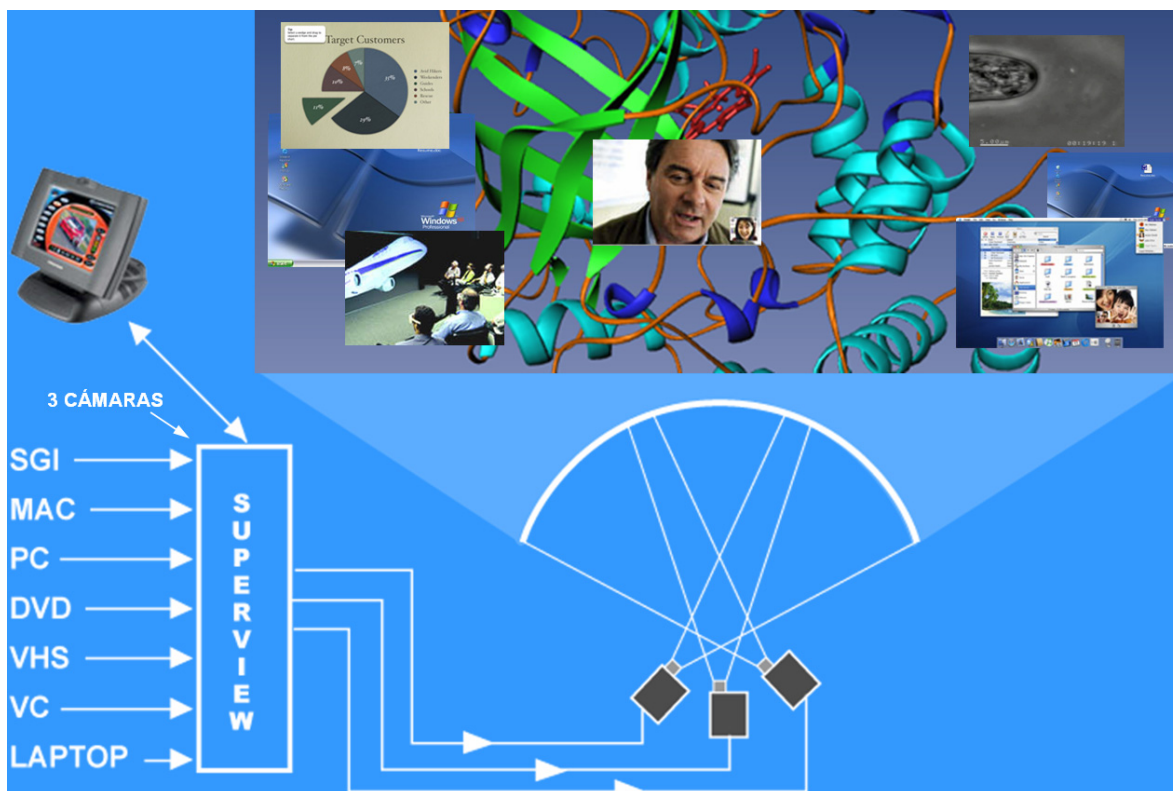
**Figura 8.** El switch puede enviar la señal de video a varias salidas simultáneas además de los 3 proyectores de la sala (a la derecha).

La integración de la realidad virtual a los sistemas en red, abre nuevos campos ubicados en forma remota de uso particularmente interesantes tales como visualización y ambientes virtuales compartidos, sistemas de telepresencia y ambientes colaborativos. Grupos de investigadores pueden visualizar el mismo modelo en tres dimensiones, interactuar, estudiarlo en forma conjunta, y con el sistema de videoconferencia, pueden además comunicarse, es decir, verse y hablarse, utilizando los más avanzados estándares de comunicación sobre Internet. Esta forma de trabajo de colaboración a distancia integra las ventajas de la realidad virtual como medio para sistemas de aprendizaje avanzados dotado de rápidas redes de comunicación.

## Servicios

La Dirección General de Servicios de Cómputo Académico está a cargo del funcionamiento y mantenimiento de las instalaciones y proporciona capacitación y asesoría a los académicos para el mejor aprovechamiento del sistema.

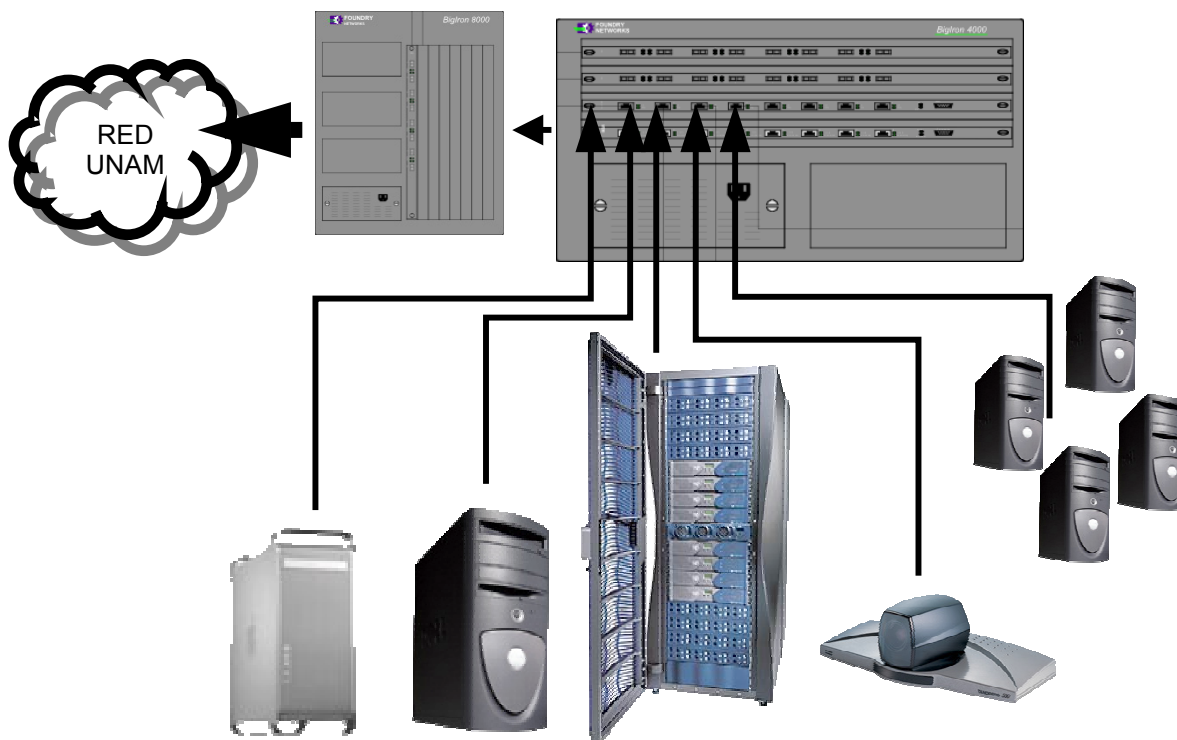
Para impartir una clase, el docente debe apartar la sala justificando su uso y pasar a revisar sus materiales unos días antes de la fecha, asegurando así que todos los programas que requerirá estén correctamente instalados y que sus archivos se transfieran sin problema.



**Figura 9.** El componente de hardware denominado *Superview* permite insertar hasta 7 ventanas de distintas fuentes de video, moverlas y escalarlas libremente.

Para un esquema de uso en investigación, si el proyecto requiere de múltiples sesiones de trabajo, es necesario presentar un protocolo de investigación, el cual será revisado por el Comité Académico, quien determinará cuántas horas de uso del servicio serán asignadas para el desarrollo del proyecto.

Para el desarrollo de nuevos proyectos, se puede contar con la asesoría de varios grupos de trabajo de la Dirección de Cómputo para la Investigación para buscar las mejores soluciones, desde la preparación de los modelos, sistemas de visualización y de interacción. Se buscan soluciones en la que el académico pueda desarrollar sus modelos de manera independiente en su lugar de trabajo, y los lleve a la sala cuando requiera de la visualización con estereoscopia y en tiempo real.



**Figura 10.** El Observatorio de Visualización IXTLI posee una red interna LAN tipo Gigabit, de tal manera que tanto las computadoras como el sistema de videoconferencia tienen salida a RedUNAM incluyendo Internet 2.

### **Conclusión: El Futuro de la Realidad Virtual en la UNAM**

En ciertas áreas académicas, la realidad virtual es una herramienta novedosa mientras que para otras más familiarizadas con la visualización existía desde hace varios años la demanda en instalaciones de realidad virtual en la UNAM. Sin embargo, la gran mayoría de los académicos encuentran en la integración de la realidad virtual a sus actividades un potencial de uso fundamental para entender fenómenos complejos y transmitir hacia sus estudiantes sus conocimientos. El impacto de la realidad virtual en la docencia y la investigación permite prever un aumento en la necesidad de contar con otras instalaciones dentro de las dependencias universitarias, con distintas especificaciones. El diseño de cada instalación podrá adecuarse a requerimientos particulares en cuanto a tamaño de imagen, forma de la pantalla, computadora empleada y medios de interacción.

Al llevar a las dependencias las tecnologías de realidad virtual en otras escalas, es importante considerar varios puntos en cuanto a las soluciones de bajo costo y de fácil mantenimiento, que no requieran un personal académico muy especializado dedicado. Estamos trabajando actualmente en estas soluciones. Éstas incluyen:

- El uso de PC como fuentes principales de cálculo gráfico, una sola PC o Mac, si el cálculo no es tan exigente, y *clusters* (o granja de PCs) en el caso de procesamiento más intensivos.
- El uso de estereoscopia pasiva en vez de estereoscopia activa. Si bien la calidad de imagen no es tan alta, este sistema es mucho más económico y permite una adecuada percepción de la profundidad y relieves de las escenas tridimensionales.
- El desarrollo de herramientas de navegación y visualización basadas en software libre. Algunos de los programas instalados actualmente en el IXTLI son libres y existen varios grupos de trabajo a nivel internacional para el desarrollo de nuevas herramientas dentro de este esquema de trabajo.

**Tabla 1.** Bibliotecas y programas gráficos para desarrollar aplicaciones en IXTLI.

|                                                   |                                                                  |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| OpenInventor 4.0                                  | Versión de TGS de Inventor, soportando gráficos multipipe.       |
| OpenGL                                            | Biblioteca de gráficos en C, muy portable y poderoso.            |
| IRIS Performer                                    | Software muy fácil de usar para gráficos multipipe optimizados.  |
| OpenInventor 2.1.5                                | Última versión base de Inventor por su creador, SGI.             |
| GLUT                                              | Biblioteca para crear interfaces gráficas muy portable y libre.  |
| GL4Java                                           | Biblioteca de gráficos en Java optimizados usando OpenGL.        |
| Java3D                                            | Biblioteca de gráficos en Java.                                  |
| DirectX/Direct3D                                  | Biblioteca de gráficos y sonidos de Microsoft para Windows.      |
| OpenGL Multipipe                                  | Extensión de OpenGL del vendedor (SGI, Onyx) para multipipe.     |
| OpenGL Shader                                     | Extensión de OpenGL por SGI para usar texturas procedurales.     |
| OpenGL Volumizer                                  | Extensión de SGI para ver volúmenes de datos como texturas 3D.   |
| Convertidores de formatos de archivos de imágenes |                                                                  |
| Nugraf                                            | No sólo convierte archivos de modelos 3D, también los renderiza. |
| VtkActorToPF                                      | Software que usa VTK y Performer para crear gráficos.            |
| Modeladores                                       |                                                                  |
| Alias Wavefront Maya                              | Software avanzado para crear modelos 3D animados.                |
| Multigen Creator                                  | Software para modelar entornos virtuales 3D optimizados.         |
| Blender                                           | Software para mundos virtuales interactivos tales como juegos.   |
| AC3D                                              | Un modelador para Windows y Linux.                               |
| Software para la síntesis de imágenes             |                                                                  |
| IRIS Performer                                    | Software (bibliotecas y aplicaciones) de SGI.                    |
| Blue Moon                                         | Software que implementa la especificación Renderman de Pixar.    |
| Maya                                              | Calcula también las imágenes de una animación para video.        |
| Frame Cyclor                                      | Sistemas para crear y experimentar filmes en 3D.                 |
| PovRay                                            | Software muy popular para sintetizar imágenes de escenas.        |
| Radiance                                          | Software avanzado para simular iluminación fotorrealista.        |
| Software especializado en realidad virtual        |                                                                  |
| VR Juggler                                        | Software muy portable y flexible para desarrollar aplicaciones.  |
| VR Nav                                            | Programa de navegación de mundos virtuales muy fácil de usar.    |
| Saranav                                           | Visor de escenas geométricas basado en Performer.                |

Vemos que la realidad virtual no es un elemento de ciencia ficción sino un conjunto de tecnologías y técnicas científicas que permiten trabajar en forma natural con los datos que las computadoras procesan, esto abre nuevos horizontes de uso del cómputo y le da un potencial aumentado para las actividades humanas tales como la bioinformática, que no ha estado ajena a estos avances. Si bien es muy sofisticada una instalación como el proyecto IXTLI así como los desarrollos del cómputo y la electrónica que permiten su integración, para el usuario, el docente o el investigador, el uso de este medio es natural y sencillo, ya que basado en la percepción permite entender y aprender, lo cual ha sido siempre la forma de crear y recrear el conocimiento.

A continuación se enlistan una serie de libros y artículos sobre realidad virtual y bioinformática, en donde el lector interesado puede encontrar información adicional.

### **Bibliografía selecta**

- Bourne, P. E. y Weissig, H. Eds. (2003). Structural Bioinformatics. Series: Methods of biochemical analysis; v. 44. Hoboken, New Jersey : Wiley-Liss, 649 pp.
- Burdea, G. C. y Coiffet, P. (2003). Virtual Reality Technology. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 444 pp.
- Cotton, B. y Oliver, R. (1994). The Cyberspace Lexicon: an illustrated dictionary of terms from multimedia to virtual reality. Phaidon Press Ltd, London: 224 pp.
- De Kock, Shelley.(2004). "Sir Charles Wheatstone and the Wheatstone Collection". Information Services and Systems of the King's College of the University of London, URL: <http://www.kcl.ac.uk/depsta/iss/library/speccoll/wheatstone.html>
- Dos Santos, C. Luiz, N., et al. (2004). "The Role of Virtual Reality in Bioinformatics Applications". Research Report LIMOS/RR 04-07, (Mars 5), 11 pp.
- Kearns, S. (2004) "Protein Data Bank Chronology". National Science Foundation Fact Sheet. URL: [http://www.nsf.gov/od/lpa/news/04/fstimeline\\_pdb\\_04.htm](http://www.nsf.gov/od/lpa/news/04/fstimeline_pdb_04.htm).
- Sherman, W. R. y Craig, A. B. (2003). Understanding Virtual Reality: Interface, application, and design. Morgan Kaufmann Publishers, 582 pp.
- Slater, Mel, et al. (2002). Computer Graphics and Virtual Environments: from realism to real-time. Pearson Education Ltd., 571 pp.
- Sutherland, I. "The Ultimate Display". Proceedings of the International Federation of Information Processing 65.: 506-508.
- Vince, J. (1995). Virtual Reality Systems. Addison-Wesley.

## **IXTLI, UN ESPACIO PARA EL APRENDIZAJE Y DESCUBRIMIENTO ASISTIDOS POR LA REALIDAD VIRTUAL**

### **Resumen:**

Se presenta la realidad virtual como un novedoso medio de visualización consolidado, que extiende las capacidades del hombre para entender y explicar fenómenos abstractos. Se define y se describe la tecnología y su historia, tanto hardware como software. La bioquímica no ha sido ajena a estos avances y se refleja así en la evolución de la bioinformática, y se revisan algunos casos. Se describe la tecnología y los servicios de visualización inmersiva que ofrece la UNAM a través del Observatorio de Visualización IXTLI.

**Palabras clave:** bioinformática, estereoscopia, interfaces humano-máquina, proyecto IXTLI, realidad virtual inmersiva y no inmersiva, sistemas de videoconferencia.



## **Semblanza de la Dra. Geneviève Lucet Lagriffoul.**



Es arquitecta egresada de la Escuela de Bellas Artes, en Francia. Obtuvo su maestría y doctorado con mención honorífica en la Facultad de Arquitectura de la UNAM, en las áreas de “restauración de monumentos” y “teoría de la arquitectura” respectivamente.

Trabaja en la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico desde 1988 donde se desempeña como investigadora titular de tiempo completo, adscrita a la Unidad de Investigación en Cómputo Aplicado. Su línea de trabajo es el uso del cómputo para el registro y el estudio del patrimonio cultural y ha desarrollado proyectos tales como “reconstrucción digital del sitio de Cacaxtla en varios de sus fases constructivas”, “digitalización del mural O’Gorman de la biblioteca central de la UNAM”, “visualización de arquitectura mesoamericana” y “procesamiento digital de imágenes para pintura mural”. Asimismo imparte clase de “arquitectura virtual” en el posgrado de arquitectura. Cuenta con publicaciones nacionales e internacionales en revistas especializadas y libros. Es miembro del sistema nacional de investigadores, nivel I.

Desde 2000 está a cargo de la Dirección de Cómputo para la Investigación (DCI), la cual está integrada por los departamentos de Supercómputo, Realidad Virtual, Visualización Científica, Seguridad en Cómputo así como la Unidad de Investigación en Cómputo Aplicado y la Coordinación de Bibliotecas. Participa en el Comité Académico de Supercómputo y el Comité Asesor de Cómputo de la UNAM. Esta Dirección cuenta con dos importantes planes de becarios en las áreas de “Cómputo intensivo” y de “Seguridad en cómputo”.

La Dra. Lucet ha sido la responsable del desarrollo del proyecto del Observatorio de Visualización de la UNAM, IXTLI, lo cual incluyó diseño conceptual y de instalaciones, supervisión administrativa y de la obra, desarrollo de proyectos y organización de grupos; es su actual coordinadora y funge como Secretaria del Consejo Directivo del IXTLI.

## **Daniel Espinosa Jiménez.**



Es estudiante de la carrera de Ingeniería Mecánica Eléctrica área Electrónica en la UNAM. Durante sus estudios destacó en concursos de matemáticas obteniendo el 3er. lugar del Distrito Federal en la 2ª Olimpiada Mexicana de Matemáticas (OMM), y en la 3ª OMM obtuvo 1er. lugar regional (D.F.) y 3er. lugar a nivel nacional. Ha tomado cursos para optimizar aplicaciones en supercomputadoras y desde 2000 labora en el Departamento de Visualización de la DCI, DGSCA. Ha impartido cursos de programación con Java y técnicas avanzadas de visualización en el Plan de Becarios de Cómputo de Alto Rendimiento (DGSCA). Ha desarrollado proyectos de servicios de visualización y realidad virtual para proyectos de investigación de la UNAM en las áreas de biomedicina, ciencias de la atmósfera, geofísica, y macroeconomía. Desarrolló aplicaciones de realidad virtual para visualizar fenómenos atmosféricos (tornado) y biomoléculas (virus del dengue 2 mexicano) como parte de los proyectos inaugurales del entorno IXTLI. Actualmente trabaja con técnicas de visualización científica optimizadas para gráficos en tiempo real en sistemas de realidad virtual inmersiva y desarrollo de simuladores de flujos volcánicos, entre otros, proporcionando servicios a diversos proyectos de investigación en la UNAM.





---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## **USO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD Y REGULACIÓN DEL CYP450. APLICACIONES EN FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA.**

Guillermo Elizondo Azuela

Sección Externa de Toxicología, Cinvestav-IPN, Apdo. Postal 14-740, México D.F., C.P. 07000

[gazuela@mail.cinvestav.mx](mailto:gazuela@mail.cinvestav.mx)

### **USE OF GENE KNOCKOUT AND TRANSGENIC MOUSE MODELS TO UNDERSTANDING CYP450 REGULATION AND FUNCTION. APPLICATIONS ON PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY.**

#### **Abstract.**

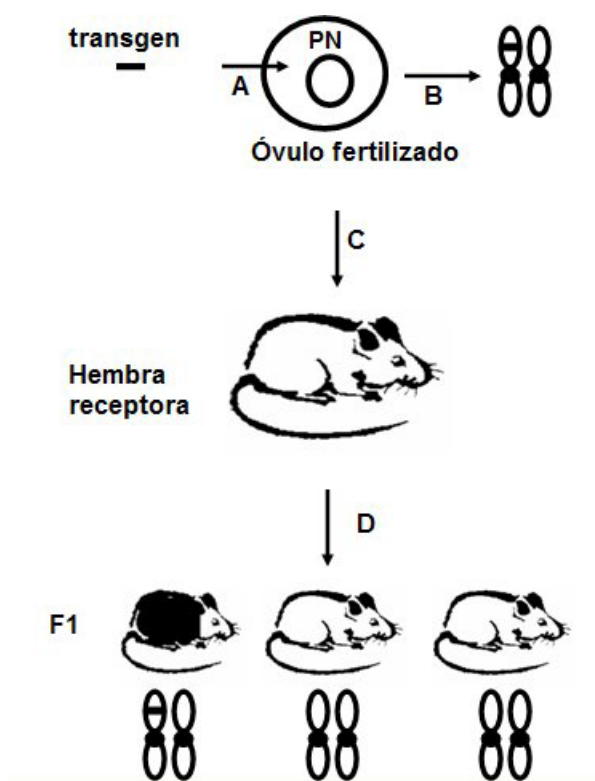
*An exponential increase of new chemical agents came with the industrial revolution. Since then, thousands of new compounds have been released to the environment in many ways with an important impact in human health. Understanding the mechanism by which xenobiotics induce toxicity is crucial to prevent potential health hazard. However, the complex mechanism of action of chemical toxins has made it extremely difficult to evaluate the precise toxic mechanism as well as the role of specific genes in either potentiating or ameliorating the toxic effect. Among different strategies, the problem can be addressed with genetically engineered animal models where the genes have been manipulated to study their roles in chemical toxicity. Cytochrome P450s have an important role in metabolic activation and xenobiotic detoxification through oxidative metabolism. During the past 10 years, several lines of P450 transgenic mouse have been produced to address the role of P450s in whole animal carcinogenesis and toxicity. The use of transgenic models has proven to have enormous value and should lead to a much grater understanding of potential risks associated with xenobiotics exposure.*

**Keywords:** xenobiotics; P450 cytochrome; toxicity; transgenic mouse; xenobiotic toxicity; xenobiotic metabolism.

## Introducción

En los años 80 se llevaron a cabo los primeros experimentos en los que fue posible realizar cambios específicos y heredables en el DNA de líneas germinales de ratón, iniciándose con ello una revolución en el estudio de la genética de los mamíferos. Esta tecnología permitió la producción de lo que ahora conocemos como ratones modificados genéticamente. Estos pueden ser de dos tipos: 1) Los ratones “knock-in” o transgénicos que son aquellos cuyo material genético ha sido manipulado para insertar a su genoma genes exógenos y 2) los ratones “knock out” o deficientes que son aquellos a los que se les ha anulado la expresión o funcionalidad de genes endógenos.

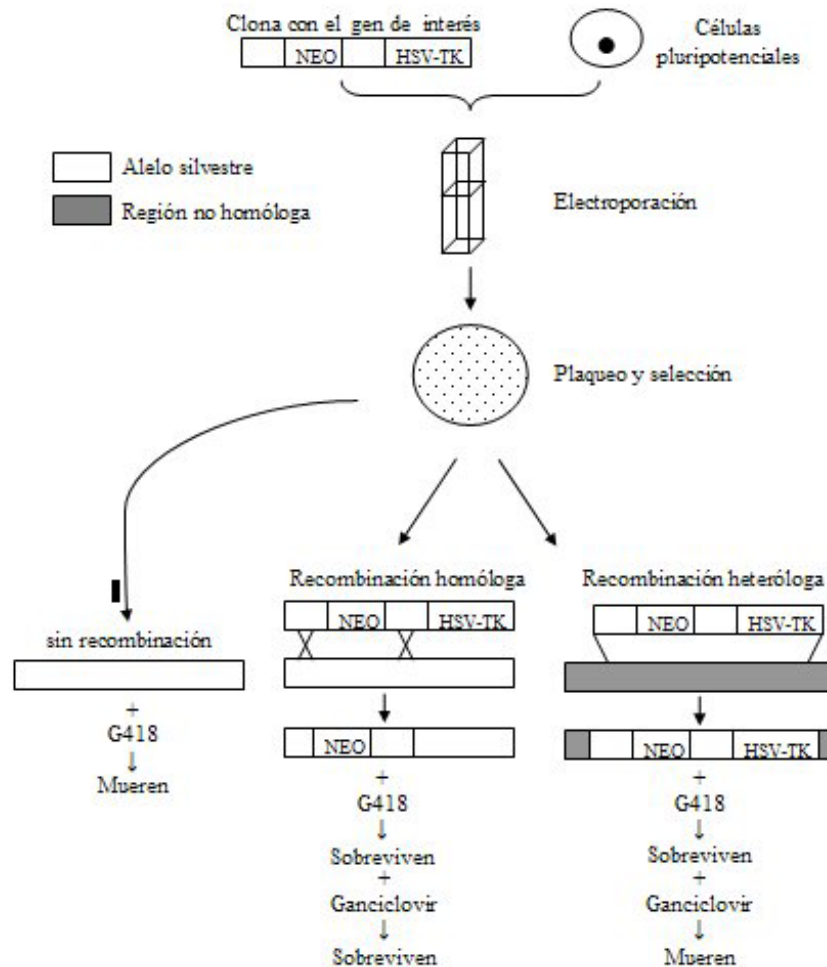
La estrategia utilizada para producir ratones transgénicos es la microinyección del material genético de interés en el pronúcleo de óvulos de ratón previamente fertilizados, los cuales son transferidos a una madre receptora donde terminan de desarrollarse (1). El DNA foráneo se incorpora de manera estable, esencialmente al azar, en cualquier sitio del genoma del ratón. Una vez identificados los ratones transgénicos, se cruzan entre sí, de manera que el DNA foráneo se hereda de la misma manera que cualquier otro gen (Figura 1).



**Figura 1.** Desarrollo de un ratón transgénico. A) El transgen de interés se lineariza e inyecta en el pronúcleo (PN) de un óvulo previamente fertilizado. B) El transgen se incorpora al azar en uno o varios cromosomas. C) Los embriones se insertan en el útero de una hembra receptora, donde completan su desarrollo. D) Los ratones transgénicos son hemigóticos, es decir, contienen el transgen en un solo alelo. La eficiencia en la producción de ratones transgénicos, en la generación F1, es de aproximadamente el 30%.

La posibilidad de manipular células embrionarias pluripotenciales (ES, por sus siglas en inglés “Embryonic Stem cells”) es posiblemente uno de los logros científicos más importantes de los últimos años. Esta tecnología y el fenómeno de la recombinación homóloga del material genético permitieron la creación de otro tipo de ratón modificado genéticamente conocido como “knock out” o deficiente, en el que un gen particular deja de expresarse o cuyo producto proteico no es funcional (1). El método consiste en la construcción de una clona conformada por tres

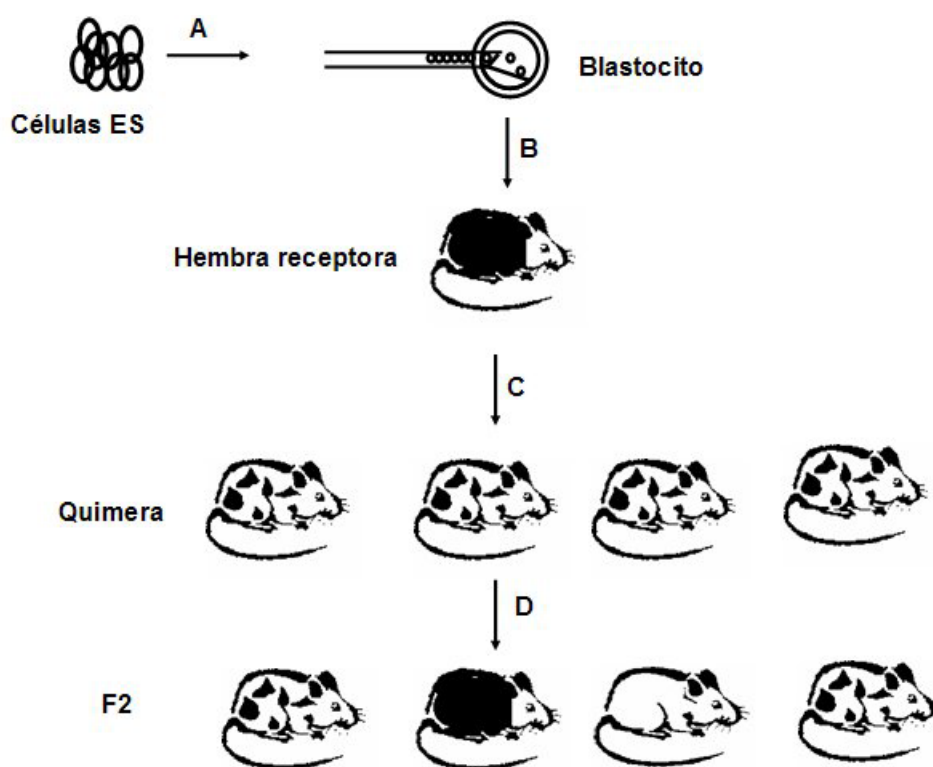
genes diferentes: 1) el gen de interés modificado de tal manera que pierda su expresión o funcionalidad, 2) un gen que confiera resistencia a un agente químico (p.ej. la aminoglucósido fosfotransferasa (NEO) y el G418) y 3) un gen que confiera sensibilidad a otro agente químico (p.ej. la tirosina cinasa del virus Herpes Simplex (HSV-TK) y Ganciclovir). Esta clona es trasferida a células ES mediante microinyección o electroporación, esperando que ocurra recombinación homóloga entre la clona y el gen nativo. Cuando los cultivos de células ES son tratados con G418, sólo sobreviven aquellas que hayan incorporado de manera estable a la clona, ya que estas expresan NEO lo que les confiere resistencia a aminoglucósidos tóxicos como el G418. Esta población celular está compuesta por células donde ocurrió recombinación homóloga y células donde se dio una recombinación heteróloga. Las recombinantes heterólogas son células donde el material genético proveniente de la clona se incorporó al DNA genómico al azar. Estas células son eliminadas cuando los cultivos celulares son tratados con Ganciclovir, ya que este es activado a un metabolito tóxico por la HSV-TK (Figura 2).



**Figura 2.** Selección de clonas positivas para el desarrollo de un ratón deficiente. NEO, aminoglucósido fosfotransferasa. HSV-TK, tirosina cinasa del virus Herpes Simplex.

Una vez aisladas, las recombinantes homólogas son microinyectadas en blastocitos de ratón de una línea diferente, y transferidos a una hembra pseudopreñada, es decir, en un estado hormonal que simula al de la preñez. De este procedimiento se obtiene una camada heterocigota conocida como quimera. Al cruzar esta población entre sí, se obtienen las líneas homocigotas y silvestres (Figura 3).

Esta tecnología ha sido de gran ayuda para entender el papel que juegan las enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos en la modulación de los efectos tóxicos inducidos por agentes químicos. Ambos tipos de ratones, el transgénico y el deficiente, han sido desarrollados por diferentes grupos de investigación. La presente revisión se enfoca en los hallazgos más relevantes de la participación de los citocromos P450 en la toxicidad inducida por agentes químicos, la carcinogénesis y su papel en la homeostasis celular a través del uso de estos modelos biológicos.



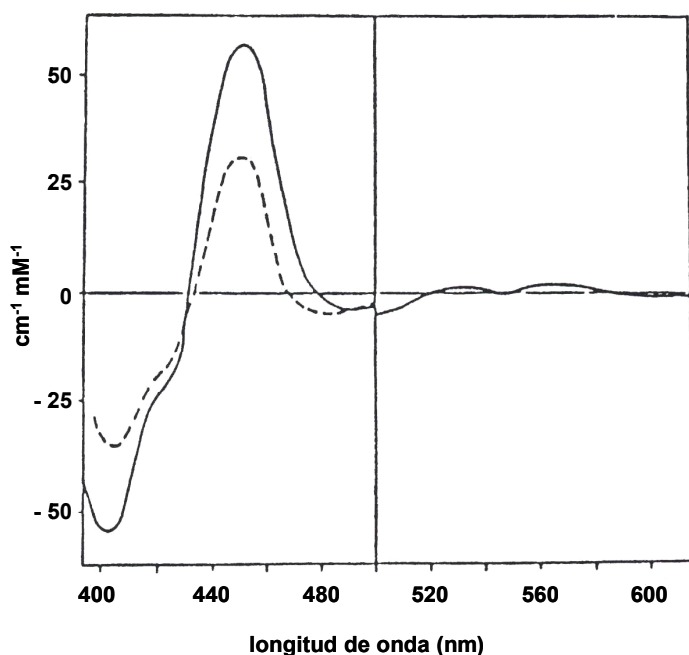
**Figura 3.** Desarrollo de un ratón deficiente. A) Células embrionarias pluripotenciales (ES) con recombinaciones homólogas se inyectan en un blastocito proveniente de una línea de ratón cuyo pelaje sea de color diferente al de los ratones de donde provienen las células ES. B) El blastocito se transfiere al útero de una hembra receptora donde completa su desarrollo. C) La generación F1 está conformada por quimeras, las cuales son hemicigotas para el gen inactivado. D) Las quimeras son cruzadas entre sí para generar líneas homocigotas del gen inactivado (ratón blanco) y de la forma silvestre (ratón negro).

## 2. Citocromo P450

Han pasado 46 años desde que Garfinkle (2) y Klingerberg (3) reportaron por primera vez la existencia de un citocromo con características inusuales, y al que posteriormente se denominó citocromo P450 (CYP450) debido a que presenta un pico máximo de absorción a 450 nm en el espectro UV provocado por la formación de un aducto con monóxido de Carbono (CO) (4) (Figura 4). Durante estos casi 50 años mucho se ha aprendido, a través de numerosas disciplinas, sobre esta superfamilia de enzimas.

El CYP450 está presente en eucariontes, en la mayoría de las eubacterias y en algunas arqueobacterias y a la fecha se han identificado más de 1,200 isoformas (5). Esta gran diversidad sólo puede ser entendida desde una perspectiva evolutiva. Debido a que el CYP450 está presente en algunas especies de bacterias termófilas, se estima que esta superfamilia de enzimas se originó hace 3,500 millones de años (6).

La clasificación de los CYP450 se rige por su identidad en la secuencia de aminoácidos, de tal manera que si esta es mayor al 55 % pertenecen a la misma subfamilia y si se encuentra entre 45 y 55 %, a la misma familia. La notación que se sigue para determinar a estas enzimas es el prefijo CYP, seguido de un número arábigo para señalar a la familia, una letra que indica a la subfamilia y un número arábigo para denotar a la isoforma (7).



**Figura 4.** Espectro diferencial del complejo formado entre monóxido de Carbono (CO) y el citocromo P450. Microsomas de hígado de rata fueron gasificados con CO y tratados con NADPH (línea punteada) o ditionita de sodio (línea continua). Modificado de la referencia 3.

Actualmente se conocen, en humanos, 18 familias y 42 subfamilias de CYP450 (Tabla 1), la mayoría de ellas localizadas en el retículo endoplásmico liso del hepatocito, aunque existen isoformas extrahépatas en numerosos tejidos como en el intestino, riñón, cerebro, linfocitos, etc. En esencia, la reacción que cataliza el sistema de citocromos P450 es la transferencia de un átomo de Oxígeno al sustrato produciendo una molécula de agua y un metabolito oxigenado, dándole un carácter más polar y promoviendo su conjugación con diversos grupos funcionales lo que incrementa su excreción al incrementar la hidrofiliidad.

Este sistema metabólico en donde participan estas enzimas ha sido estudiado desde la perspectiva de diversas disciplinas. Debido a su participación en la desactivación o activación de numerosos xenobióticos como lo son contaminantes ambientales, medicamentos o aditivos presentes en los alimentos, el estudio de los CYP450 tiene un interés particular para la Toxicología y la Farmacología. A continuación se describen diversos modelos de ratones modificados genéticamente utilizados para entender la regulación y participación de los CYP450 en procesos tóxicos y carcinogénicos.

**Tabla 1.** Familias de CYP450 en humanos y sus funciones.

| <b>FAMILIA</b> | <b>SUBFAMILIAS</b> | <b>FUNCIÓN</b>                           |
|----------------|--------------------|------------------------------------------|
| CYP1           | 3                  | Metabolismo de xenobióticos              |
| CYP2           | 13                 | Metabolismo de esteroides y xenobióticos |
| CYP3           | 1                  | Metabolismo de xenobióticos              |
| CYP4           | 5                  | Metabolismo del ácido araquidónico       |
| CYP5           | 1                  | Sintetasa del Tromboxano A2              |
| CYP7           | 2                  | Biosíntesis de ácidos biliares           |
| CYP8           | 2                  | Biosíntesis de ácidos biliares           |
| CYP11          | 1                  | Biosíntesis de esteroides                |
| CYP17          | 1                  | Biosíntesis de esteroides                |
| CYP19          | 1                  | Biosíntesis de esteroides                |
| CYP20          | 1                  | ?                                        |
| CYP21          | 1                  | Biosíntesis de esteroides                |
| CYP24          | 1                  | Catabolismo de la vitamina D             |
| CYP26          | 3                  | Metabolismo del ácido retinóico          |
| CYP27          | 3                  | Metabolismo de la vitamina D             |
| CYP39          | 1                  | Metabolismo del colesterol               |
| CYP46          | 1                  | Metabolismo del colesterol               |
| CYP51          | 1                  | Metabolismo del colesterol               |

Modificado de <http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>

### 3. Modelos deficientes.

#### 3.1 Receptores para xenobióticos

##### 3.1.1. Receptor para Arilo Hidrocarburos

El receptor para arilo hidrocarburos (AHR) es un factor de transcripción citoplásmico perteneciente a la familia de proteínas denominada bHLH (del inglés "basic helix loop helix"). Es activado por la unión a su ligando lo que permite su internalización al núcleo celular donde forma un heterodímero con el translocador nuclear del AHR (ARNT). El complejo ligando-AHR-ARNT activa la transcripción de genes que codifican para enzimas que metabolizan xenobióticos como son los CYP450 (CYP1A1, 1A2 y 1B1), la NADPH-quinona oxidorreductasa y la UDP-glucuronosil transferasa (Ugt\*06).

El AHR fue caracterizado, inicialmente, debido a que media la mayoría de los efectos tóxicos provocados por los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAH) como son las dibenzo-*p*-dioxinas policlorinadas, dibenzofuranos policlorinados y bifenilos policlorinados, todos ellos contaminantes ambientales.

El ratón deficiente para el gen que codifica para el AHR fue desarrollado por Fernández-Salguero y colaboradores (8). La inactivación del AHR provocó un incremento significativo en la muerte de ratones durante la etapa perinatal, por causas aún indeterminadas. La inducción de varias enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos como el CYP1A1 por exposición a dioxinas se perdió en este modelo, demostrándose con ello que la expresión de dichas proteínas está mediada por el AHR. También se determinó, mediante el uso de este modelo, que la expresión basal del CYP1A2 y la Ugt\*06 está controlada por el AHR.

Además de estos resultados, se observó que el ratón deficiente en la expresión del AHR presentaba fibrosis hepática, así como un hígado de tamaño y peso reducidos en comparación con el ratón silvestre, sugiriendo que el AHR además juega un papel en la homeostasis celular. Diversas investigaciones derivadas de estas observaciones demostraron que la expresión del CYP2C39, el cual inactiva al ácido retinóico (AR) al hidroxilarlo, está disminuida, indicando su dependencia transcripcional en la funcionalidad y presencia del AHR (9, 10, 11). Debido a lo anterior, estos roedores presentan hasta tres veces más AR en el hígado que los ratones silvestres. La acumulación del AR induce la activación del Factor Transformante de Crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) acumulación resulta en fibrosis hepática (12).

Aunado a lo anterior, se ha observado que la estimulación del AHR con 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) induce un arresto celular en la fase G1 (13), así como una proliferación celular más lenta en células derivadas de hepatoma de ratón, deficientes en AHR (14). Otros estudios han demostrado que la proteína supresora de cáncer asociada al tumor conocido como retinoblastoma (pRb) se une al AHR (15). Estos datos sugieren una asociación del AHR con la regulación del ciclo celular. Dicha posibilidad se ha reforzado con estudios llevados a cabo con el ratón deficiente en AHR, de donde fue posible determinar que la ausencia de este receptor resulta en una disminución de las cinasas Cdc2 y Plk, necesarias para el transcurrir de las fases G2 y M del ciclo celular (16). Así mismo, mediante el uso de este modelo, se observó que p300, un cofactor de diversos factores de transcripción como AP1, interactúa con el AHR (17). Estos resultados son muy importantes dado que cualquier xenobiótico con la capacidad de activar al AHR, podrá modificar los procesos celulares anteriormente descritos.

### 3.1.2. Receptor X para Pregnenolona

El receptor X para Pregnenolona (PXR) es miembro de la superfamilia de los receptores nucleares y media la inducción transcripcional de citocromos P450 pertenecientes a la subfamilia CYP3A. Este receptor fue identificado mediante el uso del compuesto sintético Pregnenolona 16- $\alpha$  carbonitrilo (PCN) (18), el cual actúa como ligando induciendo su actividad transcripcional. Posteriormente, se observó que la Dexametasona y otros xenobióticos lipofílicos también actúan a través del PXR. Al igual que el receptor para ácido retinóico, el PXR requiere de formar un heterodímero con el receptor para retinoides (RXR) para así poder activar a los genes en cuyos promotores se encuentran los elementos específicos para dicho receptor. Inicialmente fue descrito en ratón y su contraparte humana es el receptor X para esteroides (SXR) (19).

El desarrollo de un ratón deficiente en PXR permitió identificar los ligandos endógenos de este factor de transcripción, así como su papel en procesos de activación y desintoxicación de diversos compuestos. El ratón deficiente en el PXR es viable y presenta un fenotipo aparentemente normal (20, 21). Estos datos indican que el PXR no es un factor de transcripción esencial para el desarrollo embrionario o la homeostasis fisiológica y que probablemente su función esté acotada a la inducción de enzimas biotransformadoras como los CYP450 en respuesta a hormonas y algunos xenobióticos. Sin embargo, como era de esperarse, no



responde a la inducción transcripcional del CYP3A11 provocada por la exposición a Dexametasona o PCN.

La colestasis es una enfermedad en la que se observa una reducción en la eliminación de la bilis, lo que resulta en una disminución en la absorción de lípidos y vitaminas liposolubles. En casos severos, se observa un daño irreversible al hígado por la acumulación de toxinas que normalmente se excretan en la bilis. En los individuos que presentan esta enfermedad se han encontrado niveles elevados de ácido litocólico (LCA), un ácido biliar que induce colestasis en roedores. Desde hace más de 40 años este padecimiento ha sido tratado con esteroides como el PCN, lo que sugiere que genes regulados por el PXR, como los pertenecientes a la subfamilia CYP3A, pudieran biotransformar e inactivar a los ácidos biliares, como el LCA, a compuestos menos tóxicos como una respuesta a la acumulación de los mismos.

El ratón silvestre tratado con LCA presenta una inducción en los niveles transcripcionales del CYP3A11, lo que no se observó en el ratón deficiente en el PXR. Ambos ratones presentaron daño hepático, siendo este más severo en el ratón deficiente en el PXR. El tratamiento con PCN sólo revirtió el daño hepático en el ratón silvestre (20, 21). Estos experimentos establecen que los ligandos endógenos del PXR son ácidos biliares y que este receptor actúa como un sensor de los niveles de dichos compuestos tóxicos, promoviendo su eliminación a través de la inducción de enzimas biotransformadoras como los CYP3A.

### 3.1.3. Receptor Constitutivo para Androstano

Inicialmente, el Receptor Constitutivo para Androstano (CAR) fue descrito por su capacidad de unirse a los elementos de respuesta para el receptor RXR en ausencia de un ligando. El CAR es un factor citoplásmico cuya translocación nuclear es independiente de ligandos. El mecanismo por el cual CAR se internaliza al núcleo no está bien entendido, sin embargo se sabe que xenobióticos como el Fenobarbital desencadenan este proceso, provocando la inducción de la transcripción de genes que codifican para CYP450 pertenecientes a la subfamilia CYP2B (22). El ratón deficiente en CAR es viable y se desarrolla normalmente. Como era de esperarse, no responde a los efectos provocados por el Fenobarbital (23). A continuación se describen algunos ejemplos de la participación de CAR en procesos tóxicos, descubiertos a través del uso de este modelo.

Se ha reportado que el pesticida 1,4 bis-[2-(3,5-dicloropiridiloxi)] benceno (TCPOBOP), provoca un incremento en la masa total del hígado a través de sus efectos mitogénicos y posteriormente una severa hipertrofia (24). Estudios *in vitro* señalan que este compuesto es activado por citocromos P450 pertenecientes a la subfamilia CYP2B, sugiriendo una posible participación de CAR. A diferencia del ratón silvestre, el ratón deficiente en CAR no presenta hepatomegalia cuando es tratado con TCPOBOP (23), demostrándose con ello que CAR media los efectos tóxicos de este pesticida. También se demostró, con este modelo transgénico, que la inactivación del relajante muscular Zoxazolamina está mediado por CAR, ya que los ratones deficientes en este receptor, tratados con Zoxazolamina permanecen paralizados por mucho más tiempo respecto a los ratones silvestres (23).

Recientemente Saini y colaboradores (25) descubrieron que CAR también participa en procesos de desintoxicación provocados por ácidos biliares. Estos autores demostraron que el ratón transgénico con sobreexpresión de CAR es más resistente a los efectos tóxicos provocados por LCA debido a que este receptor incrementa la inducción de la sulfotransferasa la cual inactiva al LCA.



### 3.2. CYP450

#### 3.2.1. CYP1A2

El CYP1A2 se expresa principalmente en el hígado y es inducido transcripcionalmente por ligandos del AHR. El CYP1A2 participa en la activación metabólica de diversos carcinógenos como arilaminas, aminas heterocíclicas y la aflatoxina B1 (26), así como en la oxidación de estrógenos (27). Aunque el papel del CYP1A2 en dichos procesos fue definido en modelos *in vitro* o en roedores, aún no se había definido claramente su participación en los procesos tóxicos y carcinogénicos inducidos por los xenobióticos anteriormente mencionados. Para resolver lo anterior, Pineau y colaboradores desarrollaron un ratón deficiente en la expresión del CYP1A2, cuyo principal fenotipo, además de la ausencia en la expresión de dicho CYP450, fue una disminución de proteínas surfactantes necesarias para la expansión de los pulmones lo que resultó en muerte neonatal (28). Sin embargo, el mismo modelo desarrollado por otro grupo de investigación encabezado por D.W. Nebert, no presentó este último fenotipo (29). Estas diferencias pudieran deberse a diferencias en el fondo genético, ya que se utilizaron diferentes líneas de roedores. Aún así, ambos modelos de ratón presentan alterado el metabolismo de xenobióticos.

Mediante el uso de este modelo y de estudios farmacocinéticos fue posible determinar que, en condiciones normales, el 87 % de la eliminación de la cafeína es dependiente del CYP1A2, estableciendo a esta molécula como el mejor sustrato para evaluar la actividad de este CYP450, *in vivo*, en humanos (30). Esto es importante considerando que el CYP1A2 es polimórfico y que participa en la bioactivación de diversos carcinógenos. Por otro lado, actividades enzimáticas consideradas específicas del CYP1A2 como lo es la O-demetilación de la metoxiresorufina (MROD) o la 4-hidroxilación del acetanilido (ACOH), en realidad no lo son, ya que microsomas derivados del ratón deficiente en la expresión del CYP1A2 presentan importantes niveles de actividad para la MROD y ACOH, sugiriendo que otras enzimas también llevan a cabo dichas reacciones (31).

En referencia a la participación del CYP1A2 en procesos carcinogénicos, mediante el uso de este modelo fue posible establecer que el CYP1A2 no era el principal bioactivador del 4-aminobifenilo (4-ABP). El 4-ABP es un contaminante ambiental, altamente carcinogénico que también se le encuentra en el humo del tabaco. Estudios *in vitro* indicaban que el CYP1A2 era el principal responsable de la bioactivación de dicho compuesto (32). Sin embargo, la incidencia de tumores producto de un tratamiento con 4-ABP no fue diferente entre los ratones silvestres y los ratones deficientes de CYP1A2 (33), demostrándose con ello que este CYP450 no es la única enzima involucrada en la activación del 4-ABP. Resultados similares se observaron en referencia a la participación del CYP1A2 en la desintoxicación de la Fenacetina. La Fenacetina es un analgésico que fue muy utilizado en la década de los 70 y que dejó de usarse debido a que varios estudios mostraron que este medicamento provocaba tumores renales en modelos animales (34, 35). Otros trabajos experimentales sugerían que el CYP1A2 participaba de manera importante en la desintoxicación de este compuesto (36); sin embargo, cuando se trataron ratones silvestres y deficientes en el CYP1A2 con Fenacetina no se observó un mayor efecto carcinogénico en estos animales (37). Por otro lado, los efectos tóxicos inducidos por este compuesto en hígado, riñón y bazo fueron mayores en el ratón deficiente en el CYP1A2 (38). Estos datos indican que el CYP1A2 sí juega un papel importante en la desintoxicación de la Fenacetina, pero no protege de los efectos carcinogénicos provocados por este compuesto.

La uroporfiria es una patología relacionada con siderosis hepática y con un incremento en el almacenaje de hierro. Esta enfermedad es causada, entre otras cosas, por tratamientos con hierro y ácido 5-aminolevulínico (39). Información obtenida de estudios *in vitro* sugería una asociación del CYP1A2 con esta patología (40, 41). Datos concluyentes de esta posible asociación se obtuvieron cuando se observó que el ratón deficiente en CYP1A2 no desarrolló uroporfiria al ser tratado con ácido 5-aminolevulínico, indicando que esta enzima juega un papel fundamental en el desarrollo de esta enfermedad (42).

### 3.2.2. CYP1B1

El CYP1B1 se expresa de manera constitutiva en las glándulas adrenales, ovario y testículos. También está presente en la próstata, útero y glándulas mamarias. Su expresión puede ser inducida por la adrenocorticotropina, cAMP, hormonas peptídicas y ligandos del AHR (43-46). Su importancia toxicológica radica en su capacidad de bioactivar carcinógenos como el 7, 12 -dimetil benzo[a]antraceno (DMBA) y el benzo[a]pireno (47). Contrario a lo esperado, estudios histopatológicos no mostraron anomalías en el ratón deficiente en la expresión del CYP1B1, indicando que este CYP450 no es indispensable para el desarrollo y la homeostasis celular (48). Sin embargo, fibroblastos embrionarios derivados de este modelo son más resistentes a los efectos tóxicos inducidos por DMBA que los derivados del ratón silvestre. De la misma manera, el ratón deficiente en CYP1B1 es resistente a los efectos de este carcinógeno, mientras que el ratón silvestre desarrolla linfomas malignos (48); esto último demuestra que esta enzima es esencial para la activación metabólica del DMBA. Otros estudios, mediante el uso de este modelo, han demostrado que la presencia del CYP1B1 en células de la médula ósea (49, 50) es necesaria para inducir citotoxicidad, apoptosis y transformación celular, sugiriendo que la leucemia provocada por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos pudiera estar mediada por este CYP450.

Además de su participación en la activación metabólica de carcinógenos, se ha sugerido un posible papel del CYP1B1 en la homeostasis celular debido a la asociación observada entre mutaciones autosomales recesivas del CYP1B1 y el glaucoma congénito (51). Sin embargo, en el ratón deficiente en la expresión del CYP1B1 no se ha observado algún indicio de glaucoma sugiriendo que la contribución de este CYP450 en el desarrollo de esta enfermedad es, entre otros, sólo un factor.

### 3.2.3. CYP2E1

El CYP2E1 está presente en todos los mamíferos y se expresa en varios tejidos, principalmente en el hígado (52). Es el principal CYP450 encargado del metabolismo de varios compuestos de bajo peso molecular como lo son alcoholes y solventes industriales, muchos de estos tóxicos y carcinogénicos (53). Al igual que otros modelos, el ratón deficiente en la expresión del CYP2E1 se desarrolla y reproduce normalmente (54). Este modelo fue usado, inicialmente, para evaluar el papel de esta enzima en los efectos tóxicos producidos por el N-acetil-p-aminofenol (APAP) también conocido como Acetaminofen. El APAP es un analgésico y antipirético muy utilizado que puede dar lugar, en el humano, a necrosis hepática. La principal vía de bioactivación del APAP es a través del CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A4. Para poder establecer cual de estas isoformas es la vía predominante de biotransformación del APAP, se utilizaron ratones deficientes en la expresión de CYP1A2, CYP2E1 o bien el doble deficiente CYP1A2/CYP2E1 (54, 55). Los resultados indican que los tres modelos son resistentes a los efectos tóxicos del APAP con el siguiente orden de sensibilidad: silvestre > deficiente en CYP1A2 > deficiente en CYP2E1 > doble deficiente en CYP1A2/CYP2E1.

El CYP2E1 también participa en la bioactivación del benceno. El benceno es un químico industrial y un importante contaminante ambiental cuya exposición se ha asociado con un incremento en la incidencia de anemia aplásica y leucemia (56, 57). A través de estudios de inmuno inhibición se ha determinado que el benceno ( $C_6H_6$ ) es bioactivado por el CYP2E1 a metabolitos reactivos, los cuales se piensa son los que provocan los efectos tóxicos (58). Sin embargo, no fue hasta que se utilizó el ratón deficiente en el CYP2E1 que se determinó el papel preciso de este CYP450 en el metabolismo del benceno. Estos estudios demostraron que el CYP2E1 es la principal isoforma en la biotransformación del benceno así como en la formación de los metabolitos hidroquinona, ácido mucónico y catecol (59). Además, se observó que este modelo es resistente a los efectos citotóxicos y genotóxicos producidos por el benceno en médula ósea, linfocitos y en tejidos linfáticos; indicando que dichos efectos son dependientes del CYP2E1.

Este modelo también ha sido muy útil para evaluar el papel de esta enzima en los efectos tóxicos del tetracloruro de carbono (CCL<sub>4</sub>). El CCL<sub>4</sub>, en animales, induce lipoperoxidación así como daño hepático (60). En humanos, el envenenamiento por exposición a CCL<sub>4</sub>, principalmente ocupacional, ha sido ampliamente documentado. Wong y colaboradores (61) demostraron que dichos efectos tóxicos están mediados por el CYP2E1, ya que el ratón deficiente en la expresión de esta enzima es resistente al daño provocado por la exposición a CCL<sub>4</sub>.

También se ha demostrado, a través del uso de este modelo, la participación del CYP2E1 en la bioactivación de varios compuestos tóxicos como el metacrilonitrilo, cloroformo y diversos éteres de gasolina.

Un papel fisiológico, si no esencial, relevante del CYP2E1 es su participación en el metabolismo de la acetona. La acetona se puede hallar presente en cantidades significativas en la sangre. Esta situación, conocida como cetosis, se produce cuando la velocidad de formación de los cuerpos cetónicos por el hígado es superior a la capacidad de los tejidos periféricos para utilizarlos. En la diabetes los tejidos son incapaces de utilizar la glucosa de la sangre y en consecuencia el hígado lo compensa quemando más ácidos grasos como combustible pero ello provoca una sobre producción de cuerpos cetónicos. Esta situación también se observa bajo condiciones de ayuno, y es a través de este proceso que se provee de energía a células y órganos, particularmente al cerebro.

Estudios *in vitro* muestran que la acetona es convertida por el CYP2E1 en acetol y metilglioxal, intermediarios de la gluconeogénesis (62). Esta ruta alternativa de energía se ve disminuida en los ratones deficientes en la expresión del CYP2E1, indicando que el catabolismo de la acetona es dependiente de dicha isoforma (63).

#### **4. Modelos transgénicos**

El estudio de los CYP450, a través de la experimentación *in vitro* y en modelos animales, ha sido esencial para comprender los mecanismos de toxicidad. Sin embargo, entre las especies existen diferencias importantes en la regulación, expresión y actividad de los CYP450, lo que dificulta enormemente la extrapolación del riesgo potencial de la exposición a xenobióticos en humanos. Actualmente, mediante el uso de la manipulación genética, es posible generar ratones transgénicos que expresen CYP450 humanos. Sin embargo, esta estrategia presenta un problema fundamental: la presencia de los CYP450 endógenos del ratón. Una posible solución a este problema sería la expresión de CYP450 humanos en modelos deficientes en la expresión de citocromos P450 endógenos.

Las dos estrategias utilizadas en la generación de modelos transgénicos son: 1) el control de la expresión genética a través de un promotor tejido-específico y 2) la introducción del gen con sus propios elementos regulatorios. Esto último es posible mediante el uso de bibliotecas genómicas cuyas clonas contienen hasta 1,000 kilobases.

##### **4.1. CYP1A2**

Un ejemplo del control de la expresión genética a través de un promotor tejido-específico es el ratón transgénico CYP1A2 desarrollado por Ueno y colaboradores (64). Los autores introdujeron, en el ratón, el gen humano CYP1A2 bajo el control del promotor del gen de la elastasa I de ratón. Este promotor fue elegido debido a que es activado preferencialmente en el páncreas, donde no hay expresión del CYP1A2 endógeno. De esta manera fue posible expresar el CYP1A2 humano en un tejido del ratón donde no se expresa dicho CYP450 de manera natural. El uso de microsomas pancreáticos de este modelo pueden ser muy útiles para estudiar el metabolismo de químicos mediado por el CYP1A2 humano, así como entender los

mecanismos de toxicidad y carcinogénesis, *in vivo*, dependientes de este CYP450. Si bien aún no se ha reportado el uso de este modelo para evaluar el papel del CYP1A2 en procesos tóxicos y carcinógenos, un aspecto interesante que se observó en la caracterización de este modelo transgénico, fue la capacidad del CYP1A2 humano de hidroxilar a la estrona, precursor del estradiol. También fue posible determinar que, aunque las células pancreáticas no expresan CYP450, cuentan con los elementos necesarios para la correcta funcionalidad de estas enzimas, como puede ser la NADPH-citocromo P450 óxido reductasa.

#### 4.2. CYP2D6

El CYP2D6 es el CYP450 humano más estudiado. Es altamente polimórfico pues a la fecha se han identificado hasta 75 variantes alélicas (<http://www.imm.ki.se/CYPaleles/cyp2d6.htm/>), muchas de ellas con importantes consecuencias clínicas ya que dan lugar a variaciones interindividuales en el metabolismo de numerosos medicamentos como los bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, antiarrítmicos, antidepresivos y analgésicos. Estos polimorfismos han llevado a estratificar a las poblaciones en metabolizadores lentos, intermedios, rápidos y ultrarrápidos dependiendo de la actividad catalítica de las variantes alélicas que presentan los individuos.

El uso de modelos animales es esencial para evaluar el perfil farmacocinético de un medicamento o las interacciones fármaco-fármaco. Sin embargo, estos modelos no siempre son los más adecuados. En el humano sólo existe un miembro activo de la subfamilia CYP2D, la isoforma CYP2D6; mientras que en los roedores se han observado hasta 5 miembros activos (5). Otra diferencia fundamental es que la mayoría de las líneas de ratón tienen poca o nula capacidad de biotransformar a la Debrisoquina, un sustrato altamente específico del CYP2D6 humano (65). Estas diferencias entre especies llevaron al desarrollo de un ratón modificado genéticamente para que expresara el CYP2D6 humano (66).

En este organismo no se observaron problemas reproductivos o de desarrollo. Las evaluaciones farmacocinéticas del metabolismo de la Debrisoquina en el ratón transgénico muestran una gran similitud con las reportadas para el humano. Estos resultados establecen que este modelo es funcional y de su uso podrán obtenerse importantes datos para el desarrollo de nuevos medicamentos. Recientemente, mediante el uso de este modelo transgénico, se demostró que los alcaloides psicotrópicos del tipo  $\beta$ -carbolino son inactivados por el CYP2D6 a través de una O-demetilación (67). Esta inactivación metabólica fue observada particularmente sobre la harmalina y la harmina, alcaloides que constituyen el principio activo de plantas medicinales y alucinógenas como lo son *Peganum harmala* y *Psychotria viridis*. La variabilidad individual observada en la respuesta a estos alcaloides, posiblemente, se deba a la capacidad metabólica de cada individuo determinada por los polimorfismos genéticos que presenta el CYP2D6.

#### 4.3. CYP3A4

El CYP3A4 sólo se expresa en el humano y representa más del 50% y 70 % del total de CYP450 en el hígado e intestino, respectivamente (67, 69). Además participa en el metabolismo de más del 50% de los medicamentos de uso actual (70), dentro de los que encontramos a antiarrítmicos, antidepresivos, anticonvulsivos, antibióticos, anticancerígenos, antivirales, sulfas, etc. También biotransforma esteroides como el estradiol (71) y la testosterona (72) y bioactiva carcinógenos como las aflatoxinas (67).

Por otro lado, se ha reportado una gran variabilidad interindividual en su actividad enzimática (73), lo que ha llevado a identificar polimorfismos genéticos que pudieran explicarla. Todas estas características hacen del CYP3A4 un importante tema de estudio; sin embargo, debido a que sólo se expresa en el humano, los modelos experimentales son muy limitados. Una buena alternativa fue el desarrollo de un ratón transgénico con la capacidad de expresar a esta

enzima (74). Para ello se utilizó una clona BAC (del inglés “Bacterial Artificial Chromosome”) que contenía al gen CYP3A4. El ratón se desarrolla y reproduce en forma normal, sin embargo la expresión del CYP3A4 sólo se observa en el intestino, particularmente en el duodeno y yeyunum, aunque también esta presente en el ileon. Este modelo es capaz biotransformar al Midazolam, sustrato específico del CYP3A4, a sus formas 1 y 4-hidroxiladas, demostrándose con ello su funcionalidad. A pesar de haberse utilizado una clona que contenía aproximadamente 12 kb del promotor no se observó expresión de esta enzima en el hígado. La razón de ello es aún desconocida, pero es posible que existan elementos regulatorios específicos del hígado que interactúen en regiones del promotor del gen más allá de las presentes en la clona usada. Aún así, este modelo será de gran utilidad para estudiar interacciones fármaco-fármaco, así como la modulación de la expresión génica del CYP3A4 por la exposición a xenobióticos. Actualmente, nuestro grupo de investigación ha encontrado, a través del uso de este modelo transgénico, que vitaminas como la 1 $\alpha$ -dihidroxi vitamina D modifican la expresión del CYP3A4, lo que pudiera tener consecuencias importantes en el metabolismo de hormonas y medicamentos (datos no publicados).

## 5. Conclusiones

En la presente revisión se ha descrito el potencial de los ratones modificados genéticamente para entender los mecanismos de toxicidad, así como la identificación de las enzimas que participan y median dichos procesos tóxicos. Sin embargo, es importante considerar las diferencias entre las especies respecto a la regulación génica y su respuesta a la exposición a xenobióticos, así como la superposición en la especificidad por los sustratos entre diferentes isoformas de CYP450. Encontrar soluciones a estos problemas es importante para evitar interpretaciones equivocadas. Por otro lado, es esencial no olvidar que los organismos, particularmente los mamíferos, son sistemas biológicos muy complejos que no reciben la manipulación genética de una forma pasiva y es muy posible que la introducción de DNA exógeno altere la regulación génica endógena. Debido a lo anterior, la investigación básica es fundamental para entender mejor el control de la expresión génica para generar modelos animales modificados genéticamente más precisos.

Como se aprecia en la Tabla 1, el papel fisiológico de los CYP450 predominantemente está asociado al metabolismo de hormonas, del colesterol y de vitaminas liposolubles. Sin embargo, para algunas isoformas, especialmente aquellas pertenecientes a la familia 1, sólo se han identificado sustratos exógenos, la mayoría de ellos hidrocarburos aromáticos. Difícilmente estas isoformas evolucionaron como respuesta a estos contaminantes ya que su presencia en el medio ambiente no va más allá de 150 años. Muy posiblemente, su presencia se deba a una respuesta de los mamíferos, particularmente los herbívoros, a compuestos fenólicos y flavonoides presentes en las plantas. De existir sustratos endógenos para los citocromos P450 pertenecientes a la familia 1, los modelos deficientes y transgénicos aquí descritos serán de gran utilidad para determinarlos.

Finalmente, los ratones transgénicos y deficientes han demostrado ser una herramienta muy valiosa para entender los mecanismos moleculares de la toxicidad inducida por químicos, así como la identificación de los CYP450 que participan en estos procesos.

## Referencias

1. B. Hogan, F. Constantini, E. Lacy, *Manipulating the mouse embryo.*, Cold Spring Harbor, New York, 1986.
2. D. Garfinkel (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions, *Arch Biochem Biophys* 77: 493-509.
3. M. Klingenberg (1958) Pigments of rat liver microsomes, *Arch Biochem Biophys* 75: 376-386.

4. T. Omura, R. Sato (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties, *J Biol Chem* 239: 2379-2385.
5. D. R. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus, D. W. Nebert (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
6. D. R. Nelson, H. W. Strobel (1987) Evolution of cytochrome P-450 proteins, *Mol Biol Evol* 4: 572-593.
7. D. R. Nelson, *Cytochrome P450 nomenclature and alignment of selected sequences*, Plenum, New York, 1995.
8. P. Fernandez-Salguero, T. Pineau, D. M. Hilbert, T. McPhail, S. S. Lee, S. Kimura, D. W. Nebert, S. Rudikoff, J. M. Ward, F. J. Gonzalez (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor, *Science* 268: 722-726.
9. F. Andreola, P. M. Fernandez-Salguero, M. V. Chiantore, M. P. Petkovich, F. J. Gonzalez, L. M. De Luca (1997) Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism, *Cancer Res* 57: 2835-2838.
10. F. Andreola, D. F. Calvisi, G. Elizondo, S. B. Jakowlew, J. Mariano, F. J. Gonzalez, L. M. De Luca (2004) Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion, *Hepatology* 39: 157-166.
11. F. Andreola, G. P. Hayhurst, G. Luo, S. S. Ferguson, F. J. Gonzalez, J. A. Goldstein, L. M. De Luca (2004) Mouse liver CYP2C39 is a novel retinoic acid 4-hydroxylase. Its down-regulation offers a molecular basis for liver retinoid accumulation and fibrosis in aryl hydrocarbon receptor-null mice, *J Biol Chem* 279: 3434-3438.
12. H. Zaher, P. M. Fernandez-Salguero, J. Letterio, M. S. Sheikh, A. J. Fornace, Jr., A. B. Roberts, F. J. Gonzalez (1998) The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis, *Mol Pharmacol* 54: 313-321.
13. M. Gottlicher, P. Cikryt, F. J. Wiebel (1990) Inhibition of growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 5L rat hepatoma cells is associated with the presence of Ah receptor, *Carcinogenesis* 11: 2205-2210.
14. Q. Ma, J. P. Whitlock, Jr. (1996) The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin, *Mol Cell Biol* 16: 2144-2150.
15. N. L. Ge, C. J. Elferink (1998) A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle, *J Biol Chem* 273: 22708-22713.
16. G. Elizondo, P. Fernandez-Salguero, M. S. Sheikh, G. Y. Kim, A. J. Fornace, K. S. Lee, F. J. Gonzalez (2000) Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast, *Mol Pharmacol* 57: 1056-1063.
17. M. Tohkin, M. Fukuhara, G. Elizondo, S. Tomita, F. J. Gonzalez (2000) Aryl hydrocarbon receptor is required for p300-mediated induction of DNA synthesis by adenovirus E1A, *Mol Pharmacol* 58: 845-851.
18. S. A. Kliewer, J. T. Moore, L. Wade, J. L. Staudinger, M. A. Watson, S. A. Jones, D. D. McKee, B. B. Oliver, T. M. Willson, R. H. Zetterstrom, T. Perlmann, J. M. Lehmann (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway, *Cell* 92: 73-82.
19. B. Blumberg, W. Sabbagh, Jr., H. Juguilon, J. Bolado, Jr., C. M. van Meter, E. S. Ong, R. M. Evans (1998) SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor, *Genes Dev* 12: 3195-3205.
20. W. Xie, A. Radominska-Pandya, Y. Shi, C. M. Simon, M. C. Nelson, E. S. Ong, D. J. Waxman, R. M. Evans (2001) An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3375-3380.
21. J. L. Staudinger, B. Goodwin, S. A. Jones, D. Hawkins-Brown, K. I. MacKenzie, A. LaTour, Y. Liu, C. D. Klaassen, K. K. Brown, J. Reinhard, T. M. Willson, B. H. Koller, S. A. Kliewer (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3369-3374.
22. D. J. Waxman (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR, *Arch Biochem Biophys* 369: 11-23.
23. P. Wei, J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang, D. D. Moore (2000) The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism, *Nature* 407: 920-923.
24. A. Poland, I. Mak, E. Glover, R. J. Boatman, F. H. Ebetino, A. S. Kende (1980) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity, *Mol Pharmacol* 18: 571-580.
25. S. P. Saini, J. Sonoda, L. Xu, D. Toma, H. Uppal, Y. Mu, S. Ren, D. D. Moore, R. M. Evans, W. Xie (2004) A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification, *Mol Pharmacol* 65: 292-300.
26. F. P. Guengerich (1993) The 1992 Bernard B. Brodie Award Lecture. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals, *Drug Metab Dispos* 21: 1-6.

27. T. Aoyama, K. Korzekwa, K. Nagata, J. Gillette, H. V. Gelboin, F. J. Gonzalez (1990) Estradiol metabolism by complementary deoxyribonucleic acid-expressed human cytochrome P450s, *Endocrinology* 126: 3101-3106.
28. T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, S. S. Lee, T. McPhail, J. M. Ward, F. J. Gonzalez (1995) Neonatal lethality associated with respiratory distress in mice lacking cytochrome P450 1A2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5134-5138.
29. H. C. Liang, H. Li, R. A. McKinnon, J. J. Duffy, S. S. Potter, A. Puga, D. W. Nebert (1996) Cyp1a2(-/-) null mutant mice develop normally but show deficient drug metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1671-1676.
30. J. T. Buters, B. K. Tang, T. Pineau, H. V. Gelboin, S. Kimura, F. J. Gonzalez (1996) Role of CYP1A2 in caffeine pharmacokinetics and metabolism: studies using mice deficient in CYP1A2, *Pharmacogenetics* 6: 291-296.
31. J. T. Hamm, D. G. Ross, V. M. Richardson, J. J. Diliberto, L. S. Birnbaum (1998) Methoxyresorufin: an inappropriate substrate for CYP1A2 in the mouse, *Biochem Pharmacol* 56: 1657-1660.
32. D. L. Eaton, E. P. Gallagher, T. K. Bammler, K. L. Kunze (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity, *Pharmacogenetics* 5: 259-274.
33. S. Kimura, M. Kawabe, J. M. Ward, H. Morishima, F. F. Kadlubar, G. J. Hammons, P. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez (1999) CYP1A2 is not the primary enzyme responsible for 4-aminobiphenyl-induced hepatocarcinogenesis in mice, *Carcinogenesis* 20: 1825-1830.
34. S. L. Johansson (1981) Carcinogenicity of analgesics: long-term treatment of Sprague-Dawley rats with phenacetin, phenazone, caffeine and paracetamol (acetamidophen), *Int J Cancer* 27: 521-529.
35. K. Nakanishi, Y. Kurata, M. Oshima, S. Fukushima, N. Ito (1982) Carcinogenicity of phenacetin: long-term feeding study in B6c3f1 mice, *Int J Cancer* 29: 439-444.
36. D. Sesardic, K. J. Cole, R. J. Edwards, D. S. Davies, P. E. Thomas, W. Levin, A. R. Boobis (1990) The inducibility and catalytic activity of cytochromes P450c (P450IA1) and P450d (P450IA2) in rat tissues, *Biochem Pharmacol* 39: 499-506.
37. J. M. Peters, H. Morishima, J. M. Ward, C. J. Coakley, S. Kimura, F. J. Gonzalez (1999) Role of CYP1A2 in the toxicity of long-term phenacetin feeding in mice, *Toxicol Sci* 50: 82-89.
38. J. M. Peters, M. G. Narotsky, G. Elizondo, P. M. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez, B. D. Abbott (1999) Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice, *Toxicol Sci* 47: 86-92.
39. D. Constantin, J. E. Francis, R. A. Akhtar, B. Clothier, A. G. Smith (1996) Uroporphyrin induced by 5-aminolaevulinic acid alone in AhR SWR mice, *Biochem Pharmacol* 52: 1407-1413.
40. P. Sinclair, R. Lambrecht, J. Sinclair (1987) Evidence for cytochrome P450-mediated oxidation of uroporphyrinogen by cell-free liver extracts from chick embryos treated with 3-methylcholanthrene, *Biochem Biophys Res Commun* 146: 1324-1329.
41. F. De Matteis, C. Harvey, C. Reed, R. Hempenius (1988) Increased oxidation of uroporphyrinogen by an inducible liver microsomal system. Possible relevance to drug-induced uroporphyrin, *Biochem J* 250: 161-169.
42. P. R. Sinclair, N. Gorman, T. Dalton, H. S. Walton, W. J. Bement, J. F. Sinclair, A. G. Smith, D. W. Nebert (1998) Uroporphyrin produced in mice by iron and 5-aminolaevulinic acid does not occur in Cyp1a2(-/-) null mutant mice, *Biochem J* 330 ( Pt 1): 149-153.
43. S. Otto, C. Marcus, C. Pidgeon, C. Jefcoate (1991) A novel adrenocorticotropin-inducible cytochrome P450 from rat adrenal microsomes catalyzes polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism, *Endocrinology* 129: 970-982.
44. T. R. Sutter, Y. M. Tang, C. L. Hayes, Y. Y. Wo, E. W. Jabs, X. Li, H. Yin, C. W. Cody, W. F. Greenlee (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2, *J Biol Chem* 269: 13092-13099.
45. P. B. Brake, C. R. Jefcoate (1995) Regulation of cytochrome P4501B1 in cultured rat adrenocortical cells by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Endocrinology* 136: 5034-5041.
46. S. Otto, K. K. Bhattacharyya, C. R. Jefcoate (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in rat adrenal, ovary, and testis microsomes is catalyzed by the same novel cytochrome P450 (P450RAP), *Endocrinology* 131: 3067-3076.
47. C. L. Crespi, B. W. Penman, D. T. Steimel, T. Smith, C. S. Yang, T. R. Sutter (1997) Development of a human lymphoblastoid cell line constitutively expressing human CYP1B1 cDNA: substrate specificity with model substrates and promutagens, *Mutagenesis* 12: 83-89.
48. J. T. Buters, S. Sakai, T. Richter, T. Pineau, D. L. Alexander, U. Savas, J. Doehmer, J. M. Ward, C. R. Jefcoate, F. J. Gonzalez (1999) Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1977-1982.

49. S. M. Heidel, K. Holston, J. T. Buters, F. J. Gonzalez, C. R. Jefcoate, C. J. Czuprynski (1999) Bone marrow stromal cell cytochrome P4501B1 is required for pre-B cell apoptosis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Mol Pharmacol* 56: 1317-1323.
50. S. M. Heidel, P. S. MacWilliams, W. M. Baird, W. M. Dashwood, J. T. Buters, F. J. Gonzalez, M. C. Larsen, C. J. Czuprynski, C. R. Jefcoate (2000) Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Cancer Res* 60: 3454-3460.
51. I. Stoilov, A. N. Akarsu, M. Sarfarazi (1997) Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21, *Hum Mol Genet* 6: 641-647.
52. D. R. Koop (1992) Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1, *Faseb J* 6: 724-730.
53. M. Coon, Oxidative damage and repair, in: R. ES., A. Vaz '(Ed.)'(Eds.), Chemical, Biological and Medical Aspects, Pergamon, New York, 1997.
54. S. S. Lee, J. T. Buters, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez (1996) Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen, *J Biol Chem* 271:12063-12067.
55. H. Zaher, J. T. Buters, J. M. Ward, M. K. Bruno, A. M. Lucas, S. T. Stern, S. D. Cohen, F. J. Gonzalez (1998) Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice, *Toxicol Appl Pharmacol* 152: 193-199.
56. M. Aksoy, S. Erdem (1978) Followup study on the mortality and the development of leukemia in 44 pancytopenic patients with chronic exposure to benzene, *Blood* 52: 285-292.
57. P. F. Infante, R. A. Rinsky, J. K. Wagoner, R. J. Young (1977) Leukaemia in benzene workers, *Lancet* 2: 76-78.
58. D. R. Koop, C. L. Laethem, G. G. Schnier (1989) Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a (P450IIE1) as a benzene and phenol hydroxylase, *Toxicol Appl Pharmacol* 98: 278-288.
59. J. L. Valentine, S. S. Lee, M. J. Seaton, B. Asgharian, G. Farris, J. C. Corton, F. J. Gonzalez, M. A. Medinsky (1996) Reduction of benzene metabolism and toxicity in mice that lack CYP2E1 expression, *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 205-213.
60. R. O. Recknagel, E. A. Glende, Jr., J. A. Dolak, R. L. Waller (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, *Pharmacol Ther* 43: 139-154.
61. F. W. Wong, W. Y. Chan, S. S. Lee (1998) Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression, *Toxicol Appl Pharmacol* 153: 109-118.
62. J. P. Casazza, M. E. Felver, R. L. Veech (1984) The metabolism of acetone in rat, *J Biol Chem* 259: 231-236.
63. F. Y. Bondoc, Z. Bao, W. Y. Hu, F. J. Gonzalez, Y. Wang, C. S. Yang, J. Y. Hong (1999) Acetone catabolism by cytochrome P450 2E1: studies with CYP2E1-null mice, *Biochem Pharmacol* 58: 461-463.
64. T. Ueno, S. Tamura, W. I. Frels, M. Shou, F. J. Gonzalez, S. Kimura (2000) A transgenic mouse expressing human CYP1A2 in the pancreas, *Biochem Pharmacol* 60: 857-863.
65. Y. Masubuchi, T. Iwasa, S. Hosokawa, T. Suzuki, T. Horie, S. Imaoka, Y. Funae, S. Narimatsu (1997) Selective deficiency of debrisoquine 4-hydroxylase activity in mouse liver microsomes, *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1435-1441.
66. J. Corchero, C. P. Granvil, T. E. Akiyama, G. P. Hayhurst, S. Pimprale, L. Feigenbaum, J. R. Idle, F. J. Gonzalez (2001) The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse, *Mol Pharmacol* 60: 1260-1267.
67. T. Shimada, F. P. Guengerich, Evidence for cytochrome P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 462-465.
68. A.M. Yu, J.R. Idle, K.W. Krausz, A. Kupfer, F.J. Gonzalez. Contribution of individual cytochrome P450 isozymes to the O-demethylation of the psychotropic beta-carboline alkaloids harmaline and harmine. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 315-322
69. J. C. Kolars, P. Schmiedlin-Ren, J. D. Schuetz, C. Fang, P. B. Watkins, Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes, *J Clin Invest* 90 (1992) 1871-1878.
70. P. Maurel, CYP3A4, in: C. Ioannides '(Ed.)'(Eds.), Cytochrome P450. Metabolic and toxicological aspects, CRC Press, New York, 1998, p.^pp.
71. H. Yamazaki, P. M. Shaw, F. P. Guengerich, T. Shimada, Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes, *Chem Res Toxicol* 11 (1998) 659-665.
72. H. Yamazaki, M. Nakano, Y. Imai, Y. F. Ueng, F. P. Guengerich, T. Shimada, Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes, *Arch Biochem Biophys* 325 (1996) 174-182.
73. K. S. Lown, K. E. Thummel, P. E. Benedict, D. D. Shen, D. K. Turgeon, S. Berent, P. B. Watkins, The erythromycin breath test predicts the clearance of midazolam, *Clin Pharmacol Ther* 57 (1995) 16-24.



74. C. P. Granvil, A. M. Yu, G. Elizondo, T. E. Akiyama, C. Cheung, L. Feigenbaum, K. W. Krausz, F. J. Gonzalez, Expression of the Human CYP3A4 Gene in the Small Intestine of Transgenic Mice: In Vitro Metabolism and Pharmacokinetics of Midazolam, Drug Metab Dispos 31 (2003) 548-558.

## USO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD Y REGULACIÓN DEL CYP450. APLICACIONES EN FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA.

### Resumen

*Con la revolución industrial vino un aumento exponencial de agentes químicos nuevos. Desde entonces, millares de compuestos se han lanzado al ambiente de muchas maneras con un impacto importante sobre la salud humana. Entender el mecanismo por el cual los xenobióticos inducen toxicidad es crucial para prevenir peligros potenciales para la salud. Sin embargo, el complejo mecanismo de acción de las toxinas químicas ha hecho extremadamente difícil de evaluar el mecanismo tóxico exacto así como el papel de genes específicos en la potenciación o el mejoramiento del efecto tóxico. Entre diversas estrategias, el problema se puede tratar con animales diseñados genéticamente en los cuales los genes se han manipulado para estudiar sus papeles en la toxicidad química. El citocromo P450s tiene un papel importante en la activación metabólica y desintoxicación de xenobióticos a través de metabolismo oxidativo. Durante los últimos 10 años, varias líneas de ratones transgénicos P450 se han producido para tratar el papel de P450s en la carcinogénesis y toxicidad. El uso de modelos transgénicos ha demostrado tener enorme valor y debe conducir a una comprensión de los riesgos potenciales asociados a la exposición a xenobióticos.*

**Palabras clave:** xenobioticos; citocromos P450; toxicidad; modelos transgénicos; toxicidad de xenobioticos; metabolismo de xenobioticos

### Semblanza del Dr. Guillermo Elizondo Azuela.



Nació el 20 de noviembre de 1964 en México DF. Realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde obtuvo el grado de Biólogo en 1989; En Marzo de 1994 se graduó en la Maestría en Farmacología en el CINVESTAV-IPN. Posteriormente concluyó sus estudios de Doctorado en Ciencias Fisiológicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en 1996, a partir de entonces y hasta 1999, realizó una estancia posdoctoral en el Laboratory of Metabolism, del National Cancer Institute. National Institutes of Health, EUA. Actualmente es investigador del CINVESTAV de la Sección Externa de Toxicología. Su trabajo científico ha sido publicado en 15 artículos internacionales. Ha impartido 8 cursos de posgrado y ha sido tutor de 4 alumnos de posgrado y licenciatura. Es Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## ALTERNATIVAS DIDÁCTICAS PARA LA ENSEÑANZA: LA “GUÍA INTERACTIVA DE QUÍMICA”

F. BASURTO VÁZQUEZ

Coordinador de la Maestría en Química Orgánica.

M. AGUILAR TAMAYO

Coordinador de Información de la Secretaría Académica

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México

### DIDACTIC ALTERNATIVE FOR THEACHING: AN INTERACTIVE GUIDE OF CHEMISTRY

#### Abstract.

*The "Interactive Guide of Chemistry" (GIQ) is an oriented educative material for medium and superior level of education. It may be use for the students and professors as a Chemistry guide. This proposal of educative hypermedia is supported in the software of Microsoft PowerPoint, the reason to use a platform of this kind, and not the usual author multimedia tool, responds to the interest for showing a hypermedia developed with a tool common and available for teachers and students which is compatible with equipment of diverse computer platforms. This development is proposed like an invitation for students and teachers to participate actively in the production of contents, creative activity that if it occurs in a defined curricular context, it would be of high formative value.*

**Keywords:** chemistry; interactive guide; PowerPoint; hypermedia; hypertext

#### Introducción

Se presenta la “Guía Interactiva de Química” (GIQ) [1] que es un material educativo orientado a la educación media superior y superior. Sus usos pueden ser, para los alumnos, una guía para el estudio y puede funcionar también como un recurso de información. Para el profesor, la GIQ puede servir como un recurso didáctico. Esta propuesta de hipermedia educativo se encuentra soportada en el software de *Microsoft PowerPoint*, la razón para utilizar

una plataforma de este tipo, y no herramientas de autoría multimedia, responde a dos intereses, por un lado el mostrar un hipermedia desarrollado con una herramienta común y disponible para maestros y alumnos en el contexto de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y por otro lado, propiciar que la versión fuera lo más compatible con equipo de cómputo diverso y con ello ampliar las opciones de acceso al hipermedia. Este desarrollo se presenta como una invitación a alumnos y maestros para participar activamente en la producción de contenidos, actividad creativa que si se da en un contexto curricular definido, sin duda sería de alto valor formativo.

### **1. El uso de lo que se tiene, Microsoft PowerPoint**

La "Guía Interactiva de Química" (GIQ) es un programa educativo desarrollado en *Microsoft PowerPoint*, la determinación de utilizar esta plataforma responde a distintas consideraciones, entre ellas puede mencionarse:

- a) Es una herramienta familiar a gran parte de alumnos y maestros.
- b) La mayoría del equipo de la universidad cuenta con licencias de la aplicación.
- c) Los archivos generados son compatibles para sistemas operativos *Windows* y *Macintosh*.
- d) No requiere de conocimiento de lenguajes de programación.
- e) Si se utilizan los recursos propios de animación, los archivos generados son de un tamaño pequeño y fácilmente distribuibles.
- f) Los recursos de animación son versátiles para construir representaciones y metáforas visuales de gran variedad de contenidos.

Debe mencionarse que el diseño de la guía se separa de lo que comúnmente se entiende por una *presentación*, pues el diseño de la GIQ permite la navegación hipertextual mediante vínculos a índices, ejemplos o a temas relacionados, además de ellos se incluyen secuencias animadas que ilustran y explican temas experimentos y procesos. Es por ello que consideramos que la GIQ puede comprenderse, considerando su funcionalidad y objetivo como un *hipermedia educativo* [2] y no una presentación descriptiva de contenidos.

En presentaciones realizadas en las que se ha dado a conocer la GIQ, tanto maestro como alumnos se han mostrado interesados y sorprendidos, como un dato que permite comprobar este interés son los más de 120 GIQ distribuidas a petición directa y explícita de estudiantes y maestros. Por el momento no podemos dar datos de una evaluación más precisa acerca de los usos y utilidad encontradas por los usuarios.

El desarrollo de la GIQ en *Microsoft PowerPoint* facilita aspectos de distribución e instalación, sin embargo es posible reconocer limitantes en el formato, entre ellas pueden mencionarse por ejemplo: la modificabilidad de los contenidos y estructura. En algunos otros casos una navegación hipertextual puede ocasionar que sean abiertas muchas ventanas de manera simultánea y que en algún momento pueden provocar un error de funcionamiento. Evidentemente existen otras limitantes y diferencias con respecto a las posibilidades que brindan los programas de autoría multimedia que en el espacio de este documento no serán abordadas, sin embargo puede decirse que el funcionamiento y operación de la GIQ es suficiente estable en la mayoría de los casos.

### **2. La Guía Interactiva de Química (GIQ) en el contexto del bachillerato y la educación superior**

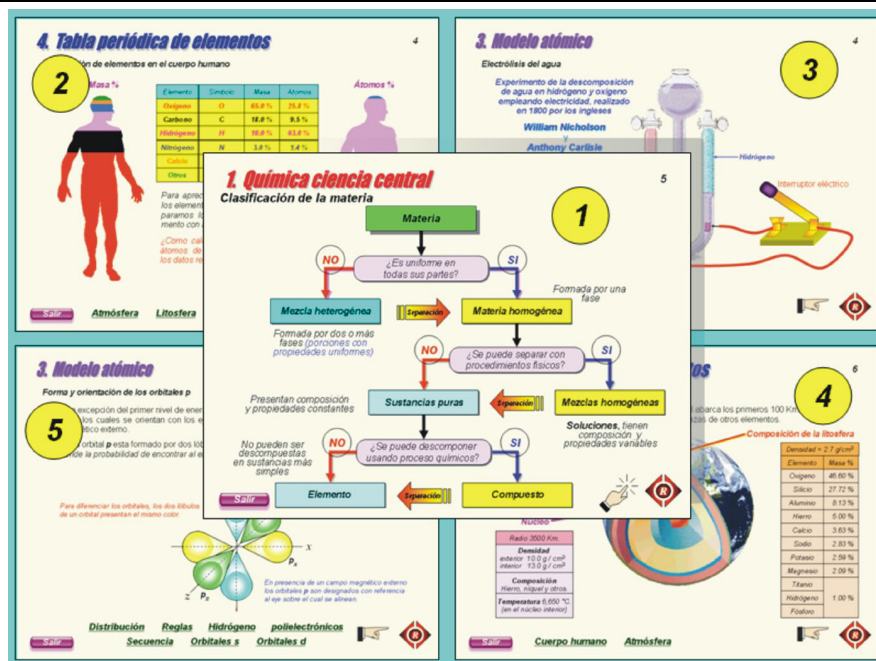
En cuanto a los contenidos de la GIQ, ésta presenta una organización y estructura temática similar a un libro de texto de química general para nivel medio superior, obviamente

existen diferencias en propias de una *guía* [3] con respecto a un *texto*. Para los fines de este documento nos referiremos a las diferencias que consideramos significativas con respecto al tratamiento de los contenidos entre los libros de texto y esta guía:

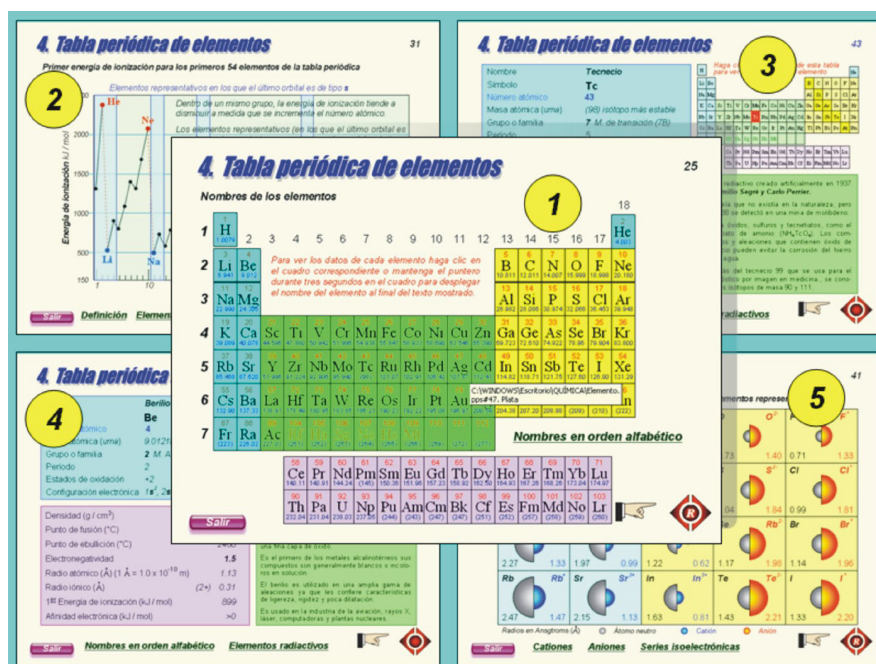
- La organización de los contenidos. La existencia de ligas a temas relacionados y a índices temáticos permiten un acceso directo lo cual puede beneficiar a lectores con más conocimiento sobre el tema.
- La presentación y desarrollo de los temas se centra más en ofrecer ejemplos, procesos y explicaciones complementarias a los temas generales de química, en ese sentido no es un *texto* sino una *guía* para el estudio de la química.
- Algunos temas y ejemplos se pueden utilizar en el contexto del salón de clases, la GIQ puede servir entonces como recurso didáctico para apoyar la exposición del profesor.
- No es vano considerar el aspecto “novedoso” de la guía, pues resulta en algunos casos un factor motivacional que facilitaría los aprendizajes de los alumnos [4]. La presentación y desarrollo de contenidos se presenta apoyada en la mayoría de los casos por esquemas y animaciones, proporcionando metáforas y ayudas visuales que ayudan a entender clasificaciones, procesos y a la jerarquización de conceptos.



**Figura 1.** Muestra ejemplos de las pantallas: (1) portada de la guía o pantalla de inicio (*Home*), (2) Índice de unidades (3) Índice de temas de la primera unidad, (4 y 5) vista ampliada de (3) mostrando el cuadro de controles de navegación (4) donde el botón central conduce al índice más próximo y los botones laterales permiten al usuario retroceder o avanzar a la siguiente pantalla, (5) textos con hipervínculos a las secciones principales de la Guía Interactiva.



**Figura 2.** Presentación de 5 ejemplos de las pantallas secundarias de la Guía con diversos esquemas, (1) Diagrama que muestra la información en una secuencia estructurada, destacando las relaciones con animaciones complementarias. Los círculos numerados (2, 3, 4 y 5) corresponden a pantallas con efectos y animaciones diversas (2) tabla de datos numéricos con animación, (3) Simulación de experimentos, (4) presentación esquemática de conceptos (5) relaciones porcentuales dinámicas.



**Figura 3.** Algunas pantallas secundarias de la unidad 4, (1) Tabla periódica completa donde se despliega el nombre del elemento al mantener el puntero en cualquiera de los cuadros, los cuales tienen también hipervínculos a la información específica mostrada en (3) y (4), gráfica de energía de ionización de los elementos (2) que muestra relaciones y tendencias en forma secuencial, (3) Esquema comparativo de volúmenes iónicos con animación controlada por el usuario para destacar las diferencias entre grupos de elementos representativos.

La GIQ requiere de algunos compromisos de sus lectores y usuarios. Uno de ellos es la lectura atenta y paciente de los contenidos. Se conoce que existe un efecto de “ansiedad” del lector de hipertexto por conocer “lo que sigue” [5], sin embargo para el nivel educativo en que se propone la GIQ se supone que no representa un problema insalvable. Otro compromiso, en este caso con el profesor, es no desviar la responsabilidad de la enseñanza ante el grupo a la lectura de la GIQ, como se ha mencionado la GIQ es para el profesor un *recurso didáctico* adicional y no debe confundirse con un *sistema de enseñanza o aprendizaje de la química*.

Lo anterior revela la importancia de considerar un *contexto pedagógico* en el cual tenga un lugar explícito y definido la GIQ, el apoyo o utilidad de ésta depende de objetivos y responsabilidades claras para cada uno de los participantes.

### 3. Descripción y funcionamiento de la Guía Interactiva de Química (GIQ)

La GIQ se organiza en 3 módulos que contienen un total de 10 unidades. Al momento se ha distribuido el módulo I que contempla las primeras 4 unidades. Los contenidos temáticos de esta guía fueron acordados por la *Academia General de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)* y son temas comunes a los programas de preparatorias de la UAEM así como de preparatorias incorporadas, no representan fielmente los contenidos de dichos programas pues la intención es *apoyar* el desarrollo de los temas centrales o de mayor dificultad. Aunque la GIQ sigue los ejes temáticos del nivel bachillerato, varias carreras del área de las ciencias naturales consideran cursos introductorios a la química, en ese sentido la GIQ puede ser considerada como un soporte más para el estudio de la química.

Para el uso de la guía se recomienda su ejecución en *Microsoft PowerPoint* en la modalidad de proyección de transparencias. El diseño de las transparencias, como se ha mencionado, permite el acceso no secuencial a distintas unidades temáticas, y presentan una apariencia de aplicación multimedia, es decir, cuentan con *botones e iconos* para la navegación.

La navegación se hace mediante el uso de:

- a) Selección de palabras claves (*hot words*).
- b) Icono de avanzar y retroceder página.
- c) Índice temático de la Unidad.
- d) Opciones de la página central o inicial.
- e) Índices: temáticos, ejemplos, casos y alfabéticos.

#### 3.1. Organización de los Contenidos

Los contenidos se encuentran organizados de acuerdo a dos criterios que determinan el tipo de presentación y desarrollo temático. Las ***pantallas temáticas***, presentan de manera sintética definiciones, clasificaciones y generalidades del tema que se trata. Las ***pantallas de anexos*** son una “extensión” o desarrollo de los temas tratados en las *temas de las unidades*, es decir, de aquello que se ha presentado en las pantallas temáticas. Esta organización beneficia el funcionamiento de la GIQ ya que permite la fragmentación de la información y con ello un mejor acceso en términos de funcionalidad y velocidad, además de facilitar al autor la actualización de los contenidos.

Esta organización *expositiva* ayuda a diferenciar dos aspectos distintos, la *definición* y la *explicación*, ambos necesarios para el aprendizaje de las ciencias pero ninguna suficiente por sí sola [6].



En las *pantallas temáticas* se beneficia la *definición y generalidades del tema*, y sobre todo se *indica explícitamente* los temas relacionados para profundizar y comprender más ampliamente el tema. En estas pantallas se *invita o provoca* al alumno a *conocer más*, a superar el plano exploratorio. Por otra parte, se evita la presentación masiva de información que para el caso de lectores con mayor conocimiento del tema implicaría una revisión tediosa o redundante. De suma importancia en la concepción de diseño de la GIQ fue considerarla como un recurso de consulta constante y repetitiva y no pretender la presentación de *todo lo importante de la química*, sino más bien que la importancia sea reconocida por el propio lector y en ese sentido facilitar o provocar lecturas más extensas e intensas.

Las *pantallas de anexo*, además de lo ya mencionado, permiten mayor funcionalidad para el docente, en cuanto puede hacer uso de los *ejemplos y explicaciones* desarrolladas utilizándolas como recurso didáctico en el aula y abundar en el tema o reconocer relaciones que en la GIQ no son expresadas en beneficio de una navegación más simple.

#### 4 Conclusiones

La GIQ sirve de ejemplo sobre lo que es posible hacer con recursos informáticos accesibles a la mayoría de los usuarios, sin embargo la experiencia en el desarrollo de la guía nos ha mostrado que es necesario considerar la inversión de tiempo, personas y conocimiento. El acceso a la herramientas informática y el saber utilizarlas no bastan para el desarrollo de este tipos de proyecto, se requiere de la participación de autoridades y académicos en el marco de un trabajo colaborativo para promover este tipo de producciones.

Es importante impulsar los procesos de alfabetización tecnológica tanto para maestros y alumnos no solamente para *capacitarlos* como usuarios sino también como productores de contenidos, evidentemente, esto requiere de estrategias para que su entusiasmo y participación culminen en proyectos útiles y valiosos para la comunidad que participe en ellos.

En el proceso de desarrollo de la GIQ se han imaginado posibilidades distintas para su realización, software de autoría y de desarrollo multimedia, sin embargo se ha decidido continuar con *Microsoft PowerPoint*, como una abierta invitación a los profesores y alumnos de participar en la construcción de contenidos.

La GIQ no suplanta al docente, tampoco la consulta a publicaciones u otras fuentes de información, es una *guía para facilitar el estudio* con algunos desarrollos de ejemplos y explicaciones para facilitar la *enseñanza*, la utilidad de este hipermedia depende por completo del contexto pedagógico.

#### 5 Agradecimientos

Este proyecto ha sido promovido por la Academia General de Química y el Departamento de Medios Educativos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

#### Notas y Referencias.

1. Basurto Vázquez, F. *Guía Interactiva de Química* (AGEQUI-UAEM: México, 2003). ISBN 986 878 164 9, se encuentra disponible en el siguiente sitio de Internet: [www.baspe.com](http://www.baspe.com)
2. Algunos autores consideran que para definir un *hipermedia* se requiere entre otras cosas el manejo de una *base de datos*, sin embargo, nos parece más relevante destacar el funcionamiento y contexto de aplicación del la Guía Interactiva de Química, en ese sentido *funcionalmente* es un *hipermedia educativo*.

3. García Aretio, L. *La educación a distancia. De la teoría a la práctica* (Ariel: España, 2001).
4. Pozo Municio, I. *Aprendices y maestros. La nueva cultura del aprendizaje* (Alizan: España, 2001)
5. Anderson, M. D. Individual Characteristics and Web-Based Courses. In C. Wolfe (ed.) *Learning and Teaching in the World Wide Web*. (Academic Press: USA, 2001) pp. 47-72.
6. Pozo, J. I. And Gómez Crespo, M. A. *Aprender y enseñar ciencia*. (Morata: España, 2001).

### ALTERNATIVAS DIDÁCTICAS PARA LA ENSEÑANZA: LA “GUÍA INTERACTIVA DE QUÍMICA”

#### Resumen.

Se presenta la “Guía Interactiva de Química” (GIQ) que es un material educativo orientado a la educación media superior y superior. Sus usos pueden ser, para los alumnos, una guía para el estudio y puede funcionar también como un recurso de información. Para el profesor, la GIQ puede servir como un recurso didáctico. Esta propuesta de hipermedia educativo se encuentra soportada en el software de *Microsoft PowerPoint*, la razón para utilizar una plataforma de este tipo, y no herramientas de autoría multimedia, responde a dos intereses, por un lado el mostrar un hipermedia desarrollado con una herramienta común y disponible para maestros y alumnos en el contexto de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y por otro lado, propiciar que la versión fuera lo más compatible con equipo de cómputo diverso y con ello ampliar las opciones de acceso al hipermedia. Este desarrollo se presenta como una invitación a alumnos y maestros para participar activamente en la producción de contenidos, actividad creativa que si se da en un contexto curricular definido, sin duda sería de alto valor formativo.

**Palabras clave:** Química; Guía interactiva; PowerPoint; hipermedia; hipertexto.

#### Semblanza del M en QO Fernando Basurto Vázquez.



Nació en Cuernavaca, Morelos México el 08, Septiembre de 1948. Su formación es Químico Industrial por la Facultad de Ciencias Químicas e Industriales (FCQI) – UAEM (Cuernavaca), después realizó una Maestría en Química Orgánica en la Facultad de Ciencias Químicas e Industriales – UAEM (Cuernavaca). Se ha Capacitado asistiendo a Diplomados sobre Diseño y Elaboración de Hipertexto para la Enseñanza Superior Escolarizada y a distancia, Calidad Total y Desarrollo de Habilidades Gerenciales. Su Experiencia Laboral incluye Catedrático por horas en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, cursos de Química, Sistemas de Calidad y Computación; Elaboración de documentos mediante herramientas de cómputo; Obtención de productos químicos destilados; y del 2001 a la fecha es Coordinador de la Maestría en Química Orgánica. Ha colaborado con los Laboratorios Julián de México S.A. de C. V. (SmithKline Beecham – UQUIFA) y ha sido Gerente de Investigación y Desarrollo de Procesos. Ha sido apoyado con los siguientes Proyectos especiales: Memorias del 1er Congreso Estatal de Calidad (FCQI) 2002 y Guía Interactiva de Química I, para el Nivel Medio Superior. Academia General de Química (UAEM).





---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL

Rogelio Hernández Pando, Héctor Orozco E, Diana Aguilar L, Fernando López Casillas\*, Graham Rook\*\*.

Sección de Patología Experimental. Departamento de Patología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

\*Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.

\*\*Department of Bacteriology. Windeyer Institute. University College of London. UK.

### IMMUNOPATHOLOGY OF EXPERIMENTAL PULMONARY TUBERCULOSIS

#### Abstract.

*Besides its significant clinical and epidemiological importance, tuberculosis is also a fascinating model to study immunopathological processes. Because of its chronicity, tuberculosis infection can produce significant alterations on the immune system, like immune-suppression of the cell mediated immune response (CMI), tissue damage (necrosis and fibrosis), polyclonal B stimulation which can be related with autoimmunity and immune complex disease. Another significant aspect is latent infection, condition in which some live bacilli remain in the tissues in a non-replicating or slowly replicating dormant state for the rest of the life of the individual.*

*Perhaps the most important task for the immunologists interested in tuberculosis is the characterization of the immunological events involved in protection and the factors related to immunopathology. In this regard, one valuable approach is the use of experimental animal models. In mouse and humans, tuberculous infection is mainly controlled by CMI. Th1 type cytokines like interferon gamma (IFN $\gamma$ ) and proinflammatory cytokines like tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) have a central role in this process, by inducing macrophage activation and nitric oxide synthase (iNOS) expression. The nitric oxide (NO) produced is essential to kill intracellular mycobacteria. This protective activity fails if there is a marked release of Th2 type cytokines. This complex interplay of immune cells and cytokines is clearly depicted in a BALB/c mouse model of pulmonary tuberculosis following intratracheal inoculation. In this model, an initial phase is dominated by high production of Th1 cell cytokines, that together with high levels of TNF $\alpha$  and iNOS temporarily controls the infection. Granulomas develop in this phase. One month after infection the expression of Th1 cell cytokines, TNF $\alpha$  and iNOS start to decline. This impairment of*

*protective CMI during late tuberculosis infection is manifested by low DTH against mycobacterial antigens, and progressive pneumonia which prevails over granulomas. Pneumonia, in coexistence with high burden of bacteria, causes death. Several factors participate in this immunological unbalance that permit disease progression, like infection with hypervirulent mycobacteria, excess of prostaglandin E and transforming growth factor beta production, and activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, among others. The manipulation of these factors can contribute to improve the control of the infection permitting shorten antibiotic therapy courses. Regarding to latent infection, experimental animal models have contributed to demonstrate that this form of tuberculosis is induced and maintained by Th-1 type cytokines, and dormant bacilli are present in the infected lung not only in macrophages, but also in other kind of non-professional phagocytic cells like fibroblasts, endothelium or epithelial cells. Thus, animal models have contributed to understand the extreme complexity of the immune response in tuberculosis, and can also been used as powerful tools to evaluate new vaccines and antibiotics.*

**Keywords:** pulmonary tuberculosis; immunopathology; tuberculosis infection; nitric oxide; nitric-oxide synthase.

## Introducción

La tuberculosis es una importante enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones y produce profundas alteraciones en el sistema inmunológico (1). Actualmente se calcula que esta enfermedad produce 3 millones de defunciones a nivel mundial, con 8 millones de nuevos casos, lo cual la convierte en la enfermedad infecciosa más importante en el mundo después de los cinco años de edad, motivo por el cual la Organización Mundial de la Salud la ha declarado emergencia mundial (2).

Además de su gran importancia clínica epidemiológica, la tuberculosis es también un modelo fascinante para estudiar procesos inmunopatológicos. En efecto, debido a su cronicidad, el bacilo tuberculoso es capaz de producir diversas anormalidades inmunológicas, tales como: daño tisular extenso (necrosis y fibrosis tisular), la supresión de la inmunidad mediada por células, la activación policlonal de linfocitos B lo cual puede producir enfermedad por complejos inmunes e incluso enfermedad autoinmune (1). Otro aspecto de gran interés en la tuberculosis es la infección latente, condición en la cual la bacteria viva y virulenta permanece en los tejidos del huésped pero en un estado de equilibrio en el cual el microorganismo no destruye a las células que la albergan y el sistema inmunológico tampoco lo elimina, de tal manera que en esta situación el bacilo tuberculoso puede mantenerse viable por largos periodos de tiempo y en algún momento puede reactivarse produciendo la enfermedad progresiva (3).

El objetivo fundamental de nuestra línea de investigación es la caracterización de los mecanismos inmunológicos que contribuyen a la protección en contra del bacilo tuberculoso y de aquellos mecanismos inmunopatológicos que participan en el proceso de la progresión de la enfermedad y el daño tisular. Consideramos teóricamente que la caracterización de estos procesos inmunológicos podrá permitir la intervención inmunoterapéutica que contribuya a promover la actividad protectora y/o abatir los mecanismos que faciliten la progresión de la enfermedad. De esta manera pensamos que se puede mejorar el control y la prevención (vacunación) de esta enfermedad.

En esta revisión se describe buena parte de nuestras observaciones o contribuciones originales incluidas en un marco amplio del conocimiento de esta importante enfermedad infecciosa.

### **La tuberculosis pulmonar progresiva, el modelo experimental**

La tuberculosis es una enfermedad muy compleja, en la que participan factores del huésped (constitución genética, respuesta inmunológica), de la bacteria (genes y factores de virulencia) y del medio ambiente (pobreza, desnutrición, hacinamiento). Es por la participación activa de todos estos factores que resulta muy difícil estudiar la respuesta inmunológica al bacilo tuberculoso y es necesario desarrollar un modelo experimental que se asemeje lo más posible a la enfermedad humana.

Existen varios modelos experimentales de tuberculosis, sobre todo establecidos en ratones, cobayos y conejos. Aunque la tuberculosis pulmonar experimental desarrollada en cobayos y conejos es muy similar a la enfermedad humana, se tiene el inconveniente de que estos animales son genéticamente abiertos (outbreed), por lo cual la respuesta inmunológica puede ser muy heterogénea y además no se dispone de muchos reactivos comerciales para caracterizarla. Los cobayos y conejos son además animales relativamente grandes, por lo que albergarlos en número suficiente para realizar estudios cinéticos y con un buen control de bioseguridad es otro problema importante. Por estos motivos se considera que el ratón es una especie muy conveniente para reproducir experimentalmente a esta enfermedad.

Durante varios años, los modelos experimentales de tuberculosis desarrollados en el ratón se caracterizaron por el inconveniente de usar vías de infección no naturales (endovenosa o intraperitoneal) y micobacterias no patógenas (bacilo Calmette Guérin BCG). Por lo tanto la información obtenida de estos modelos quizás no represente lo que realmente ocurre en la tuberculosis pulmonar. Fue por esto que nuestro grupo de investigación desarrolló un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva, que se caracteriza por usar animales genéticamente idénticos (cepa singénica Balb/c) los cuales se infectan por la vía natural (inyección intratraqueal) con bacterias vivas y virulentas (cepa prototipo H37Rv). La dosis empleada de bacterias para infectar a los ratones es elevada ( $1 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^5$ ), puesto que estos animales no son huéspedes naturales de las micobacterias (4).

La inyección intratraqueal permite un mejor control de la dosis y garantiza que la mayoría, sino es que todas las bacterias realmente se depositen en el pulmón. Estas son ventajas sobre el uso de nebulizadores como instrumento de infección, pues con estos instrumentos se puede permitir la deglución de las bacterias y en consecuencia la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa digestiva, lo que seguramente modifica significativamente la respuesta inmunológica sistémica.

Nuestro modelo experimental corresponde a un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, el cual se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad (5). La primera fase es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, y se forman sistemáticamente granulomas en la segunda semana de infección (5).

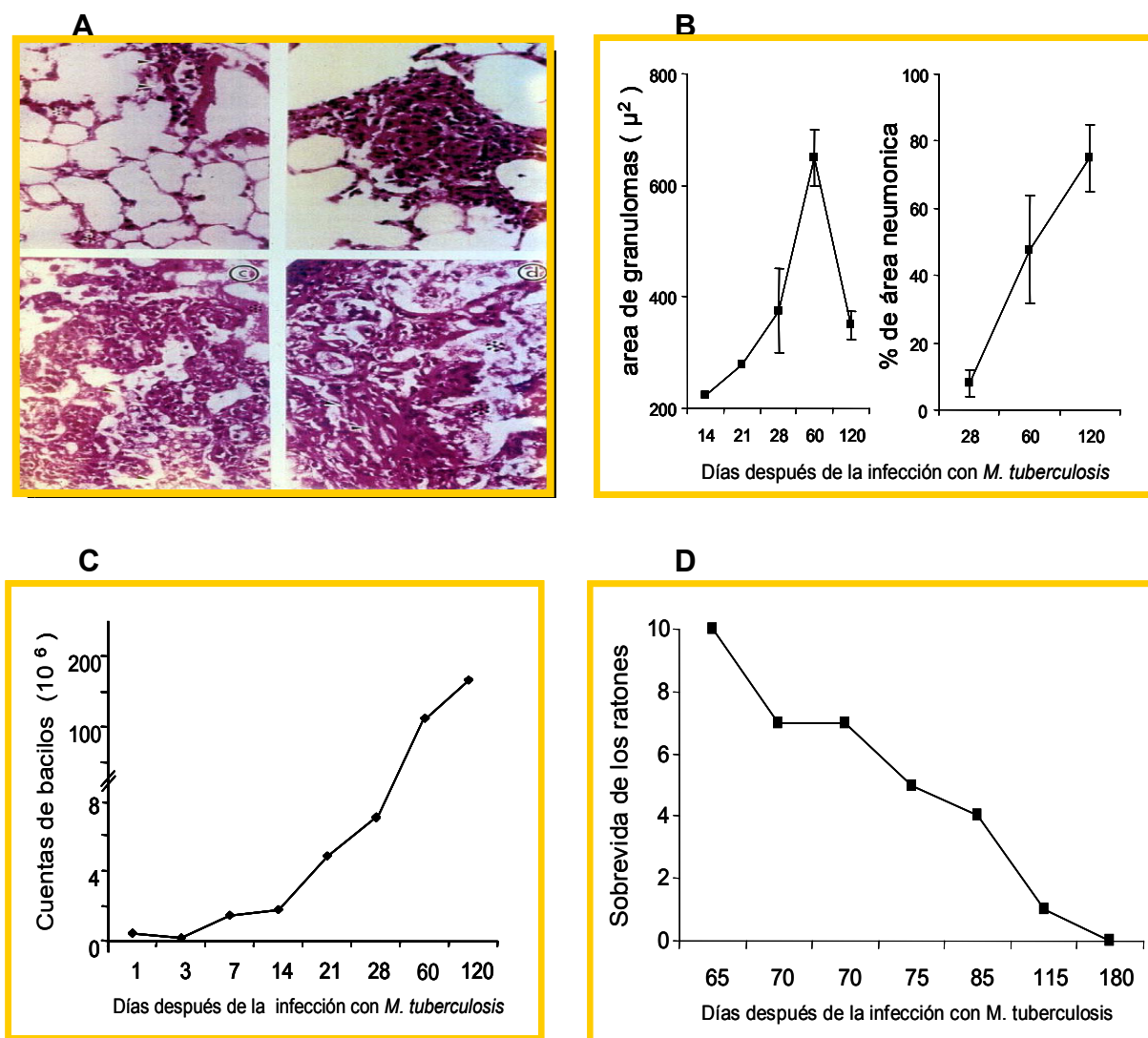
Los granulomas son las estructuras histopatológicamente distintivas de la tuberculosis y corresponden a un tipo de inflamación crónica producida por la presencia de material poco o no biodegradable (6). Los granulomas están constituidos por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos y se les considera como las estructuras fundamentales para contener a las bacterias. Durante la fase temprana de la infección en nuestro modelo experimental, específicamente en la segunda semana postinfección los granulomas empiezan a formarse y una semana después alcanzan su máxima madurez (5) (Figura 1). Estos granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio intersticial y perivenular coexistente están constituidos principalmente por linfocitos T CD-4 de tipo 1 productores de las citocinas interferon gama (IFN) e interleucina 2 (IL-2) y macrófagos activados productores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF) e interleucina 1 (IL-1) (5, 7) (Figuras 2, 3).

Desde hace mucho tiempo se ha demostrado que la protección en tuberculosis depende de la inmunidad celular constituida por linfocitos T y macrófagos (1). Nuestro modelo experimental corrobora esta información y otras observaciones realizadas en humanos y en animales de experimentación en donde se ha demostrado que los macrófagos activados y los linfocitos Th-1 son los principales elementos inmunológicos que protegen en contra del bacilo tuberculoso (1, 5). Debido a que los granulomas producidos en la segunda y tercera semana post-infección están constituidos predominantemente por células Th-1 y hay elevada producción de IFN que activa a los macrófagos, estimulándolos a producir gran cantidad de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Figura 4)(8).

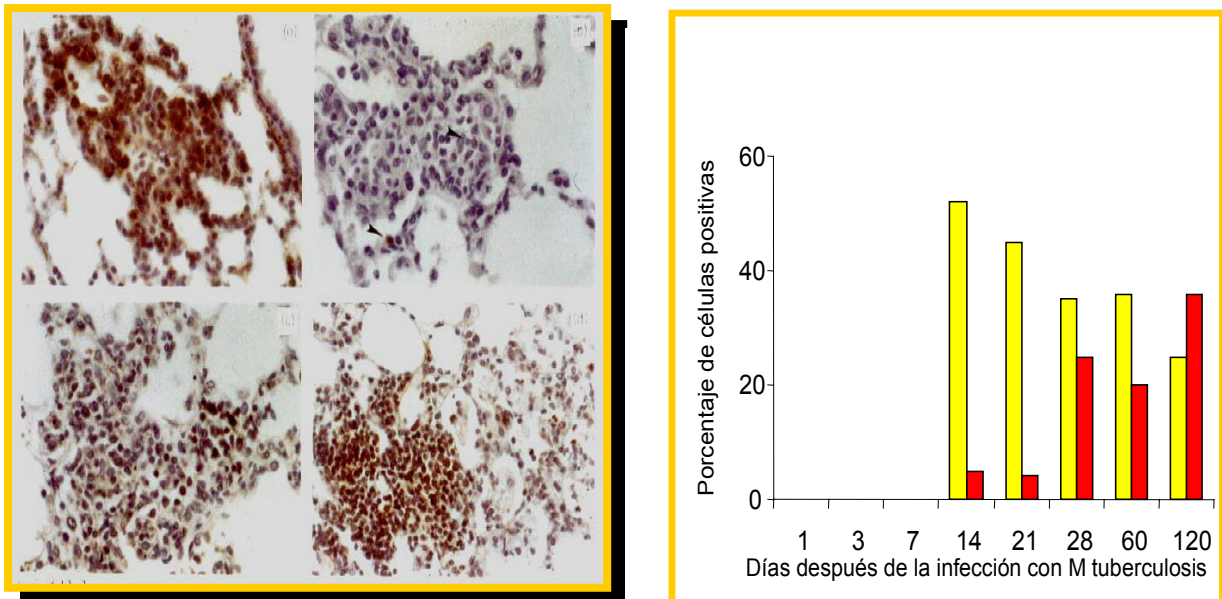
La iNOS genera la producción de oxido nítrico (ON), el cual reacciona con radicales libres de oxígeno que también son producidos en gran cantidad y al mismo tiempo generando así la producción de peroxinitrilos, compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, entre estos uno de los blancos principales son las proteínas (en particular el aminoácido tirosina). Las proteínas nitrosiladas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuyen a la muerte celular (8). Por otro lado, los macrófagos activados en estos granulomas también secretan gran cantidad de IL-1, citocina que al igual que el TNF contribuye a activar a los macrófagos y además estimula la producción de IL-2 y su receptor (7). La IL-2, que al igual que el IFN es producida por linfocitos Th-1, induce la proliferación celular linfocitaria incrementando así el número de células inmunocompetentes que contribuyen a mantener bajo control a las micobacterias. Los macrófagos son entonces células fundamentales en el control de la tuberculosis, pues fagocitan y destruyen a las bacterias, además de que también regulan al sistema inmunológico a través de la secreción de diversas citocinas (1, 8). En nuestro modelo experimental el acmé de la respuesta protectora es en el día 21, cuando los granulomas alcanzan su plena maduración, lo cual se corrobora porque coexiste con la máxima respuesta de hipersensibilidad tardía cutánea (DTH) en contra de antígenos micobacterianos (4, 5, 7). De esta manera se concluye que durante la fase temprana de la infección existe predominio de la actividad de linfocitos Th-1 y macrófagos activados lo cual permite el control temporal de la infección.

La segunda etapa de la enfermedad en este modelo experimental corresponde a la fase avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por gran incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de

necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conduce a la muerte (4, 5, 7). Desde el punto de vista inmunológico, durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2) (5), los cuales se caracterizan por producir las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13. En particular, la IL-4 es una citocina fundamental en la



**Figura 1.** Características fundamentales de la tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c infectados por vía intratraqueal con micobacterias vivas y virulentas (cepa H37 Rv). (A) Imágenes histológicas representativas de la fase temprana (inflamación y granulomas) y de la fase progresiva (neumonía, necrosis y fibrosis). (B) Morfometría automatizada del tamaño de los granulomas y el porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía a lo largo de la enfermedad. (C) Determinación de unidades formadoras de colonia bacterianas en homogenizados pulmonares. (D) Curva prototipo de la sobrevivencia de los animales durante el curso de la enfermedad.

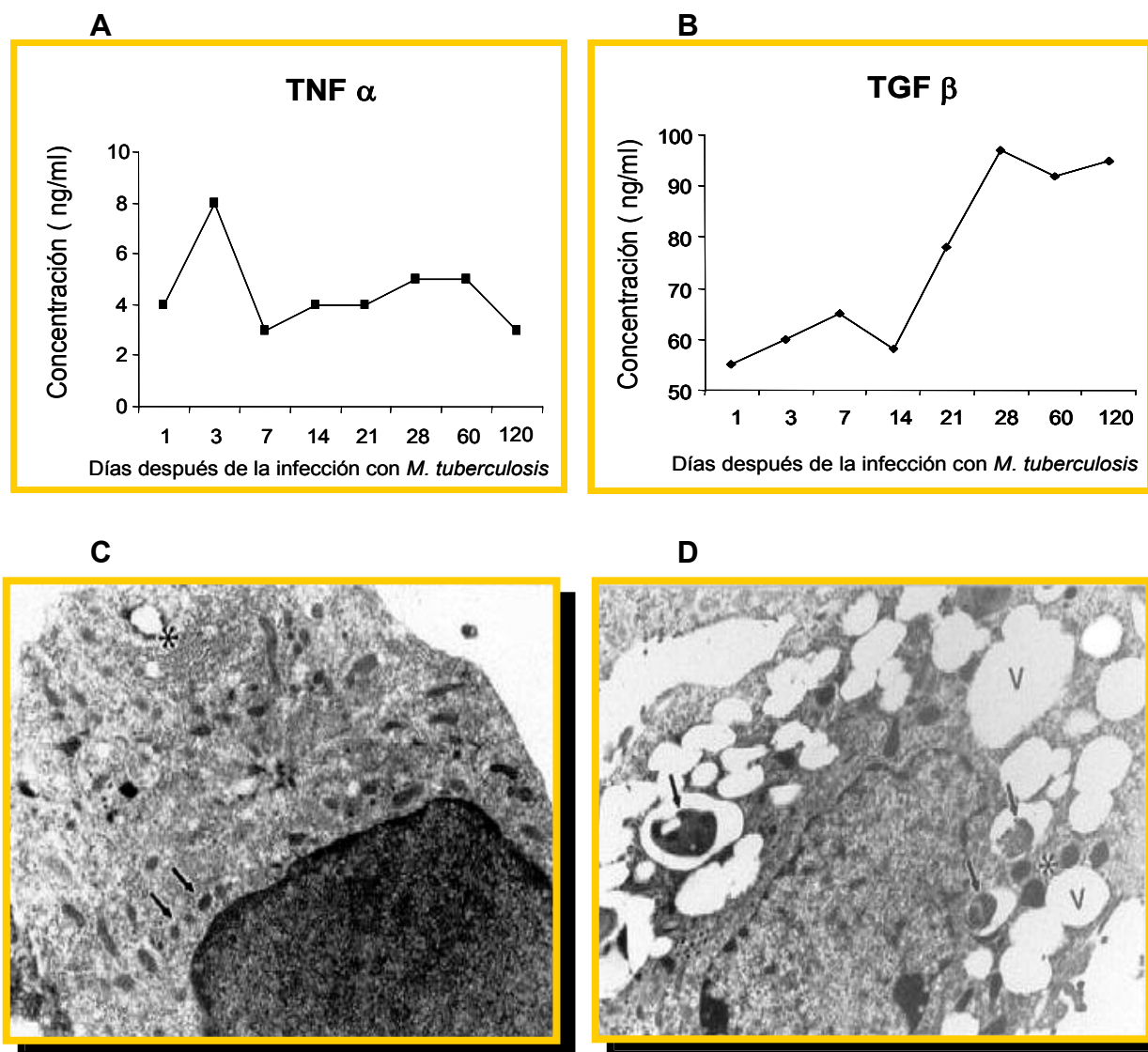


**Figura 2.** Cinética de producción de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4) en los granulomas pulmonares durante el curso de la enfermedad. El panel de la izquierda muestra en el recuadro superior izquierdo la inmunotinción para IL-2 y en el recuadro superior derecho se muestra el mismo granuloma de 14 días postinfección incubado con anticuerpo monoclonal para detectar IL-4. En el recuadro inferior izquierdo se muestra la inmunotinción para IL-2 y en el recuadro inferior derecho es la inmunotinción para IL-4 en un granuloma de 4 meses de infección. En el panel de la derecha se muestra el porcentaje de células positivas para IL-2 (barras amarillas) y para IL-4 (barras rojas) a lo largo de la enfermedad determinado por morfometría automatizada. Existe predominio de células IL-2 positivas durante la fase temprana de la enfermedad (14-28 días postinfección), mientras que durante la fase progresiva de la enfermedad (días 60 y 120 postinfección) hay un balance mixto de células productoras de IL-2 e IL-4.

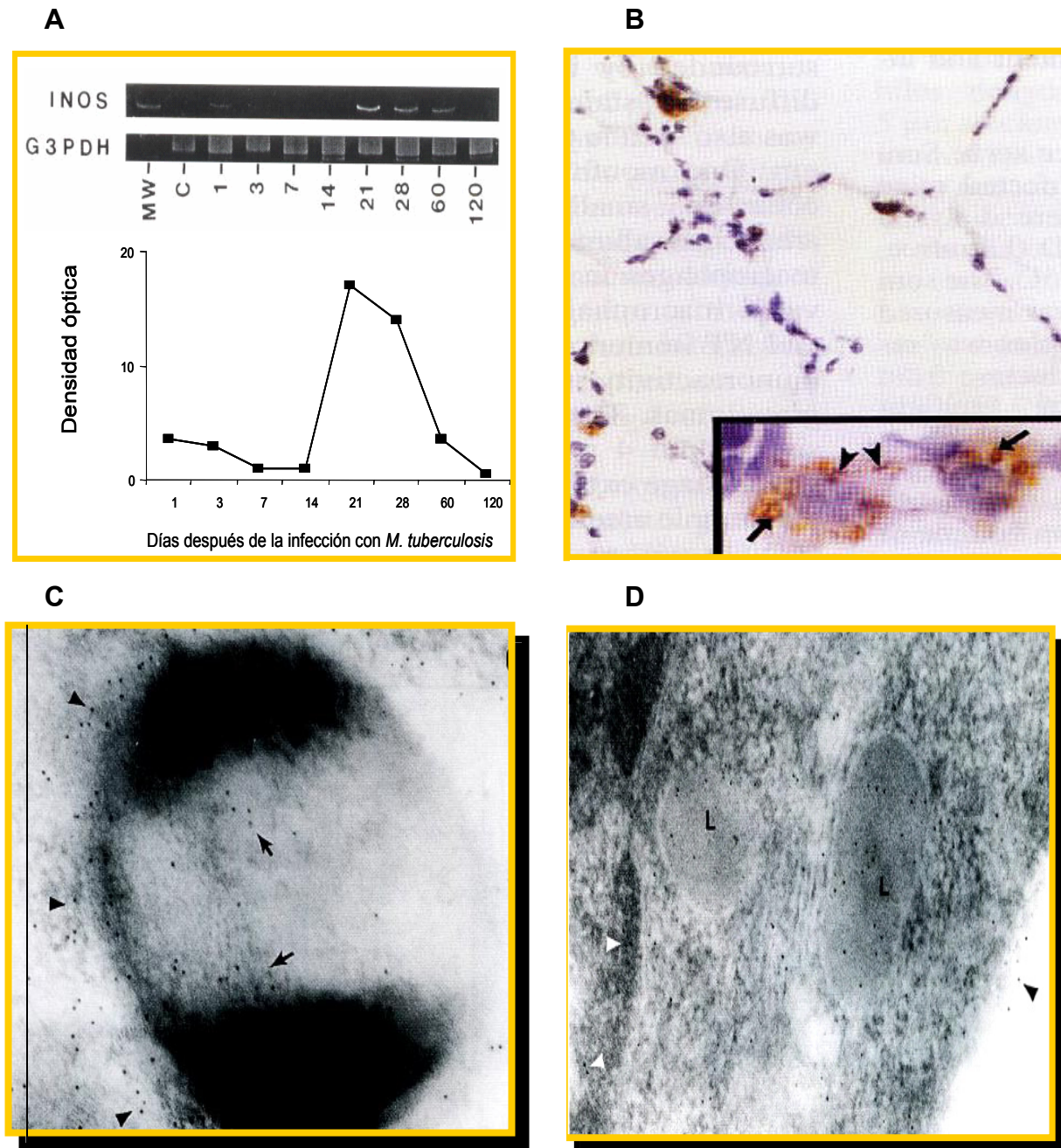
inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, que se consideran como no protectores en la tuberculosis. Además la IL-4 al igual que la IL-10 y la IL-13 son eficientes antagonistas de las células Th-1. En consecuencia, consideramos que la emergencia de los linfocitos Th-2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th-1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad (5). De manera interesante, también los macrófagos experimentan modificaciones morfo-funcionales muy importantes, pues el citoplasma de estas células se llena de bacterias y de numerosas vacuolas que contienen lípidos bacterianos, en particular lipoarabinomano (7), un lípido de la pared bacteriana que es muy eficiente para desactivar a los macrófagos. Además, estos macrófagos vacuolados disminuyen significativamente su producción de TNF, IL-1 e iNOS, e incrementan notablemente su capacidad productora de potentes citocinas antiinflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el factor de transformación tumoral (TGF) y la IL-10 (7, 8). El TGF es también una eficiente citocina inductora de la proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena, contribuyendo así a generar fibrosis. En conclusión, nuestros resultados muestran que en la fase progresiva de la enfermedad existen importantes anomalías inmunológicas que



permiten la sobrevida y proliferación bacteriana, tales como mayor actividad de los linfocitos Th-2 (con menos actividad de los Th-1) y macrófagos desactivados que secretan citocinas supresoras de la inmunidad celular como el TGF; estas alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria (Figura 1).



**Figura 3.** Cinética de producción de citocinas macrofágicas y morfología ultraestructural de los macrófagos. (A) Cuantificación del factor de necrosis tumoral por ELISA en homogenizados pulmonares, esta citocina se produce en grandes cantidades durante la fase temprana de la infección, sobre todo en los días 3 y 21, posteriormente durante la fase progresiva de la enfermedad su concentración disminuye acentuadamente. (B) En comparación, el factor de transformación tumoral beta tiene una cinética totalmente opuesta al del TNF. (C) Macrófagos activados caracterizados por tener abundante citoplasma con numerosos lisosomas (flechas) y ocasionales bacterias fagocitadas (asterisco) son las células predominantes durante la fase temprana de la enfermedad. (D) Macrófagos con numerosas vacuolas (V) citoplasmicas y abundantes micobacterias fagocitadas (flechas) son el tipo de macrófago mas abundante durante la fase progresiva de la enfermedad.



**Figura 4.** Cinética de expresión genética determinada por RT-PCR de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y detección de nitrotirosina (NT) por inmunohistoquímica. (A) La expresión genética de iNOS es máxima en el día 21 postinfección, posteriormente durante la fase progresiva de la infección disminuye acentuadamente. (B) En la fase temprana de la infección los macrófagos activados muestran intensa inmunotinción para NT, a mayor aumento (inset) se observa un patrón de inmunoreactividad granular (flechas) y bacilar (cabezas de flecha). (C) Detección de NT por inmunoelectronmicroscopía en una bacteria fagocitada por un macrófago activado localizado en un granuloma de 14 días postinfección. Existe intenso inmunomarcaje en la pared (cabezas de flecha) y en el citoplasma (flecha) de la bacteria. (D) Detección de NT por inmunoelectronmicroscopía en un macrófago vacuolado. Existe marcaje en la membrana celular (flecha negra), nuclear (flecha blanca) y en lisosomas (L)



### **La función dual del TNF y su relación con el balance Th1/Th2**

Las observaciones experimentales mencionadas son de considerable importancia porque nuestros resultados experimentales sugieren que la combinación de las citocinas Th1+Th2 más el TNF producen daño tisular extenso, lo cual también se ha observado en otros modelos experimentales de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los granulomas producidos en respuesta a los huevos de esquistosoma en el hígado de ratones sufren necrosis cuando emerge la respuesta Th2 (9). En nuestro modelo experimental cuando antes del reto intratraqueal con micobacterias virulentas se inmunizan a los ratones con una dosis baja de una preparación de micobacterias saprofitas muy inmunogénicas muertas por calor (*Mycobacterium vaccae*), se induce exclusivamente la respuesta Th1, lo cual se acompaña de una respuesta alta de DTH a antígenos micobacterianos totales inyectados en el cojinete plantar de los animales de experimentación (10). Si en este mismo sitio se inyecta el TNF recombinante, la respuesta inflamatoria producida detectada 24 hr después es mínima y no hay necrosis. En comparación, si se sensibilizan a los ratones con una dosis 100 veces mayor de la misma preparación de *M. vaccae* se produce una respuesta de citocinas mixta Th1/Th2, lo cual induce una respuesta mínima de DTH (anergia de inmunidad celular) y la inyección local de TNF produce una gran respuesta inflamatoria con necrosis hemorrágica (10). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el TNF puede tener una actividad dual y paradójica en la tuberculosis. Cuando el TNF se libera en un sitio inflamatorio en donde existen exclusivamente linfocitos Th-1, el TNF actúa como una molécula más de activación macrofágica contribuyendo a la formación de granulomas y a la protección antimicobacteriana (como sucede en los pulmones de la fase temprana de nuestro modelo experimental), pero cuando el TNF es liberado en un sitio inflamatorio en donde existe una combinación de citocinas Th1/Th2 se produce daño tisular necrótico con inflamación excesiva (como sucede en la fase avanzada en nuestro modelo experimental) (10, 11 12). Estas observaciones han sido recientemente confirmadas infectando ratones Balb/c con eliminación funcional de los genes que codifican IL-4 (ratones knock out), una de las citocinas más representativas de la respuesta Th2 (13).

Siguiendo la continuidad de estas observaciones, consideramos que la siguiente pregunta crucial es: ¿Cuáles son los factores que están relacionados en promover la emergencia de la respuesta Th-2 y la inactivación de los macrófagos? Teóricamente, si fuéramos capaces de identificar a dichos factores podríamos modular la respuesta inmunológica permitiendo así un mejor control de la enfermedad (14, 15). Aunque deben de ser muchos y muy variados los factores que contribuyen a este desbalance inmunológico, nuestros resultados experimentales han demostrado que la alta carga antigénica, anormalidades endocrinológicas como la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (EHHA) y la hipersecreción de TGF y prostaglandinas, son factores de gran importancia que contribuyen a generar el mencionado desbalance.

### **Los factores que participan en el desbalance inmunológico que permite la progresión de la tuberculosis pulmonar experimental. La influencia de la carga antigénica**

La carga antigénica es un factor importante que participa en la estimulación preferencial de la respuesta Th-1 o Th-2. En efecto, en varios modelos experimentales se ha demostrado que una carga antigénica pequeña normalmente es muy eficiente para activar a las células Th-1, mientras que una elevada carga antigénica activa la respuesta Th-2 (17). Por lo tanto, durante la

fase inicial de la enfermedad al existir un número relativamente pequeño de bacterias, hay activación preferencial de la respuesta protectora Th-1, mientras que durante la fase avanzada de la enfermedad cuando existe elevada cantidad de bacterias, hay predominio de la estimulación a las células Th-2. Experimentalmente nosotros hemos comprobado este factor, en los mismos experimentos relatados en la sección anterior. Al presensibilizar a los ratones con una cantidad pequeña de bacterias saprofitas muy inmunogénicas muertas por calor ( $1 \times 10^4$  células de *Mycobacterium vaccae*), se produce una eficiente activación de las células Th-1. En consecuencia, cuando se retan a estos ratones dos meses después por vía intratraqueal con un elevado número de micobacterias vivas y virulentas se produce un control muy eficiente de la enfermedad (10). En comparación, cuando se inmunizan ratones con una gran cantidad de células de *M. vaccae* ( $1 \times 10^5$ ), se induce fuertemente la respuesta Th-2, lo cual permite que la enfermedad rápidamente progrese y produzca la muerte unos días después de inocular bacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv por vía intratraqueal (10).

Esta observación tiene una importancia significativa en la enfermedad humana, si se considera que las micobacterias saprofitas, que son muy abundantes en el medio ambiente, no son parte de la flora intestinal normal, por lo tanto la cantidad y calidad de micobacterias saprofitas con que confrontemos en nuestro medio ambiente serán fundamentales en conferir protección o susceptibilidad a la enfermedad. Teóricamente, los sujetos que vivan en un medio ambiente muy contaminado con micobacterias saprofitas tendrían una mayor cantidad de células Th-2 activadas lo cual les confiere mas susceptibilidad a la enfermedad, mientras que los sujetos que viven en un medio ambiente mas higiénico, con menos exposición a micobacterias saprofitas, tendrán una actividad preferencial de células Th-1, confiriéndoles así mayor resistencia a la enfermedad.

### **La activación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal y su contribución en la inmunopatología de la tuberculosis**

Durante los procesos de estrés crónico, como lo es la tuberculosis pulmonar, las neuronas del núcleo paraventricular son activadas en gran parte por las citocinas proinflamatorias IL-1, TNF e IL-6, para las cuales estas células tienen receptores. Al activarse, las neuronas hipotálamicas secretan la hormona estimulante de corticotrofina, la cual es liberada y circula a través del sistema porta hipofisiario hasta llegar a la hipófisis anterior, en donde estimula a las células adrenocorticotrofas para que estas secreten a la hormona estimulante de la corteza suprarrenal (ACTH). Esta hormona viaja a través de la circulación sanguínea sistémica hasta alcanzar a las células fasciculares de la corteza suprarrenal estimulando la secreción de cortisol.

El cortisol es una potente hormona antiinflamatoria y supresora de la inmunidad celular, es por lo tanto una eficiente hormona inhibitoria de la respuesta Th-1 (18). El cortisol también promueve la diferenciación de las células Th2 (19). Nosotros hemos demostrado en nuestro modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva que al mismo tiempo que la inmunidad protectora es máxima, al establecerse granulomas maduros constituidos por abundantes linfocitos Th-1 y macrófagos (día 21 postinfección), las citocinas macrófagicas proinflamatorias como las IL-1, IL-6 y el TNF que se están produciendo en gran cantidad en los pulmones ejercen acciones locales fundamentales en la protección antibacteriana, pero estas citocinas también circulan sistémicamente, estimulando la producción de proteínas hepáticas de fase aguda y

activando a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (4, 20). De hecho esta estimulación es tan intensa que las glándulas suprarrenales duplican su peso incrementando enormemente el cortisol plasmático, con lo cual contribuye a estimular vigorosamente a las células Th-2 (4). Más aún, catabolitos no funcionales del cortisol (corticosterona) son reconvertidos en la forma activa de la hormona (cortisol), a través de la actividad de la enzima 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, contribuyendo así a generar una mayor concentración de cortisol en los pulmones enfermos (21). Estas mismas anomalías se han observado en pacientes tuberculosos (21, 19).

En las glándulas suprarrenales se producen también hormonas androgénicas esteroideas como la dehidroepiandrosterona (DHEA). Un aspecto interesante es que la DHEA tiene efectos antagonistas al cortisol, pues es un eficiente estimulador de los linfocitos Th-1 (22, 23). Esta hormona se secreta como un precursor sulfatado, el cual se activa en el citoplasma de los macrófagos por la participación de una enzima sulfatasa (23). En pacientes tuberculosos se ha encontrado una disminución acentuada en las concentraciones plasmáticas de la DHEA (21, 19, 24). Experimentalmente, si se tratan animales infectados de *M. tuberculosis* con DHEA o su análogo el androstenediol desde el primer día de infección, se promueve mayor activación de linfocitos Th-1 permitiendo un mejor control de la enfermedad (25). Si los ratones Balb/c con tuberculosis avanzada (2 meses postinfección) se tratan con la DHEA o androstenediol en combinación con dosis fisiológicas de cortisol, también se promueve eficientemente la producción del IFN y la IL-2 contribuyendo a mejorar significativamente la supervivencia, el daño tisular pulmonar y la carga bacilar (26). Es factible, por lo tanto el uso de la DHEA y el androstenediol como agentes inmunoterapéuticos en la tuberculosis (27, 28). Recientemente hemos tratado animales tuberculosos con análogos sintéticos de la DHEA (HE-2000), con resultados similares a los producidos por la hormona natural pero con la ventaja de que los análogos sintéticos no generan metabolitos androgénicos, lo cual permite su uso en pacientes. Más aún, el uso de este análogo sintético en combinación con el esquema de antibióticos usados para tratar la tuberculosis permite una eliminación más rápida de las bacterias acortando el tiempo de tratamiento (manuscrito enviado a publicación).

### **La participación de las prostaglandinas en la inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental**

Las prostaglandinas son potentes mediadores de la comunicación intercelular y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en altas concentraciones produce inmunosupresión de la inmunidad celular (29). Durante la inflamación, las señales celulares se acompañan por un rápido reacomodo de los lípidos de la membrana celular mediante la activación de lipasas que generan lípidos bioactivos que pueden servir como mediadores intra y/o extracelulares. El más importante de estos lípidos es el ácido araquidónico, que es un ácido graso poli-insaturado de 20 carbonos que es normalmente esterificado en fosfolípidos de la membrana celular y es liberado por medio de la activación de las fosfolipasas celulares (30). Los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico son los llamados eicosanoides, que son considerados como autacoides por que son hormonas locales de corto alcance que se forman rápidamente y surten efecto localmente decayendo su actividad espontáneamente o por efecto de degradación enzimática.

Los eicosanoides afectan muchos eventos fisiológicos y patológicos, son sintetizados por dos clases mayores de enzimas: cicloxigenasas (COX) y lipoxigenasas que a su vez producen

prostaglandinas y leucotrienos respectivamente (29, 30). La vía de las cicloxigenasas es mediada por dos enzimas diferentes: COX-1 que es una enzima que se expresa de manera constitutiva y COX-2 que es una enzima altamente inducible y que se expresa en el tejido inflamado después de la exposición a factores de crecimiento, citocinas y otros mediadores de la inflamación. De las prostaglandinas las mas ampliamente estudiadas son las de la serie E (PGE). Existe una vasta evidencia experimental que muestra que la PGE-2 tiene un efecto inmunosupresor importante que incluye la disminución de la proliferación de los linfocitos, e inhibición de la activación de las células NK y de la expresión de las moléculas de tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) (31, 32). También se ha encontrado que la PGE-2 inhibe la producción de las citocinas Th1 (INF, IL-2, IL-12), bloquea la activación de los macrófagos y suprime la producción de la IL-1 y el TNF (33, 34). Esta actividad de la PGE-2 puede ser importante en infecciones intracelulares ya que como se ha mencionado, tanto en los ratones como en los humanos, la infección por micobacterias es controlada por la activación de los macrófagos a través de la producción de las citocinas Th1 (1). Además, los macrófagos alveolares son células eficientes en la producción de la PGE-2, la cual en bajas concentraciones tiene el efecto de estimular la expresión de la iNOS, pero en altas concentraciones la suprime (35).

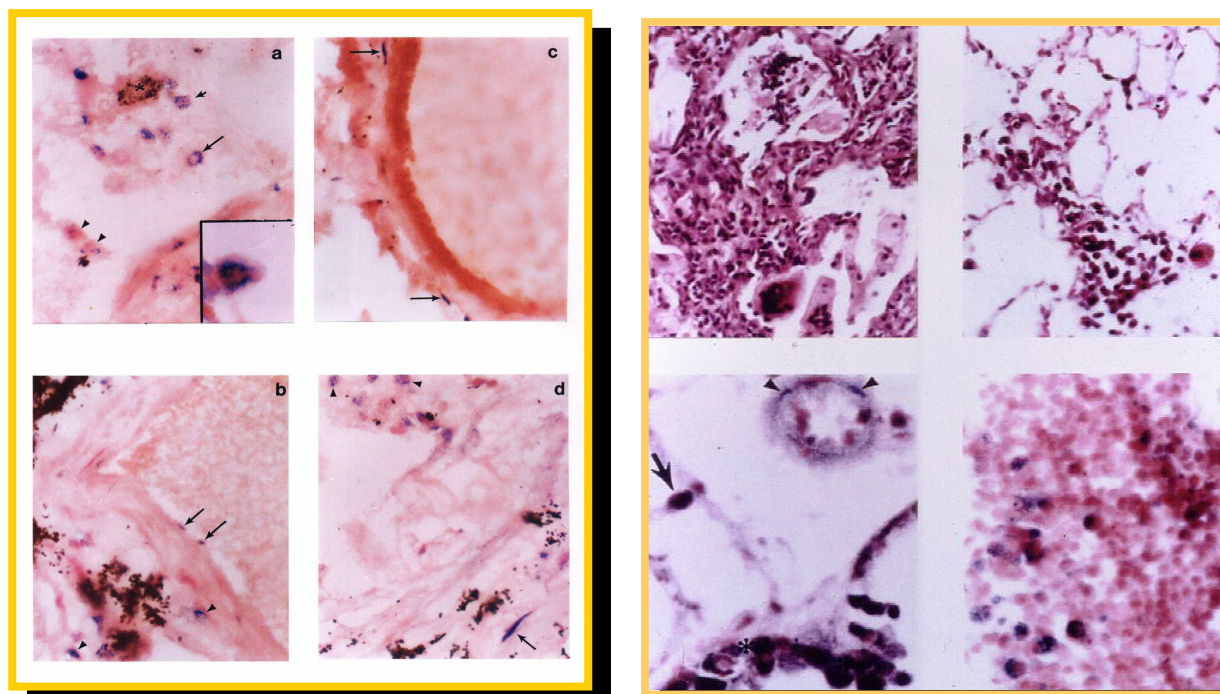
En nuestro modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en los ratones Balb/c hemos demostrado que la expresión de la COX-2 y la PGE2 se incrementa progresivamente durante el curso de la enfermedad (36). Durante la fase temprana de la infección las concentraciones de PGE2 son muy bajas lo cual contribuye a promover la expresión de la iNOS, participando así en el control temporal de la infección (35, 36). Mientras que durante la fase avanzada de la enfermedad las concentraciones de la PGE2 se cuaduplican, siendo los macrófagos vacuolados de las áreas neumónicas la fuente principal de este mediador inflamatorio (36). En estas concentraciones elevadas, la PGE2 contribuye significativamente a suprimir la respuesta Th-1, disminuyendo también la producción del TNF y de la iNOS, puesto que cuando se suprime la producción de la PGE2 con la administración de ácido niflúmico, un eficiente inhibidor farmacológico específico de la COX-2, se reactiva la respuesta protectora al incrementarse las concentraciones del IFN, el TNF y la IL-2, lo cual contribuye a disminuir significativamente la carga bacilar pulmonar y las áreas de lesión neumónica (36).

En conclusión, la PGE-2 tiene una actividad dual en la tuberculosis experimental, durante la fase temprana de la infección las bajas concentraciones de la PGE-2 contribuyen a estimular la expresión de la iNOS, en consecuencia participa en el control temporal de la infección, mientras que en la fase avanzada de la enfermedad las altas concentraciones de la PGE-2 contribuyen a suprimir a la inmunidad protectora facilitando la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, es también posible que los inhibidores selectivos de la COX-2 como el ácido niflúmico o el nimesulide puedan ser usados como agentes inmunoterapéuticos en la tuberculosis.

### **La participacion del factor de transformacion tumoral beta en la inmunopatologia de la tuberculosis pulmonar experimental**

El TGF- $\beta$  es el prototipo de una superfamilia de factores autócrinos y parácrinos que participan en el control del desarrollo embrionario, la diferenciación y proliferación celular, la reparación tisular y la regulación del sistema inmunológico. El TGF- $\beta$  es un potente inhibidor del crecimiento celular de linfocitos y células epiteliales, además de desempeñar un papel importante

en la reparación tisular (37).



**Figura 5.** Imágenes histológicas representativas de infección latente en tejido pulmonar humano y en el modelo experimental de infección latente. En el panel de la izquierda se muestra la detección de DNA de *M. tuberculosis* (IS6110) por PCR in situ en tejido pulmonar histológicamente normal proveniente de sujetos muertos por causas diversas pero diferentes a tuberculosis. En el recuadro superior izquierdo se observa positividad (manchas azules) en macrófagos alveolares (flechas) y en neumocitos tipo II (inset). En el recuadro superior derecho se muestra positividad en fibroblastos de la capa adventicia de una vena (flechas). En el recuadro inferior izquierdo se observa positividad en células endoteliales (flechas), mientras que en el recuadro inferior derecho se muestra un nódulo antracótico con positividad en fibroblastos (flechas) y macrófagos. En el panel de la derecha se muestran imágenes representativas del modelo experimental. El recuadro superior izquierdo corresponde a las áreas neumónicas extensas de los ratones con enfermedad progresiva. En comparación, en el recuadro superior derecho se muestra las áreas focales de alveolitis de los animales con infección latente. En el recuadro inferior izquierdo se observa la positividad para DNA de *M. tuberculosis* (IS 6110) en el pulmón de ratones con infección latente en macrófagos (flecha), fibroblastos perivascuales (cabezas de flecha) y epitelio bronquial, así como en macrófagos localizados en ganglios linfáticos intertraqueobronquiales mostrados en el panel inferior derecho.

El TGF- $\beta$  es una citocina única entre las interleucinas debido a que suprime eficientemente la inmunidad celular actuando en varios niveles (38, 39). Como sucede con muchos otros tipos de células, el TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de los linfocitos, sobre todo de las células T maduras que ya han sido activadas (40), mientras que los linfocitos T vírgenes o no activados son relativamente resistentes al efecto anti-mitogénico del TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  también suprime la diferenciación y actividad citolítica de las células NK y T (38). Otro efecto inhibitorio importante del TGF- $\beta$  es la supresión de la expresión de las moléculas MHC-II en los macrófagos

(41), interfiriendo en el proceso de la presentación antigénica y activación de los linfocitos T. El resultado mas importante de esta interferencia en la activación de las células T es la inhibición de la secreción de la interleucina 2 (IL-2), debido a que esta citocina es un factor esencialmente inductor de la proliferación celular. Otra citocina mitogénica de los linfocitos T y activadora de los macrófagos, es la interleucina 1 (IL-1). El TGF- $\beta$  también inhibe su producción de manera directa e indirectamente al suprimir la expresión de su receptor específico y al mismo tiempo aumentar la liberación del receptor soluble antagonista de la IL-1, cuya función es atrapar y evitar la unión de esta citocina con su receptor (42). Uno de los efectos supresores fundamentales del TGF- $\beta$  sobre el sistema inmunológico es la desactivación de los macrófagos, la cual puede llevarse a cabo a través de la inhibición directa de la producción de radicales libres de oxígeno y oxido nítrico, o de forma indirecta al suprimir la producción de las citocinas activadoras de los macrófagos como el TNF e INF y sus receptores (43, 44). Como se mencionó, para la producción de oxido nítrico es necesario que el TNF y el INF activen la iNOS mientras que el TGF- $\beta$  inhibe tanto la transcripción como la traducción del gen que codifica esta enzima (45). Por otro lado, la participación del INF es fundamental para activar a los macrófagos como parte de la respuesta Th-1 y uno de los efectos inmunosupresores mas eficientes del TGF- $\beta$  es inhibir la producción de INF y su receptor expresado en la membrana de los macrófagos (44). Además el TGF- $\beta$  es un eficiente promotor de las citocinas Th-2, particularmente de interleucina 10 (46).

La producción sostenida y excesiva de TGF- $\beta$  ha sido implicada como un factor patogénico importante en la fibrosis y daño tisular en diferentes enfermedades (39). Pero además de este importante efecto inductor de fibrosis, en varias enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, la lepra y la tuberculosis existe anergia de la inmunidad celular la cual ha sido atribuida en parte a la excesiva producción de TGF- $\beta$  (38, 39, 47). La bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, sus derivados proteicos purificados (PPD) y algunos de sus componentes moleculares como el lipoarabinomano, inducen a los macrófagos a producir y secretar grandes cantidades de TGF- $\beta$  (47). En modelos experimentales de tuberculosis pulmonar y en la enfermedad humana activa se ha demostrado una alta producción de TGF- $\beta$  (7, 48), lo cual coincide con la disminución de la actividad inmunológica protectora mediada por las citocinas producidas por los linfocitos Th-1 (INF, IL-2) y el TNF. Estudios *in vitro* han demostrado que la anergia de la inmunidad celular que generalmente existe en pacientes con tuberculosis pulmonar activa puede ser corregida con la administración de anticuerpos bloqueadores o bloqueadores naturales del TGF- $\beta$ , lo cual también reduce significativamente el crecimiento intracelular del bacilo tuberculoso (48).

La cadena de señalamiento del TGF- $\beta$  se inicia en la superficie celular con la asociación, mediada por este ligando, de los receptores tipo I y II, que son proteínas transmembranales cuyas porciones intracelulares consisten de cinasas específicas para serinas y treoninas. La fosforilación de la cinasa del receptor I, por la cinasa del receptor II, causa su activación y de ahí la fosforilación de miembros de una novedosa familia de proteínas denominadas "SMADS", las cuales forman complejos heteroméricos que migran al núcleo para regular los eventos transcripcionales involucrados en las respuestas del TGF- $\beta$  (49). Además del receptor de señalamiento, se han identificado otras proteínas de superficie celular que unen al TGF- $\beta$ , como el betaglicano y la endoglina, que son proteínas transmembranales con grandes dominios extracelulares capaces de unir al TGF- $\beta$  y pequeñas regiones intracelulares, muy semejantes entre sí. Aunque ninguna de estas glicoproteínas parece tener una clara función en la vía intracelular transductora del TGF- $\beta$ , ambas parecen modular el acceso extracelular del ligando a

los receptores tipo I y II . El betaglicano, también llamado el receptor tipo III del TGF- $\beta$ , une las tres distintas isoformas de esta citocina con alta afinidad (50). Además de la forma membranal, existe una forma “soluble” del betaglicano, que se encuentra en el suero y las matrices extracelulares. Ésta se origina a partir de un corte proteolítico yuxtamembranal que libera el ectodominio del receptor de su anclaje a la membrana. La forma recombinante del betaglicano soluble tiene una función antagónica de los efectos del TGF- $\beta$  (51).

Como se comentó, durante la fase avanzada de nuestro modelo experimental hay elevada producción del TGF- $\beta$ , lo que probablemente contribuya a desactivar la función de los macrófagos y estimular la actividad de las células Th-2 (7). Esto lo hemos comprobado al administrar de manera intraperitoneal al betaglicano en su forma soluble durante la fase avanzada de la enfermedad y así bloquear la actividad del TGF- $\beta$ , con lo cual se reactiva la respuesta Th-1 produciendo una disminución significativa de la carga bacilar (manuscrito en preparación). Sin embargo, debido a que el TGF- $\beta$  es un eficiente factor anti-inflamatorio, la extensión de la neumonía aumentó en los ratones tratados con el betaglicano soluble al bloquear el efecto del TGF- $\beta$ . De manera interesante, si se administra al mismo tiempo un medicamento anti-inflamatorio como el ácido niflúmico, agente bloqueador selectivo de la COX-2, se bloquea al mismo tiempo la síntesis de prostaglandinas, que como se ha mencionado, también son producidas en altas concentraciones durante la fase avanzada de la infección y participan estimulando a las células Th-2 (33, 34, 36). La administración conjunta del betaglicano soluble con el ácido niflúmico produjo mayor estimulación de la respuesta inmunológica protectora provocando una mayor disminución de los bacilos tuberculosos en el pulmón que en comparación con el betaglicano soluble solo (manuscrito en preparación).

### **La influencia de la diversidad genética de las micobacterias en la inmunopatología de la tuberculosis**

Desde la primera exposición con *Mycobacterium tuberculosis*, el sistema inmunológico desencadena una serie de respuestas que definirán el curso de la infección. Esta respuesta inmunológica no es uniforme en todas las personas infectadas, de hecho la gran mayoría nunca desarrollarán la enfermedad (52). Más aun, existe un amplio espectro de manifestaciones clínicas que se pueden presentar en cualquier momento de la vida de aquellos pacientes que no podrán controlar la enfermedad. También, la respuesta inmunológica y por lo tanto, la respuesta *in vitro* de los linfocitos T y B en contra de los antígenos micobacterianos, diferirá significativamente de persona a persona. Por lo tanto, el curso clínico de la infección y sus consecuencias epidemiológicas dependen de la compleja interacción entre el huésped, el medio ambiente y la bacteria.

Los factores ambientales que determinan un incremento de la susceptibilidad a la tuberculosis son la pobreza, la desnutrición, el hacinamiento, el estrés y la exposición a micobacterias saprofitas (53, 10). En relación con los factores del huésped, existen evidencias de predisposición genética multifactorial en los humanos que influyen en la susceptibilidad a la tuberculosis (54, 55, 56). En el ratón, se han descrito genes que participan en el control de la multiplicación temprana de las micobacterias y otros genes que actúan en la progresión de la enfermedad específicamente en los pulmones (57). Sin embargo, parece ser que la participación independiente de estos genes no es suficiente para conferir protección total en contra de la infección con *M. tuberculosis*.

El factor más estudiado del huésped es la respuesta inmunológica inducida en contra del bacilo tuberculoso. Como se mencionó, la respuesta Th-1 y los macrófagos activados productores de TNF son los protagonistas fundamentales en la respuesta protectora contra la tuberculosis y que ésta actividad protectora falla si hay una elevada producción de las citocinas tipo Th2, lo cual claramente se demuestra en nuestro modelo experimental (5, 7, 10). Por otro lado, el efecto de la variabilidad genética de *M. tuberculosis* en el curso de la infección no se ha estudiado completamente.

Hasta el inicio de la década de los años de 1990, cuando el análisis de la constitución genética de *M. tuberculosis* se inició, se creía que estaba constituido por un grupo de bacterias genéticamente muy conservado. Por lo tanto, en la investigación de esta enfermedad se han usado un número limitado de cepas de laboratorio prototipo como la H37Rv y la Erdman. Sin embargo, información epidemiológica reciente sugiere que hay diferencias en la virulencia y transmisibilidad de *M. tuberculosis* que pueden ser explicadas por la constitución genética de las cepas. Este es un aspecto de considerable importancia para el control de esta importante enfermedad infecciosa.

La tipificación genética de *M. tuberculosis* utilizando al transposón IS6110 y la técnica de RFLP, es el procedimiento hasta el momento más utilizado y mejor estandarizado para estudios clínico-epidemiológicos (58). La técnica de PCR que utiliza la amplificación de este gen es muy específico y sensible para el diagnóstico molecular de la tuberculosis, con resultados positivos en las muestras (expectoración o tejido) del 95 % al 100 % de los pacientes tuberculosos estudiados con cultivos positivos.

El establecimiento de una base de datos en el Instituto Nacional de Salud Pública y Ambiente en Holanda ha permitido la comparación automatizada del patrón de RFLP de IS6110 de más de 8000 aislados clínicos de *M. tuberculosis* a nivel mundial. Estos patrones permitieron clasificar a las micobacterias en grandes familias o genotipos genéticamente relacionadas (59, 60). Bajo este criterio tenemos a la familia Beijing, la cual constituye al genotipo de *M. tuberculosis* predominante en Asia (61). El genotipo Somalí que se encuentra frecuentemente en el este de África y Asia y la familia Haarlem que corresponde al genotipo de *M. tuberculosis* más comúnmente encontrado a nivel mundial (60). Hay micobacterias que solamente tienen una copia de IS6110 y éste se encuentra en la India y Pakistán (58). El genotipo Canetti pertenece a la recientemente descrita *M. tuberculosis* subespecie Canetti, la cual fue originalmente aislada en el Instituto Pasteur en 1969. La cepa IN4 carece de la secuencia IS6110 y fue aislada en la India (58). Recientemente informamos sobre las diferencias inmunopatológicas en nuestro modelo experimental en ratones Balb/c infectados con aislados clínicos representativos de las familias genotípicamente prevalentes a nivel mundial (62). Cuando se le comparó con la cepa prototipo H37Rv, el genotipo Beijing mostró acentuada hipervirulencia, pues generó 100 % de mortalidad al mes de infección e inmunológicamente se observó notable disminución en la expresión del IFN y la IL-2, con una producción alta pero de muy corta duración del TNF e iNOS lo cual coexistió con 40 veces más bacterias vivas en el pulmón y neumonía masiva. En contraste, la cepa Canetti permitió mas del 98 % de supervivencia de los animales después de 4 meses de infección, con producción relativamente alta y sostenida de TNF e iNOS en coexistencia con áreas focales de neumonía y escasas bacterias viables en el pulmón. El resto de los aislados clínicos mostraron un comportamiento similar a la infección con la cepa de laboratorio H37Rv (62). Estos resultados claramente muestran que existen diferencias en la virulencia, la respuesta



inmunológica y la extensión del daño pulmonar inducido por las bacterias con diferentes genotipos. Actualmente estamos realizando estudios similares con aislados clínicos de nuestro país correlacionando los datos clínico-epidemiológicos con la respuesta inmunopatológica usando nuestro modelo experimental y analizando la constitución genética de las micobacterias con la técnica de microarreglos genéticos. Es posible que con este tipo de estudios se pueda esclarecer a nivel molecular los genes de la micobacteria y sus productos relacionados con virulencia y transmisibilidad.

### **La infección latente, observaciones en el tejido humano y en los modelos experimentales**

*Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo patógeno intracelular facultativo que puede producir tanto la enfermedad progresiva como la infección latente asintomática (1). Generalmente la infección inicial o primoinfección tuberculosa se lleva a cabo en los pulmones durante la niñez y en la mayoría de los casos es controlada por el sistema inmunológico, solo el 10 % de estos casos sufrirán la enfermedad progresiva (3). Algo interesante es que en esta primoinfección tuberculosa, aun en aquellos casos que son controlados por el sistema inmunológico, no todas las bacterias son eliminadas, algunos bacilos permanecen en los tejidos en un estado quiescente con poca o nula actividad reproductiva por el resto de la vida del individuo infectado (63). Este estado infeccioso se denomina infección latente, es clínicamente asintomático y solo se manifiesta por los resultados positivos de la prueba de hipersensibilidad cutánea a la tuberculina (PPD) o por un estudio radiográfico del tórax que muestre nódulos fibróticos o cicatrices calcificadas indicativas de una primo-infección tuberculosa resuelta (3). De hecho, una tercera parte de la humanidad tiene este tipo de infección latente y en áreas en donde en carácter endémico de esta enfermedad es bajo o moderado, la mayoría de los casos de tuberculosis activa son la consecuencia de la reactivación de los gérmenes latentes (64, 65, 66). La infección tuberculosa latente es también importante porque los bacilos latentes son más resistentes a los antibióticos que aquellos que están proliferando activamente, lo cual implica la necesidad de antibiótico-terapia prolongada para tratar la enfermedad activa (67). Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias para eliminar totalmente a los microorganismos latentes y dichas estrategias surgirán después de conocer los mecanismos moleculares que utiliza la bacteria para sobrevivir por tan largo periodo de tiempo y establecer el tipo de respuesta inmunológica inducida en el sujeto infectado.

La tuberculosis latente se produce después de que una eficiente respuesta inmunológica se ha generado durante la primoinfección tuberculosa. Esta respuesta inmune es eficiente porque controla y obliga a las bacterias a entrar en un estado quiescente o latente (3). Las personas con infección latente no transmiten la enfermedad, pero en países en donde la tuberculosis endémica no es muy alta, existe un riesgo del 2 al 23 % de por vida de que se produzca reactivación de la enfermedad. Esta situación es diferente en áreas con alta incidencia de la enfermedad, en donde la reinfección exógena parece ser la causa principal de la tuberculosis secundaria (65, 66).

Sorprendentemente, se sabe poco acerca de la localización de *M. tuberculosis* en personas con infección latente (3). Hace muchos años, Opie, Aronson y Griffith (68) inyectaron homogenizados pulmonares de sujetos fallecidos por diversas causas, pero no por tuberculosis, a cobayos (una especie muy susceptible al desarrollo de tuberculosis) y demostraron que es posible recuperar bacilos tuberculosos vivos y virulentos de lesiones cicatrizales o nódulos

calcificados del pulmón, así como de ganglios linfáticos intertraqueobronquiales. Interesantemente, fragmentos de tejido macroscópicamente normal obtenido de las bases o ápices pulmonares, también tuvieron bacterias vivas en un alto porcentaje de casos (68). Nosotros informamos que en el tejido pulmonar humano proveniente de casos de autopsia de sujetos fallecidos por causas diferentes a la tuberculosis provenientes de países con tuberculosis endémica (Etiopía y México), con frecuencia tienen DNA micobacteriano (secuencia de inserción IS6110) sugestivo de infección latente en áreas histológicamente normales (69). Lo cual sugiere que en el ser humano pueden existir micobacterias en estado latente en áreas sin lesión histológica que sugiera tuberculosis (Figura 5). Esta observación en el tejido humano la consideramos de mucho interés por lo que desarrollamos un modelo experimental de infección latente en ratones híbridos F1 C57bl/DBA para estudiar mas detalladamente este proceso e investigar el tipo de respuesta inmunológica que se genera.

Como se observó en el tejido pulmonar humano, también en nuestro modelo experimental de la infección latente, detectamos el DNA micobacteriano sugestivo de la infección latente en total ausencia de lesión histológica (70) (Figura 5). Sin embargo, tanto en el tejido pulmonar humano como en los pulmones de animales de experimentación con la infección latente, el estudio histológico directo usando diferentes tinciones especiales para las micobacterias no permitió identificar a los bacilos. Fue por lo tanto necesario utilizar los métodos moleculares de gran sensibilidad, tales como la técnica de PCR *in situ* para detectar el DNA micobacteriano y ubicar su localización celular. De esta manera confirmamos y ampliamos los resultados de Opie y Aronson que datan de 1927, demostrando que en el tejido pulmonar histológicamente normal de personas que vivieron en los países con alta endemicidad de la tuberculosis y que fallecieron por otras causas que no fuera la tuberculosis, tienen DNA micobacteriano como un indicador indirecto de infección latente, en un 38 % y 29 % por el estudio *in situ* y del 38 % al 35 % por el método convencional de PCR, en las autopsias estudiadas de sujetos con nacionalidad etiope y mexicana respectivamente (69) y esto mismo lo observamos en el modelo experimental (70).

Aunado a esto, se determinó el DNA micobacteriano en el citoplasma de varios tipos celulares. Como era de esperarse los macrófagos alveolares e intersticiales fueron las células mas frecuentemente positivas, pero el DNA bacteriano también se observó en los neumocitos tipo II, las células endoteliales y los fibroblastos, sobre todo en las células que se localizaron en las bandas fibróticas subpleurales o en los nódulos antracóticos. En los pulmones de los animales de experimentación con la infección latente se observó una distribución y localización del DNA micobacteriano muy similar a la determinada en el tejido humano, pero además en los ratones las células del epitelio bronquial también fueron intensamente positivas (70) (Figura 5).

Se ha demostrado *in vitro* que varias especies de micobacterias patógenas, incluidas *M. avium*, *M. marinum* y *M. tuberculosis*, son capaces de invadir y replicarse en varios tipos de células consideradas como los fagocitos no profesionales, tales como los fibroblastos, el endotelio y diversas células epiteliales humanas (71, 72, 73). También se puede considerar extraño el hecho de que *M. lepra* se puede observar en el citoplasma de diferentes tipos celulares *in vivo* (74), mientras que *M. tuberculosis*, que *in vitro* puede infectar de manera eficiente diferentes tipos de células, se ha sugerido que *in vivo* puede infectar exclusivamente a los macrófagos. Es muy probable que *M. tuberculosis* esté confinado solo en los macrófagos localizados en las lesiones tuberculosas clásicas, debido a que los estudios *in vitro* han demostrado que las células fagocíticas no profesionales se convierten en células muy

susceptibles al efecto tóxico del TNF cuando fagocitan al bacilo tuberculoso y ciertamente esta citocina es muy abundante en las lesiones tuberculosas (75, 76). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que tanto en el tejido pulmonar humano como en el de los animales de experimentación, las células fagocíticas no profesionales localizadas lejos de las lesiones tuberculosas pueden ser un importante santuario para la micobacteria. Más aún, esto se puede considerar como un tipo de escape inmunológico, puesto que estas células no tienen un aparato fago-lisosomal competente, ni son tampoco células eficientes en la presentación antigénica, por lo que esto permitiría un adecuado microambiente para la persistencia por largo tiempo del bacilo tuberculoso.

Nuestros resultados experimentales en los ratones han mostrado que el desarrollo de la enfermedad progresiva, lentamente progresiva e infección latente, depende de la cantidad de bacteria inoculada (70). En efecto, en los ratones C57bl/DBA la administración intratraqueal de 1 millón de bacterias produce la enfermedad progresiva, la cual se caracteriza por una elevada carga bacilar pulmonar, neumonía progresiva y alta mortalidad. En contraste, la infección con tan solo 4000 bacterias produce la infección latente, la cual se caracteriza por presentar una muy baja y estable carga bacilar pulmonar, granulomas y focos pequeños de alveolitis sin neumonía y con sobrevivencia total, inclusive los animales continúan aumentando de peso y su apariencia externa es totalmente normal. Estas características cumplen perfectamente con la definición operacional de infección latente experimental recientemente propuesta, la cual considera como requisitos la presencia constante y estable de bacterias vivas sin signos clínicos de enfermedad durante un largo periodo de tiempo y sin reactivación espontánea.

En nuestro modelo de infección latente se desarrollan granulomas y áreas focales de alveolitis, las cuales se pueden considerar como el equivalente de las lesiones que constituyen el complejo de Ghon de la infección en humanos. Estas lesiones fueron además muy importantes para nuestro estudio, porque nos permitió caracterizar el tipo de respuesta inmunológica generada en la infección latente y así poder compararla con la producida en la enfermedad progresiva. Nuestros resultados mostraron que en los granulomas y áreas de alveolitis en pulmones de animales con infección latente, hay un claro predominio de las citocinas Th-1 en coexistencia con una alta expresión de TNF, IL-1 e iNOS, lo cual sugiere que es precisamente este patrón de citocinas el que induce y mantiene el estado de latencia (70). Es también probable que esta intensa actividad de la inmunidad celular sea la explicación de la alta respuesta de DTH que mostraron estos animales, lo cual puede ser considerado como el equivalente de la respuesta positiva al PPD que se observa en los seres humanos con la infección latente y que constituye un elemento importante para establecer el diagnóstico de esta entidad. En evidente contraste, los ratones con la enfermedad progresiva mostraron un patrón de citocinas muy diferente al producido en la infección latente, pues en los granulomas y las áreas neumónicas se encontró un porcentaje de células IL-2 positivas similar al de las células IL-4, además de baja producción de TNF, IL-1 e iNOS, en coexistencia con la neumonía progresiva, una elevada carga bacilar, una rápido deterioro físico y una elevada mortalidad. En consecuencia, en este modelo de tuberculosis pulmonar progresiva y en otros (5, 13), la principal citocina producida por los linfocitos Th-2 (IL-4) está muy aumentada en su expresión genética y concentración en la enfermedad progresiva y/o avanzada. Esta situación también se ha observado recientemente en la enfermedad humana (77, 78). Además, la administración de glucocorticoides y el estrés por inmovilización en animales de experimentación han sido exitosamente utilizados para reactivar a la infección latente en varios modelos experimentales incluido el nuestro y ambos procedimientos son métodos muy eficientes para activar a las células Th-2 (79).

## Conclusiones

La tuberculosis es un fascinante modelo para estudiar diversos eventos inmunopatológicos. Los conocimientos patogénicos obtenidos a partir del estudio de los modelos experimentales y del tejido humano, unidos a la información genética, microbiológica, clínica y epidemiológica permitirán eventualmente un mejor control de esta importante y muy antigua enfermedad infecciosa.

## Agradecimientos

El trabajo experimental descrito en este trabajo ha sido posible realizarlo gracias al generoso apoyo del CONACYT, la Comunidad Europea de Naciones (INCO DC), International Institute of Biotechnology, Wellcome trust, British Biotechnology y Hollis Eden Pharmaceuticals.

## Referencias

- 1.- Rook GAW, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol* 1996; 50: 259-284.
- 2.- World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB endemics. Geneva. WHO. 1994.
- 3.- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998;6:107-12.
- 4.- Hernández Pando R, Orozco H., Honour J, Silvia P, Rook GAW: Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis a clue to pathogenesis?. *FEMS Microbiology Immunology*, 12: 63-72, 1995.
- 5.- Hernández-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89:26-33.
- 6.- Hernández Pando R, Bornstein QL, Aguilar LD, Orozco EH, Martínez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunologic and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology*. 100: 352-358, 2000.
- 7.- Hernández-Pando R, Orozco EH, Arriaga AK, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$  during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997; 90: 607-17.
- 8.- Hernández-Pando R, Schön T, Orozco EH, Serafín J, Estrada-García I. Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53:257-65.
- 9.- Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P. Egg deposition is the stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1991; 146: 1322-1340.
- 10.- Hernández Pando R, Pavón L, Arriaga K, Orozco EH, Madrid MV, Rook GAW: Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect and Immun* 1997; 6: 84-90.
- 11.- Hernández Pando R, Rook GAW: The role of TNF alpha in T-cell mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82: 591-95, 1994.
- 12.- Hernández Pando R, Orozco EH, Arriaga K, Pavón L, Rook GAW. Treatment with BB-94, a broad spectrum inhibitor of zinc-dependent metalloproteinases, causes deviation of the cytokine profile towards type-2 in experimental pulmonary tuberculosis in BALB/c mice. *Int J Exp Pathol*. 81: 199-209. 2000.
- 13.- Hernández Pando R, Aguilar LD, García HLM, Orozco EH, Rook GAW. Pulmonary tuberculosis in Balb/c mice with non-functional IL-4 genes, changes in the regulation of fibrosis and in the inflammatory effects of TNF  $\alpha$ . *European Journal of Immunology* 2004, 34: 174-183.
- 14.-Rook GAW, Hernández Pando R: Cellular immune responses in tuberculosis, protection and immunopathology. *Med. Mal. Infect.* 26: 1-7, 1996.
- 15.- Rook GAW, Hernández Pando R, Stanford J. Protection and immunopathology in tuberculosis: the role

- of immnotherapy. *J. Pharm Pharmacol* 1997; (Suppl 1): 47-51.
- 16.- Rook GAW, Hernández Pando R, Stanford J. Immunotherapy for chronic intracellular bacterial infections. En JMW Van der Meer, MF Michel and HA Verbrugh (editores). *New approaches to intracellular bacterial infections*. Smithkline Beecham 1997: 95-106.
- 17.- Bretscher P, Wei G, Menon JN, Bielefeldt Ohmann H. Establishment of stable cell mediated immunity that makes susceptible mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 1992; 257: 539-542.
- 18.- Rook GAW, Hernández Pando R. The influence of adrenal steroids on macrophages and T-cell function in tuberculosis. En Bendinelli M, Paradise LJ, Friedman (editores). *Opportunistic intracellular pathogens and immunity*. New York. Plenum Publishing Corp. 1999. 55-73.
- 19.- Rook GAW, Hernández Pando R, Baker R, Orozco EH, Arriaga K, Pavón L, Streber ML. Human and murine tuberculosis as models for immuno-endocrine interactions. En Rook GAW, Lightman S (editores): *Steroid hormones and the T-cell cytokine profile*. London Springer, 1997: 193-220.
- 20.-Hernández Pando R, Arriaga AK, Madrid MV, Orozco EH, Larriva SJ, Panduro CA. The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. *Experimental and Molecular Pathology*. 65, 25-36 (1998).
- 21.- Rook GAW, Baker R, Walker B, Honour J, Jessop D, Hernández Pando R, Arriaga K, Shaw A, Zunla A, Lightman S. Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917: 913-922, 2000.
- 22.- Rook GAW, Hernández Pando R: T-cell helper types and endocrines in the regulation of tissue damaging mechanisms in tuberculosis. *Immunobiology* 191: 478-92. 1994.
- 23.-Rook GAW, Hernández Pando R, Lightman S: Hormone, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunology Today* 15: 301-303, 1994.
- 24.-Rook GAW, Hernández Pando R. Pathogenetic role in human and murine tuberculosis of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids. *Psychoneuroimmunology* 1997; 22: S109-S103.
- 25.-Hernández Pando R, Streber ML, H, Orozco, K, Arriaga, L Pavón, S. A. AL-Nakhli, and G. A. W. Rook. The effects of androstenrediol and dehydroepiandrosterone on the course of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology* 1998; 95: 234-241.
- 26.-Hernández Pando, Streber ML, H. Orozco, K Arriaga, L. Pavón, S. A. Al-Nakhil, O. Marti, S. L. Lightman and G. A. W. Rook. Emergent therapeutic properties of a combination of glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in tuberculous Balb/c mice. *Q. J. Med.* 1998; 91: 755-766.
- 27.-Rook GAW Hernández Pando R, Immunological and endocrinological characteristics of tuberculosis that provides opportunities for immunotherapeutic intervention. *Genetic and Tuberculosis*. Wiley Chichester (Novartis Foundation Symposium 217) 1998. p73-98.
- 28.-Rook GAW, Hernández Pando R. The potential role of the endocrine system for tuberculosis therapy. *J. Pharm Pharmacol* 1997; (suppl 1): 43-46.
- 29.- Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991; 12: 349-52.).
- 30.-Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996; 10: 1147-58.
- 31.-Goto TR, Herberman RB, Maluish A, Strong DM. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol* 1983; 130: 1350-55.
- 32.-Snyder DS, Beller DI, Unanue ER. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature* 1982; 299: 163-65.).
- 33.-Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th-1 lymphokines but not of Th-2 lymphokines. *J Immunol* 1991; 146: 108-13.
- 34.-Kuroda E, Sugaira T, Zeki K, Yoshida Y, Yamashita U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E2 among mouse strains: a possible mechanism to polarize Th2 type response in BALB/c mice. *J Immunol* 2000; 164: 2386-95.
- 35.-Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, De Nucci G and Cillari E. Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 1995; 49: 105-15
- 36.-Rangel MJ, Estrada García I, García HML, Aguilar LD, Marquez VR, Hernández Pando R. The role of prostaglandin E-2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002;106:257-266.
- 37.-Massagué, J. (1990). The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.
- 38.- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune response by TGF $\beta$ . *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-61
- 39.-Hernández Pando R. Participación del Factor de Transformación Tumoral beta en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. *Gaceta Médica de México* 2003; 139: 135-138.
- 40.- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn M, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the

- regulation of T cell growth. J Exp Med 1986; 163: 1037-50
- 41.- Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. J Immunol 1988; 140: 4217-4232
- 42.- Turner M, Chantry D, Katsikis T, Berger A, Brennan FM, Feldman M. Induction of interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor beta. J Immunol 1991; 21: 1635-1639
- 43.- Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. J Exp Med 1987; 166: 991-999.
- 44.-Pinson DM, Le Claire RD, Lorsbach RB, Parmely MJ, Russell R. Regulation by transforming growth factor beta-1 of expression and function of the receptor for INF gamma on mouse macrophages. J Immunol 1992; 149: 2028-2038
- 45.- Vodovotz Y, Bogdan C. Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor beta: implications for homeostasis. Prog Growth Factor Res 1994; 5: 341-351
- 46.- Maeda Y, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shirahishi A. TGFb enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor bearing mice. J Immunol 1995; 15: 4926-4932
- 47.- Tossi Z, Ellner J. The role of TGFb in the pathogenesis of human tuberculosis. Clin Immunol Immunopathol 1998; 87: 107-114.
- 48.- Hirsch C, Ellner J, Blinkhorn R, Tossi Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor beta. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 3926-3931.
- 49.- Massagué, J. (1998). TGF- $\beta$  signal transduction. Annu Rev Biochem 67, 753-791.
- 50.- Esparza-López, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and López-Casillas, F. (2001). Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of transforming growth factor- $\beta$  superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor- $\beta$  and inhibin A. J Biol Chem 276, 14588-14596.
- 51.- Vilchis-Landeros, M. M., Montiel, J. L., Mendoza, V., Mendoza-Hernández, G., and López-Casillas, F. (2001). Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- $\beta$  neutralizing agent. Biochemical Journal 355, 215-222.
- 52.-Bloom, B. R. and Murray, C. J., Tuberculosis commentary on a reemergent killer. Science 1992. **257**:1055-1064.
- 53.-Nardell, E. A., Environmental control of tuberculosis. Med. Clin. North Am. 1993, **77**:1315-1334.
- 54.-Hill, A. V., The immunogenetics of human infectious diseases. Annu. Rev. Immunol. 1998. **16**:593-617.
- 55.-Bellamy, R. C., Ruwende, T. C., Corrah, T. K. P., Mc Adams, K. P., Whittle, H. C. and Hill, A. V., Variation in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. N. Engl. J. Med. 1998. **338**:640-644.
- 56.-Stead, W. W., Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? Ann. Intern. Med. 1992. **116**:937-941.
- 57.-Kramnik, I., Dietrich, W. F., Demant, P. and Bloom, B. R., Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Nat. Acad. Sci. 2000. **97**:8560-8565.
- 58.- Van Embden, J. D. A., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. W., Gicquel, B., Hermans, P. W. M., Martin, C., Mc Adam, R. and Schinnick, T., Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993. **31**:406-409.
- 59.-Van Soolingen, D., 1996. Use of DNA fingerprinting in the epidemiology of tuberculosis. PhD thesis, Utrecht University. pp 174-195.
- 60.-Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., de Haas, P. E. W., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakus, M. A., Musser, J. M. and van Embden, J. D. A., Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J. Clin. Microbiol. 1999. **37**:2607-2618.
- 61.-Van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E. W., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J. D. A., Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J. Clin. Microbiol. 1995. **33**:3234-3238.
- 62.-López B, Aguilar LD, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernández Pando R, Huygen K, van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. Clin Exp Immunol 2003, **133**: 30-37.
- 63.- Wayne LG. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;**13**:908-14.
64. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Organ 1994; **72**:213-20.

65. van Rie A, Warren R, Richardson M, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999; 341:1174-9.
66. Fine PE, Small PM. Exogenous reinfection in tuberculosis. *N Eng J M* 1999; 341:1226-7.
- 67.- Dickinson JM, Mitchinson DA. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampisin in the chemotherapy of tuberculosis. *Am Rev Respi Dis* 1981; 123: 367-371.
- 68.- Opie EL, Aronson JD. Tubercle bacilli in latent tuberculosis lesions and in lung tissue without tuberculosis lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1927;4:1-21.
- 69.- Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, Rook GAW, Bjune G. Persistence of DNA from *M. tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *The Lancet*; 2000, 356: 2133-2138.
- 70.- Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook, GAW, Hernández Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculosis infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 229-237.
- 71.- Mapother ME, Songer JG. In vitro interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1984;45:67-73.
- 72.- Ramakrishnan L, Falkow S. *Mycobacterium marinum* persists in cultured mammalian cells in a temperature-restricted fashion. *Infect Immun* 1994;62:3222-9.
73. Shepard CC. Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in HeLa cells. *J. Exp. Med.* 1956;105:39-55.
- 74.- Rea TH, Modlin RL. Immunopathology of leprosy skin lesions. *Semin. Dermatol.* 1991;10:188-193.
- 75.-Filley EA, Rook GAW. Effect of mycobacteria on sensitivity to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 1991;59:2567-2572.
76. Filley EA, Bull HA, Dowd PM, Rook GAW. The effect of *Mycobacterium tuberculosis* on the susceptibility of human cells to the stimulatory and toxic effects of Tumour Necrosis Factor. *Immunology* 1992;77:505-509.
- 77.- Seah, G. T., and G. A. W. Rook. High levels of mRNA encoding IL-4 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients revealed by quantitative nested RT-PCR; correlations with serum IgE levels. *Scand. J. Infect. Dis.* 2000; 33:106-109.
- 78.- Seah, G. T., G. M. Scott, and G. A. Rook. Type 2 Cytokine Gene Activation and Its Relationship to Extent of Disease in Patients with Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:385-389.
- 79.- Brown DH, Miles BA, Zwilling BS. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in BCG resistant and susceptible mice: establishment of latency and reactivation. *Infect Immun* 1995, 63: 2243-2247.

## INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL

### Resumen.

Además de su significado clínico y epidemiológico, la tuberculosis también es un fascinante modelo para estudiar el proceso inmunopatológico. Debido a su carácter crónico, la infección tuberculosa puede producir alteraciones al sistema inmune, por ejemplo, la supresión inmune de las células que median la respuesta inmune (CMI), daño tisular (necrosis y fibrosis), estimulación policlonal B la cual está relacionada con fenómenos de autoinmunidad y las enfermedades del complejo inmune. Otro aspecto signficante es la infección latente, condición en la cual, algunos bacilos vivos permanecen en los tejidos, en un estado no-replicativo o ligeramente replicativo, durante el resto de la vida del individuo infectado. Sin embargo, el fenómeno más importante de la tuberculosis para los inmunólogos es la caracterización de los eventos inmunológicos involucrados en la protección y los factores relacionados con la inmunopatología. A este respecto, una aproximación es el uso de animales de experimentación. En los ratones y el humano, la infección por tuberculosis es controlada por la CMI. Las citocinas Th1, del tipo del interferon gama ( $IFN\gamma$ ) y las citocinas proinflamatorias, del tipo del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) tienen un papel central en este proceso, induciendo la activación de los macrófagos y la expresión de la sintasa del óxido nítrico (iNOS). La producción del óxido nítrico (NO) es esencial para destruir a las micobacterias intracelulares. Esta actividad protectora falla si hay una alta liberación de las citocinas tipo Th2. Esta compleja interrelación entre las células inmunes y las citocinas ha sido desarrollada en el modelo experimental de tuberculosis

pulmonar en los ratones BALB/c infectados vía intratraqueal. En este modelo, la fase inicial está dominada por una alta producción de las citocinas Th1, que juntas con altos niveles de  $\text{TNF}\alpha$  y la iNOS, controlan la infección. Durante esta fase, hay un intenso desarrollo de granulomas. Un mes después de la infección, la expresión de las citocinas del tipo Th1, el  $\text{TNF}\alpha$  y la iNOS empiezan a disminuir. Este deterioro de la protección por la CMI durante la infección tuberculosa es manifestado por la disminución de DTH contra los antígenos micobacterianos, y una neumonía progresiva la cual prevalece sobre los granulomas. La neumonía, en coexistencia con un alto índice de bacterias, causa la muerte. Muchos factores participan en este desbalance inmunológico que permiten la progresión de la enfermedad, similares a lo observado con micobacterias hipervirulentas, por ejemplo, el exceso de prostaglandina E y la producción del factor de crecimiento beta, y la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales, entre otros. La manipulación de estos factores puede contribuir para implementar un control de la infección permitiendo así el desarrollo de terapias. Con respecto a la infección latente, los modelos experimentales desarrollados en animales pueden contribuir para demostrar que esta forma de tuberculosis es inducida y mantenida por las citocinas tipo Th1, y que los bacilos pueden estar presentes no solo en la infección en los macrófagos, sino también en otras células no fagocíticas profesionales, como los fibroblastos, el epitelio o endotelio. Así, los animales modelo pueden ayudar a entender la extrema complejidad de la respuesta inmune en la tuberculosis, y también pueden ser utilizados como una herramienta para evaluar nuevas vacunas y antibióticos.

**Palabras clave:** ; tuberculosis pulmonar; inmunopatología; infección tuberculosa; óxido nítrico; óxido nítrico sintasa.

## Semblanza del Dr. Rogelio Hernández Pando.



Nació el 3 de abril de 1956, es Médico Cirujano por la Universidad Nacional Autónoma de México y obtuvo la especialidad en Anatomía Patológica, en el Departamento de Patología del Hospital General de México, por la Facultad de Medicina de la UNAM. Posteriormente, realizó estudios de posgrado obteniendo la Maestría y el Doctorado en Investigación Biomédica Básica (Inmunología) Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Al término del posgrado partió a Inglaterra donde desarrolló una estancia posdoctoral en el Department of Microbiology, School of Pathology, University College of London UK. Fue invitado por The British Royal Society of Medicine para realizar una estancia de investigación en las Universidades de Londres y de Bristol. Actualmente es Investigador titular C. Jefe de la Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, pertenece al Sistema Nacional de Investigadores con el Nivel III. Su línea de investigación versa sobre la inmunopatología experimental y la Inmunopatología de la tuberculosis, el cual se ha publicado en 94 artículos internacionales y 11 capítulos de libros. Ha dirigido 8 tesis de posgrado, impartido 86 diferentes cursos académicos y presentado 90 trabajos en diferentes congresos. Ha recibido diversos premios, entre los que se encuentran el Premio Anual de Investigación en el Área de Ciencias Biomédicas, otorgado por el Instituto Nacional de Salud Pública (1996); el Premio al Tercer y Primer lugar en el Área de Investigación Experimental, otorgado por la Secretaría de Salud en el Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud (1996 y 1997, respectivamente); el Premio Institutos Nacionales de Salud en el área de Medicina Experimental, Otorgado por: Secretaría de Salud. Coordinación General de los Institutos de Salud (2000); el Premio



CARPERMOR, con Mención Honorífica (2001); el Premio “Jesús Kumate” en Investigación Biomédica Otorgado por: Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A. C. (2001); el Premio al Segundo Lugar del XVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Gto. (1998); el Premio CANIFARMA, Mención Honorífica, otorgado por la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (1999); el Premio a la Investigación del Instituto Politécnico Nacional (1998); el Premio Anual de Investigación Médica Dr. Jorge Rosenkranz, otorgado por el Grupo Roche Syntex (1997); y el Premio de Investigación Médica Roche Syntex, Área Básica. (1999).



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## LA ENSEÑANZA DE LA GLUCÓLISIS ORIENTADA A LA INGENIERÍA METABÓLICA Y APOYADA CON IMÁGENES.

**Gustavo Viniegra González, Saúl Álvarez Zapiain**

Departamento de Biotecnología  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa, D.F. México

### GLYCOLYSIS TEACHING AIMED TO THE METABOLIC ENGINEERING AND SUPPORTED WITH ILLUSTRATIONS

#### **Abstract.**

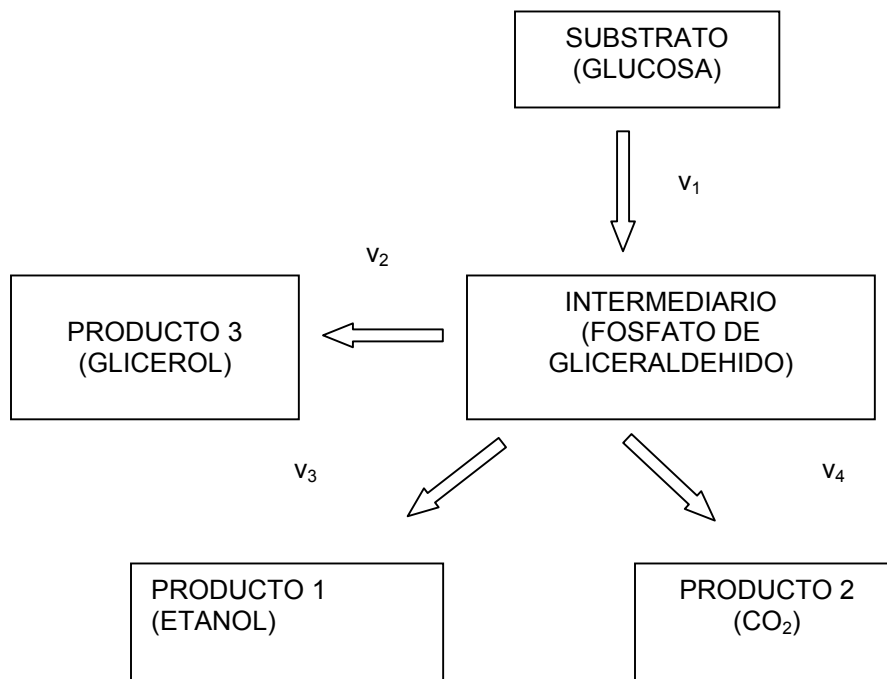
*This brief didactical essay tries to show that is possible to approach the teaching of metabolic pathways, such as glycolysis, using the practice and teaching of basic skills such as stoichiometric, thermodynamic and mechanistic analysis of chemical reactions, that later can be used to tackle more complicated problems related to metabolic engineering. This essay is based on two fundamental textbooks, written by Voet & Voet [1] and Nielsen et al., [2].*

**Keywords:** glycolysis; metabolic engineering; didactic; teaching; problem based learning

#### **Planteamiento del problema**

Desde el punto de vista formal, una vía metabólica puede ser vista como una red de reacciones, en las cuales, el Substrato (digamos la glucosa) está conectado con la formación de diversos productos llamados Metabolitos (por ejemplo: el glicerol, el etanol y el dióxido de carbono) como se muestra en la Figura 1. Las flechas que conectan al Substrato con los Metabolitos, tienen compuestos intermediarios, de manera que es posible establecer balances de materia entre ellos, si se asocia un flujo, (v) con cada flecha. Cuando las reacciones no están ramificadas y

están en serie, los flujos de la cadena de reacciones deben ser iguales para que el sistema se encuentre en equilibrio dinámico o estado estacionario. Si la red está ramificada, debe haber balance entre las entradas y salidas de cada nodo. Por ejemplo, si mostramos, en la Figura 1, los flujos de compuestos carbonados, obtenemos  $v_1 = v_2 + v_3 + v_4$ . Que no es sino una expresión algebraica del principio de conservación de la materia “Nada se crea ni se destruye, sólo se transforma” descubierto, a fines del siglo XVIII, por Antón Lavoisier.



**Figura 1.** Esquema de una vía metabólica

Para que los alumnos que cursan bioquímica puedan entender y aplicar ese principio a diversos problemas de control metabólico, es preciso que estén familiarizados con los llamados balances estequiométricos. Y además, puedan utilizar las nociones básicas de la físico-química y la química orgánica. Lamentablemente, la enseñanza de la bioquímica se ha orientado, en forma tradicional, a la memorización de una larga serie de compuestos orgánicos con nombres raros y estructuras que tienen poco que ver con la experiencia cotidiana de los alumnos. Quizás por esa razón, la bioquímica se ha vuelto una disciplina poco atractiva y difícil de comprender para muchas generaciones de estudiantes en carreras tan diversas como las áreas médicas, las ciencias químicas y la ingeniería ligada a los alimentos o a la biotecnología.

El propósito de este ensayo es utilizar un texto avanzado de bioquímica de amplia divulgación, como el de Voet & Voet [1], como guía. Pero, mostrando de qué forma se pueden generar preguntas y ejercicios que motiven al estudiante para deducir la estructura de los compuestos y la naturaleza de las reacciones que son parte de la primera vía dilucidada en la historia de la bioquímica: la glucólisis.

Otro problema didáctico muy importante es el entendimiento de la estereo isomería en las transformaciones bioquímicas. Los textos avanzados como el propio Voet & Voet [1], la describen sucintamente, pero su comprensión requiere de apoyos visuales mejores que los dibujos de un libro o los que pueda hacer el profesor en el pizarrón. Afortunadamente, el uso de programas como el Power Point, permite visualizar imágenes con apariencia tridimensional y, además, animadas con movimientos de flechas u objetos manejados por medio de controles manuales. De esa forma, se puede disponer de imágenes tridimensionales complejas de: proteínas, sitios activos y esquemas pro-quirales de reacción, que puedan servir al profesor y a sus ayudantes para apoyar el desarrollo de ejercicios manuales de construcción de modelos moleculares, para que se entienda la importancia de la especificidad enzimática en muchas de las reacciones metabólicas estudiadas.

Para lograr este fin, se ha recurrido a desarrollar en Power Point un conjunto de diapositivas coloridas, con animación controlada desde la computadora y utilizando imágenes disponibles a través de Internet desde el Protein Data Bank ( <http://www.rcsb.org/pdb/> ). Esto, con el propósito expreso de familiarizar al estudiante con ejemplos detallados de uno de los conceptos fundamentales de la bioquímica, la estrecha interacción entre la estructura y el funcionamiento de las proteínas con acción catalítica o enzimas.

## **Desarrollo histórico y mecanístico.**

### **a) *Vitalismos vs. Mecanicismo***

En vez de plantear en forma lineal la existencia de una vía metabólica como la glucólisis, se propone aquí plantear el problema histórico de su descubrimiento. En el Voet & Voet [1] se destaca la importancia del descubrimiento de la fermentación alcohólica abiótica (sin células) que realizó el científico alemán Eduard Buchner, quien pudo separar el citosol o jugo celular de las células rotas, mediante el uso de un mortero provisto con arena fina para romper células de levadura y un filtro de vidrio poroso diseñado por él [3]. De esa forma se demostró que no era necesaria la integridad celular para transformar la glucosa en etanol y dióxido de carbono, siempre que hubiese algunas sales minerales, como fosfatos, en el líquido fermentativo. La pregunta obvia que se plantearon Buchner y otros investigadores fue la dilucidación de la cadena de reacciones que permitían la fermentación del azúcar.

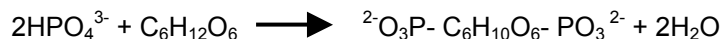
Este descubrimiento, realizado en 1897 por Eduard Buchner (1860-1917) dio lugar a que en 1907 se le otorgase el premio Nobel por sus investigaciones bioquímicas llevadas a cabo en el Colegio de Agricultura de la Landwirtschaftliche Hochschule de Berlín. Según se indicó en el discurso oficial del conde K.A.H. Mörner (1907), Presidente de la Real Academia de Ciencias de Suecia, el 10 de diciembre de ese año. El descubrimiento de Buchner permitió eliminar la idea que “los fenómenos (de los procesos químicos que tienen lugar en los seres vivos) eran gobernados por leyes especiales no disponibles a nosotros y controladas por la llamada ‘fuerza viviente’” [4]. Es decir, Buchner dio un paso decisivo para construir la explicación materialista y *meccanicista* de la vida, por oposición a la creencia persistente hasta principios del siglo XX que la vida seguía leyes externas a los mecanismos de las reacciones químicas de la materia, corriente que se llamaba *vitalismo*.

En las palabras del conde Mörner (1907), “E. Buchner, después de muchos años de trabajo, logró mostrar que la fermentación alcohólica podía producirse por jugos extraídos de células de levadura, libres de las células vivas. El demostró de manera incontrovertible, que esta fermentación era debida a un fermento producido por las levaduras, de las cuales podía ser separado. La fermentación no es una expresión directa de la vida de las levaduras; las células pueden ser muertas y destruidas, y los fermentos perduran”

Este episodio de la historia puede dar lugar a que los estudiantes busquen en Internet y en la biblioteca el origen del debate de los “vitalistas” apoyados por los experimentos de Pasteur (1854 a 1864) y de los “mecanicistas” apoyados por Berzelius sobre la naturaleza de las transformaciones que ocurren en la materia viva. De ahí, convendría estimular a los alumnos para que investigaran el significado de la palabra “fermento” y “enzima” que tienen la misma raíz etimológica, el primero en latín (*fermentum*) y el segundo del griego (ζψμοσ) y vienen de observaciones empíricas sobre el uso de fermentos para producir el pan. Por ejemplo: los panes ázimos (αζψμοσ) son los panes o galletas hechos sin levaduras, es decir, sin fermentos y son los que usan los judíos, con el nombre de “matzá” como penitencia durante la Cuaresma. ¿Por qué los panes ázimos son distintos del pan con levaduras? ¿Qué proceso ocurre durante la incubación de la masa con las levaduras? ¿Cuáles son los sustratos y los productos? ¿Por qué se pueden usar levaduras secas en vez de levaduras frescas? ¿Por qué se pueden usar los asientos del pulque, (“xastle”), para hacer pan de muertos, llamado pan de pulque? ¿En qué son similares la industria de la cerveza de la industria del pan, en cuanto a procesos químicos?

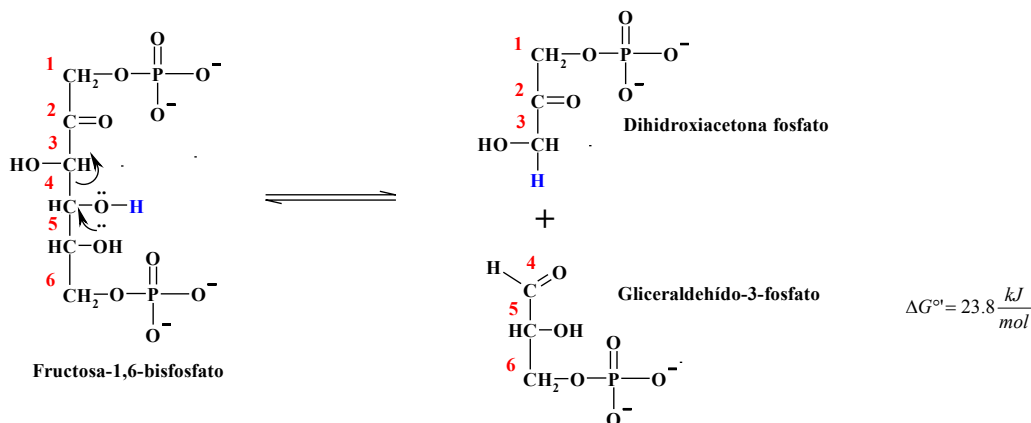
#### **b) La reacción de la aldolasa como pivote didáctico de la glucólisis**

Una vez planteado el problema de investigación “cuáles serán las reacciones químicas que transforman la glucosa en alcohol y dióxido de carbono”, viene el problema de cómo investigarlo. Y de ahí conviene destacar el uso de inhibidores metabólicos como el yoduro de acetato (I-CH<sub>2</sub>-COOH) que da lugar a la acumulación de la Fructosa 1.6 Bifosfato. (F1,6BF) Esto explica la observación de la necesidad de añadir fosfatos al medio de fermentación para que ocurra el proceso. Tal resultado permite al profesor el uso de la estequiometría, para establecer el balance de fosfatos en la primera parte de la glucólisis.



El análisis de las estructuras, también facilita imaginar cómo se lleva a cabo el rompimiento, porque la adición de NaF al medio de reacción produce la acumulación del 3-Fosfoglicerato (3FG), el cual, al reducirse (R-COOH  $\longrightarrow$  R-CHO +  $\frac{1}{2}\text{O}_2$ ) produce el Gliceraldehído 3 Fosfato (GA3F), mostrado en la parte baja derecha de la Figura 2. Ahora, si se compara la estructura de la Fructosa 1.6 Bifosfato. (F1,6BF) con la de 3FG, se puede deducir que para que se forme la F1,6BF se requiere de otra molécula de tres carbonos: la Di-Hidrox-Acetona 3-Fosfato (DHA3F) que también se muestra en la Figura 2. Para aclarar el mecanismo de la síntesis (y de ahí del rompimiento) de la F1,6BF se requiere utilizar el concepto de condensación aldólica.

De aquí se puede inferir que la F1,6BF se divide en dos moléculas de tres carbonos cada una. La molécula que falta es la Dihidrox-Acetona 3 Fosfato. (DHA3F). Las dos triosas pueden dar lugar a dos formas de condensación aldólica.

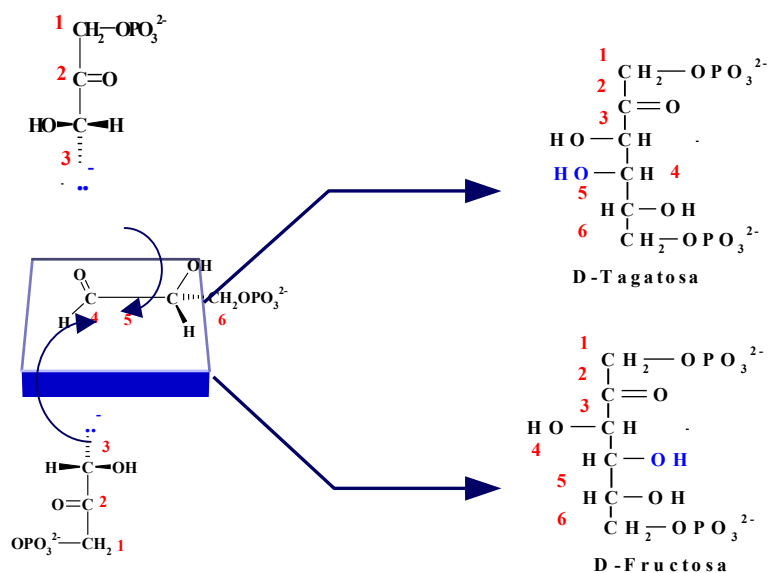


1,6-Bifosfato (F1,6BF) (reacción de la enzima llamada aldolasa).

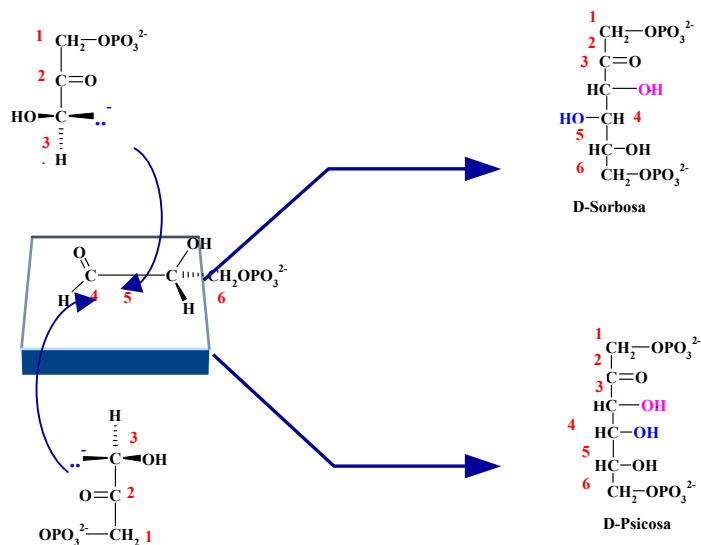
- El ataque de un carbanión formado por uno de los dos hidrógenos del carbono 3 de la DHA3F (Figura 2) que ataca al carbonilo del GA3F. Este ataque puede llevarse a cabo por arriba o por abajo del plano del GA3F (Figuras 3 y 4). Si se genera un carbanión con el hidrógeno abajo del plano del papel (línea punteada en la Figura 3), se daría lugar a la formación de los azúcares D-Tagatosa o D-Fructosa (Fig. 3).
- Si el carbanión es formado con el hidrógeno en la DHA3F, arriba del plano del papel (cuña en la Figura 4) se daría lugar a la formación de los azúcares D-Psicosa y D-Sorbosa mostrados en la Fig. 4.

Sin embargo, en las células sólo se forma la D-Fructosa. Esto indica que la proteína catalítica llamada aldolasa, que activa la reacción de rompimiento reversible de la F1,6BF sólo tiene una forma de reacción de las cuatro posibles mostradas en las Figuras. 3 y 4, e ilustra la especificidad de las reacciones bioquímicas, frente a la relativa inespecificidad de las reacciones de la química orgánica ordinaria. En este punto se ofrece la oportunidad de explicar:

- ¿Qué es una molécula quiral?
- ¿Cómo se establece la nomenclatura Cahn-Ingold-Prelog en R y S estructuras quirales?
- ¿Qué significan las estructuras pro-quirales?
- ¿Cómo se producen los isómeros R o S, según el ataque de un reactante sobre una estructura pro-quiral (por ejemplo, DHA3F)?
- ¿Cómo se construyen modelos físicos de los azúcares, que representen la quiralidad de cada átomo con sustituyentes asimétricos?
- ¿Cómo se deduce el ataque correcto de la condensación aldólica de las triosas, para producir el bifosfato de fructosa?
- ¿Qué podemos aprender de la reacción inversa (condensación aldólica) sobre el mecanismo de la ruptura de la F1,6BF en las dos triosas correspondientes?
- ¿Por qué y cómo la enzima regula en forma completa la quiralidad de las moléculas resultantes, en la reacción inversa de condensación?
- ¿Cómo será el mecanismo de la enzima aldolasa que cataliza el rompimiento de la F1,6BF en dos triosas?



**Figura 3.** Ataque del carbanión (RHOCH<sup>-</sup>) de la DHA3F sobre el carbonilo (R-CO) del GA3F para generar el racemato D-Tagatosa y D-Fructosa. Nótese que el hidrógeno que ha sido eliminado (-) en la posición 3 de la DHA3F está abajo del plano. Sólo se muestra el ataque en el cual DHAF se aproxima por arriba para generar la D-Fructosa, pero se requiere considerar el ataque simétrico (por abajo) para generar la D-Tagatosa.



**Figura 4.** Ataque del carbanión (RHOCH<sup>-</sup>) del FDHA sobre el carbonilo (R-CO) F3GA para generar el racemato D-Tagatosa y D-Psicosa. Nótese que el hidrógeno que ha sido eliminado (-) en la posición 3 de la DHA está arriba del plano. Sólo se muestra el ataque en el cual FDHA se aproxima por arriba para generar la D-Psicosa, pero se requiere considerar el ataque por abajo del plano del carbonilo para generar la D-Sorbose.

La ventaja de haber iniciado el estudio de la glucólisis por la condensación aldólica de la F1,6BF, radica en que difícilmente el alumno olvidará este paso de reacción y por lo tanto le será fácil imaginar y recordar el conjunto de reacciones hacia la glucosa y hacia el piruvato, sin tener que recurrir a un ejercicio de memorización mecánica.

Por ejemplo: entre la Glucosa y la F1,6BF hay sólo tres reacciones, una de fosforilación, catalizada por la enzima hexocinasa, pues no es específica para la Glucosa y puede fosforilar a otras hexosas (Figura 5). Otra de isomerización para formar la Fructosa 6 Fosfato (F6F) mostrada en la Figura 6. Y, la segunda fosforilación, para formar la F1,6BF (Figura 7).

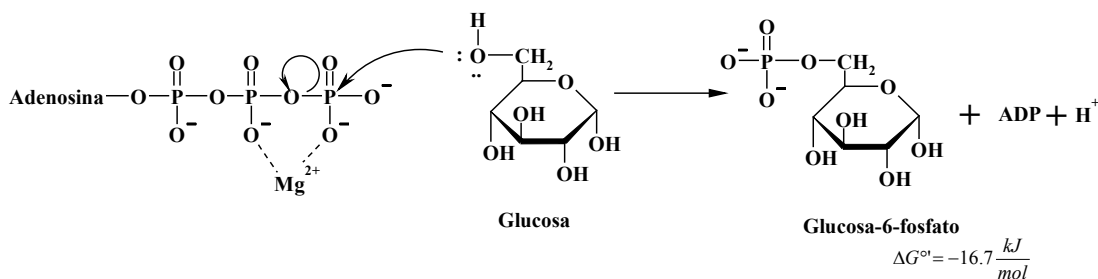
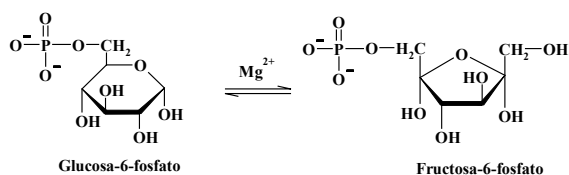
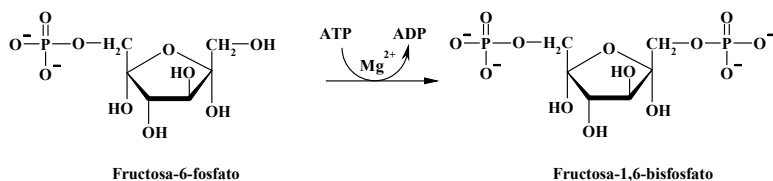


Figura 5. Reacción catalizada por la hexocinasa.



$$\Delta G^\circ = -1.7 \frac{kJ}{mol}$$

Figura 6. Reacción catalizada por la Glucosa-fructosa isomerasa.



$$\Delta G^\circ = -14.2 \frac{kJ}{mol}$$

Figura 7. Fosforilación para formar la Fructosa 1,6-Bifosfato (F 1.6 BF). Reacción catalizada por la Fosfofructocinasa I.



De paso, se tendrá que recurrir a mostrar la importancia fundamental de los tautomerismos ceto enólicos que son claves para entender la estabilidad de los compuestos intermediarios. El ejercicio de construir las cuatro hexosas posibles de la condensación aldólica de las triosas, combinado con el dato de que sólo se produce en la célula a la fructosa, da material para que se hagan ejercicios con modelos moleculares rústicos contruidos con pelotitas de estireno y palillos. De forma que los alumnos entiendan en forma dinámica y participativa, la diferencia entre un ataque pro-R y otro pro-S,

### **c) La hexosa y la relación entre la estructura de la enzima y su funcionamiento**

Aquí cabe indicar la importancia de los cambios conformacionales de las cinasas, que tienen el sitio activo protegido del acceso del agua, de forma que el ataque de los fosforilos del ATP es preferencial sobre el ataque de los OH<sup>-</sup> del agua. De otra forma, se favorecería la hidrólisis del ATP. Para hacerlo conviene utilizar las ligas informáticas con el Protein Data Bank, mostrando la opción que permite ilustrar la fijación de la glucosa a la enzima.



Esta propiedad se puede ejemplificar mediante el estudio de las conformaciones de la hexocinasa libre de sustrato y la que tiene el sustrato. En el segundo caso, la enzima se ha replegado como si fuese una almeja bivalva que se cierra cuando entran los dos sustratos: la Glucosa y el ATP y se abre cuando se libera el ADP y la Glucosa 6 Fosfato. Lo cual, permite ilustrar el nivel de entendimiento y de relación entre estructura, reacción y mecanismos de la bioquímica contemporánea.

Aquí la interacción entre el material visual de Power Point con el ejercicio manual de los modelos moleculares provee al estudiante una alternativa de aprendizaje que es muy superior a la enseñanza tradicional. Es muy recomendable que la exposición teórica de esta reacción clave, sea seguida de al menos una sesión práctica con el apoyo de un asistente o del profesor. Muchas de las frustraciones de los estudiantes al estudiar bioquímica vienen de la dificultad de imaginar estructuras complejas a partir de diagramas de libro.

En resumen, este es un ejemplo del proceso integrativo y constructivista para imaginar y descubrir la naturaleza de la glucólisis que se entiende mucho mejor mediante ejemplos y problemas que mediante proposiciones abstractas o deducciones lógicas lineales.

### **d) La fosforilación a nivel del sustrato**

La razón fisiológica de ser de la glucólisis es desde luego, la formación del ATP, a pesar de que se han gastado 2 ATP para producir una molécula de F1,6BF. Para recuperar esta pérdida y superarla se requiere repetir 4 veces el proceso de formación del ATP, a partir del ADP. Y para ello las enzimas han evolucionado un complejo sistema de reacciones sucesivas que podríamos llamar el método de “un clavo saca a otro clavo”.

En este proceso, es esencial comprender la regla fundamental de acoplamiento termodinámico de procesos o reacciones entre sí. Esta regla está sustentada en la idea de que,

en cualquier proceso espontáneo, el cambio de energía libre de Gibbs (energía disponible para hacer trabajo) debe ser negativo. Así, cuando hay  $N$  procesos acoplados, cada uno con un valor  $\Delta G_i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ ) que puede ser negativo o positivo, la regla de composición indica que la suma de todos ellos, debe ser negativa. Por ejemplo: si la síntesis del ATP tiene una energía,  $\Delta G_1^\circ = 30.5 \text{ kJ/mol}$ , para acoplar esta síntesis con la hidrólisis de otro compuesto fosforilado con  $\Delta G_2^\circ < 0$ , se requiere que la suma de las dos energías libres sea negativa

$$\Delta G_T^\circ = \Delta G_1^\circ + \Delta G_2^\circ < 0$$

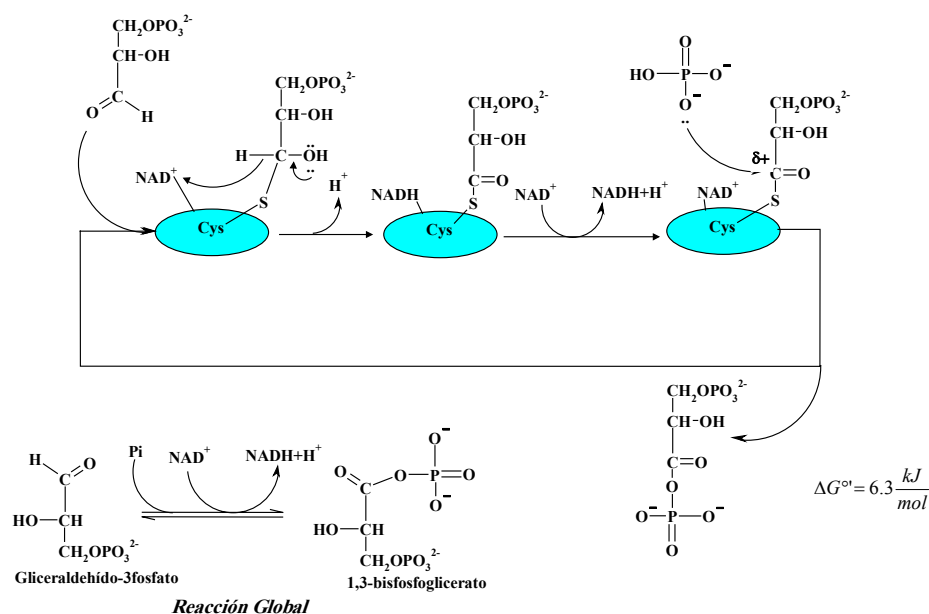
Esto implica que  $\Delta G_2^\circ < -30.5 \text{ kJ/mol}$ . Y esto simplifica mucho la selección de candidatos para acoplarse con la síntesis de ATP, pues basta consultar una tabla en la que estén consignados los valores de  $\Delta G^\circ$ , como aparece en la Tabla I, para que podamos seleccionar al candidato adecuado. En la nomenclatura química, el símbolo  $\Delta G^\circ$ , significa el valor calculado en el equilibrio y el  $\Delta G$ , a secas, bajo condiciones que pueden estar fuera del equilibrio. Esto puede ocurrir en procesos dinámicos como los celulares en los cuales, los flujos bioquímicos producen desviaciones prolongadas de las condiciones del equilibrio, debido a balances entre la producción y consumo de cada uno de los elementos de una cadena metabólica. Pero para el fin educativo de este escrito, por el momento podemos conformarnos con las condiciones en equilibrio.

Por ejemplo: en la Figura 8, se muestra de manera esquemática que el proceso de “clavar” y “desclavar” compuestos nucleofílicos ocurre en un sitio activo que tiene un grupo R-SH, es decir, en una cisteína. El grupo R-SH puede ionizarse como si fuese un R-OH, generando el nucleófilo (amante de núcleos)  $\text{R-S}^-$ . Este nucleófilo puede atacar a un átomo de carbono, (un carbonilo)  $\text{R-C=O-H}$ , que tiene una carga parcialmente positiva por el efecto electro negativo del oxígeno. En esa figura, se indica que el carbonilo corresponde al aldehído de la triosa. Además, el sitio activo de la enzima, en una posición cercana a la cisteína activa, tiene afinidad por la coenzima  $\text{NAD}^+$  (forma oxidada) que atraerá un hidrógeno del hemiacetal formado sobre la cisteína (véase Figura 8) Como el hemi-acetal es inestable, se forma un carbonilo y se libera otro hidrógeno que sale al medio como protón. Pero por la casualidad, lograda por la evolución biológica, que el NADH tiene menos afinidad por el sitio activo que el  $\text{NAD}^+$ , y se presenta un recambio que libera una coenzima reducida (NADH) al medio de reacción, dejando el clavo de  $\text{NAD}^+$  adentro. El otro clavo dentro del sitio, que es la triosa, debe ser eliminado por otro ataque nucleofílico. Esa vez será el  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , que atacará al carbonilo unido a la cisteína (Figura 8) Esta última reacción regenera la configuración original de una enzima con  $\text{NAD}^+$  y la cisteína con R-SH libre, lista para un nuevo ataque por otra molécula de un carbonilo.

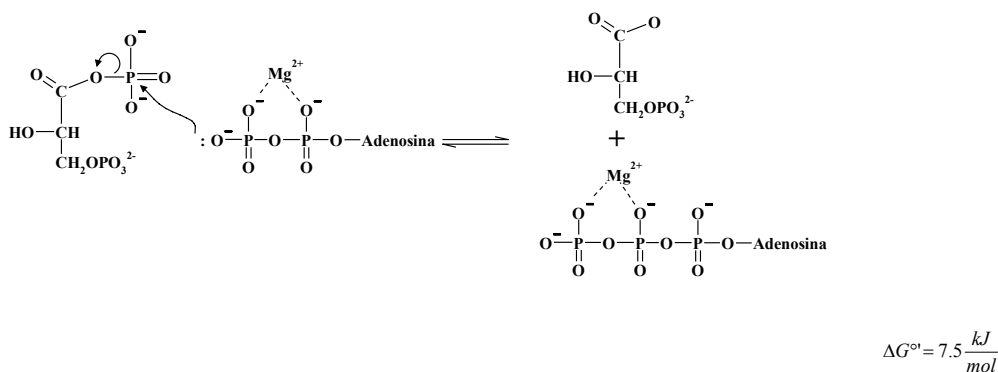
Dicha reacción ha permitido formar un compuesto de alta energía, el 1,3BFG (1,3 Bisfosfo Glicerato) cuya  $\Delta G^\circ = -49.4 \text{ kJ/mol}$ , permite acoplar la hidrólisis del fosfato en posición 1, con la reacción de formación de ATP ( $\Delta G^\circ = +30.5 \text{ kJ/mol}$ ), según se indica en la Figura 9 y en la Tabla I. El resultado neto es una  $\Delta G^\circ = -18.9 \text{ kJ/mol}$ , la cual, siendo negativa hace factible el acoplamiento de estas dos reacciones. Pero, examinando, la Tabla I, se puede concluir que sería imposible acoplar la hidrólisis del 3-Fosfoglicerato ( $\Delta G^\circ = -9.2 \text{ kJ/mol}$ ) con la formación de ATP.

Si se continúa el examen de la Tabla I, se puede comprobar que la hidrólisis del ácido Fosfoenolpirúvico tiene un  $\Delta G^\circ = -61.9 \text{ kJ/mol}$ , de forma que esta reacción se podría acoplar con

la síntesis de ATP, lo cual explica que la glucólisis haya evolucionado para formar esta triosa a partir del Fosfato-3-de Glicerato. Esto facilita entender las últimas reacciones de la Glucólisis. Primero, isomerización del 3-Fosfo Glicerato en el 2-Fosfo Glicerato, mostrado en la Figura 10. Seguido de la formación del Fosfoenolpiruvato mostrado en la Figura 11. Al final, la hidrólisis de este último compuesto se acopla con la síntesis del ATP y la formación del ácido pirúvico (Figura 12).



**Figura 8.** Oxidación y fosforilación del Gliceraldehído 3 Fosfato (GA3F) para convertirlo en el Bifosfato del Ácido Glicérico (BAG). Se destaca la participación del grupo -SH de la cisteína (Cys) del sitio activo (ver texto).



**Figura 9.** Formación del ATP a partir del ADP y del 1,3 Bi Fosfo Glicerato (BFG).

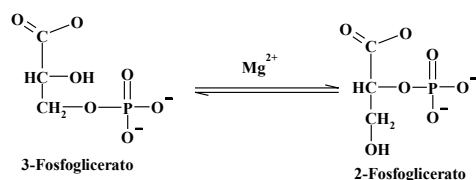
El resultado neto de este proceso puede expresarse por la siguiente ecuación química



**Tabla I .Energías libres de Gibbs standard ( $\Delta G^\circ$ ) de la hidrólisis de fosfatos orgánicos de interés biológico (Según Voet & Voet, 2004)**

| Compuesto                                         | $\Delta G^\circ$ (kJ/mol) |
|---------------------------------------------------|---------------------------|
| Fosfo-enol-piruvato                               | <b>-61.9</b>              |
| 1,3-Bifosfo-glicerato                             | <b>-49.4</b>              |
| Fosfato de acetilo                                | <b>-43.1</b>              |
| Fosfato de creatina                               | <b>-43.1</b>              |
| Pirofosfato ( $\text{PP}_i$ )                     | <b>-33.5</b>              |
| $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$ | -32.2                     |
| $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$  | -30.5                     |
| Fosfato-1-de Glucosilo                            | -20.9                     |
| Fosfato-6-de Fructosilo                           | -13.8                     |
| Fosfato-6-de Glucosilo                            | -13.8                     |
| Fosfato-3-de Glicerilo                            | -9.2                      |

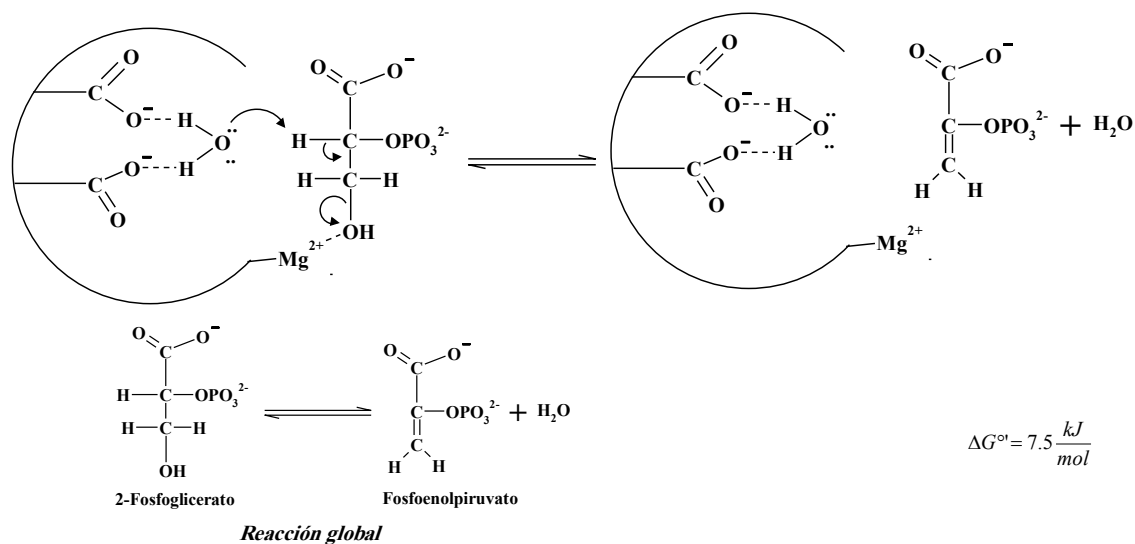
En negritas, se indican los fosfatos orgánicos que pueden acoplarse a la síntesis de ATP.



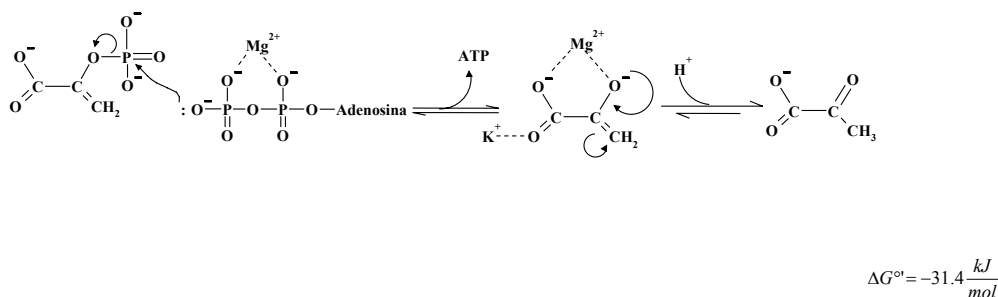
$$\Delta G^\circ = 4.4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

**Figura 10.** Isomerización entre el 3-Fosfo Glicerato (3FG) y el 2-Fosfo Glicerato (2FG).

El factor limitante de este proceso es la cantidad de NAD disponible, porque su concentración es muy baja dentro de las células y su biosíntesis, costosa. En cambio, los fosfatos inorgánicos se pueden encontrar con facilidad en muchos medios donde se desarrollan los seres vivos. Por lo tanto, es necesario encontrar un proceso adicional que permita la regeneración del NAD, mediante el consumo del NADH, lo cual puede dar lugar a distintos tipos de las llamadas fermentaciones.



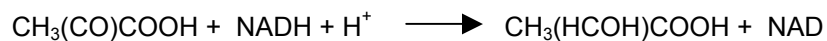
**Figura 11.** Reacción catalizada por la enzima enolasa que transforma el 2-Fosfo Glicerato en el Fosfoenolpiruvato.



**Figura 12.** Formación del ATP a partir del Fosfoenolpiruvato y el ADP.

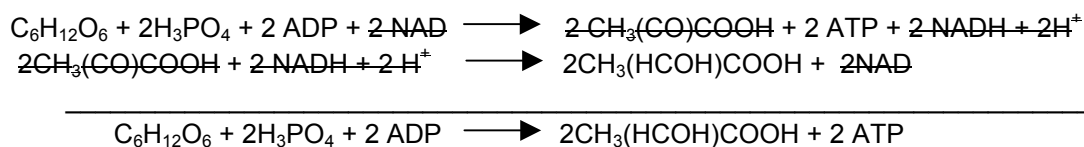
### e) La fermentación láctica y el destino del NADH

La fermentación más sencilla es la fermentación láctica que sigue la siguiente estequiometría



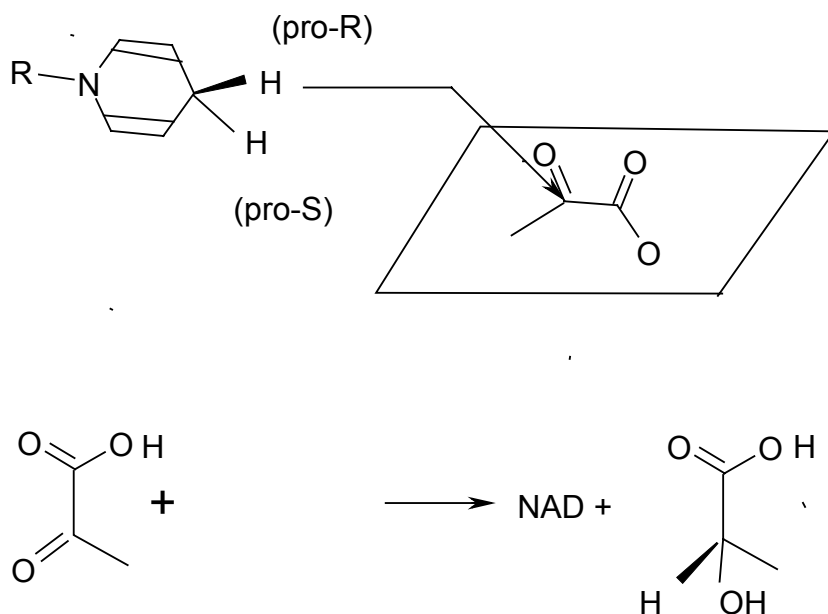
La Figura 13 ilustra esta reacción, indicando que la parte reactiva del NADH (esquina superior izquierda de la Figura 13) es la nicotinamida reducida, que tiene dos hidrógenos en la posición 4, opuesta al sustituyente, R, de la citada figura. De esta manera, se puede tener un

proceso cíclico, pues al sumar la ecuación de formación del piruvato con la de formación del lactato, se cancela la acumulación del NADH.

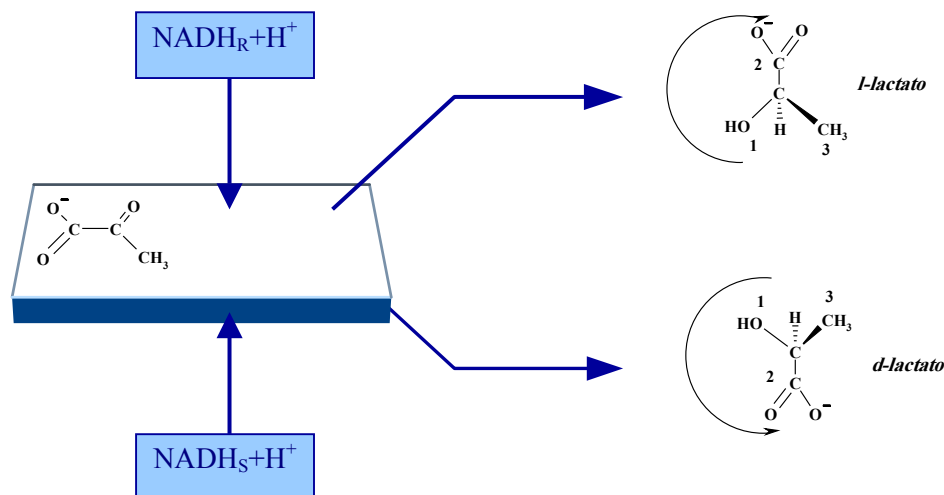


Estos dos procesos, permiten reusar indefinidamente al  $\text{NAD}^+$ , mientras haya consumo de sustrato ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) y suministro de fosfatos.

Las Figuras 13 y 14, muestran que el ataque del NADH sobre el piruvato puede ser de dos maneras alternativas: la forma pro R, ilustrada por el ataque por arriba del plano del piruvato y la forma pro S, por debajo de dicho plano (no mostrada en la Fig. 13). En el primer caso se forma el L- lactato. El caso opuesto da lugar al D-lactato.



**Figura 13,** Ilustración del mecanismo de transferencia de hidrógenos en la fermentación láctica. Se indica la existencia de dos átomos proquirales (pro-R y pro-S) de hidrógeno en la molécula del NADH. Uno arriba del plano y el otro debajo. La molécula del piruvato mostrada en la esquina superior derecha de la figura, puede ser atacada por arriba o por debajo del plano, dando lugar a las forma L- ó D- lactato, que corresponden a las formas S o R.

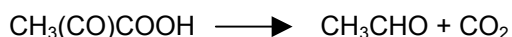


**Figura 14.** Ilustración de la formación de los isómeros quirales del lactato.

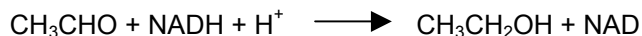
En el cuerpo humano sólo se metaboliza el L-lactato, de forma que al ingerirse un racemato (L-D) se puede producir acidosis por la acumulación del D-lactato. Algunos microorganismos pueden producir selectivamente una de esas formas y por eso es posible producir en la industria, las formas l (R) o d (S) por separado.

#### f) La fermentación alcohólica y las fermentaciones de Neuberg

Otro esquema metabólico para el reciclaje del NAD, es la fermentación alcohólica que permite la oxidación del acetaldehído ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) el cual se produce por la descarboxilación del piruvato.

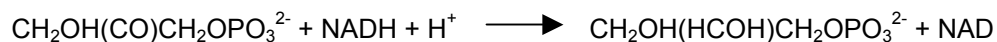


A su vez, el acetaldehído se puede reducir para producir etanol, consumiendo  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .



Este proceso ocurre principalmente en las células de las levaduras y es la forma industrial para producir alcohol.

Sin embargo, existe una forma alternativa para consumir el NADH y es la producción del glicerol, mediante la reducción de la Hidroxi Acetona 3 Fosfato.



Si se consulta la Tabla I, se verá que la reacción de hidrólisis del Fosfato de Glicerilo, tiene un  $\Delta G^\circ = -9.2 \text{ kJ/mol}$ . Lo cual, impediría acoplar esta reacción con la síntesis del ATP.

Por lo tanto, el consumo del NADH para formar glicerol da lugar a la pérdida neta de ATP, que ha sido consumido para la fosforilación de las hexosas. A diferencia del consumo de NADH para formar etanol, que da lugar a una ganancia de ATP. Como, de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, es preciso disipar energía para mantener activo cualquier proceso, se puede deducir que el rendimiento máximo de glicerol debe ser inferior al 50% del azúcar suministrado porque, con un rendimiento del 50% sería equivalente a una máquina de movimiento perpetuo, que trabajase sin disipación de energía.

Una consecuencia de estos balances es la reorientación de la fermentación de las levaduras según se cambie el valor del pH del medio. Esto fue descubierto por Neuberg antes de 1920 y se explicó como el efecto del pH sobre las deshidrogenasas: alcohólica que trabaja mejor a pH 4 y del Fosfato de Glicerilo, que trabaja mejor a pH neutro. La Figura 15 muestra que al elevarse el pH, desciende la producción de etanol y asciende la de glicerol, en forma completamente recíproca.

Este fue quizás el primer ejemplo de manipulación deliberada del metabolismo celular para producir un producto industrial, el glicerol. Su uso como materia prima para la fabricación de la nitro-glicerina, justificó en Alemania de principios del siglo XX, el costo de separación del etanol y de otros productos como el ácido acético. Neuberg logró mayores rendimientos de glicerol al añadir sulfito de sodio que atrapa al acetaldehído e impide la producción del etanol. De esa forma, se forzó aún más la producción de glicerol que nunca llegó a más del 30%.

Se podría decir que la ingeniería metabólica se inició con las fermentaciones de Neuberg, usando un inhibidor químico (el sulfito de sodio) del proceso natural de producción del alcohol por las levaduras. Desde este temprano caso de manipulación intencionada del metabolismo celular, se utilizó el balance de materia y los conceptos fundamentales de la termodinámica para estimar los rendimientos máximos y para explicar la naturaleza química del proceso. Por lo tanto es un excelente ejemplo para justificar el uso de dichos balances en el desarrollo de nuevos procesos bioquímicos manipulados por el ser humano.

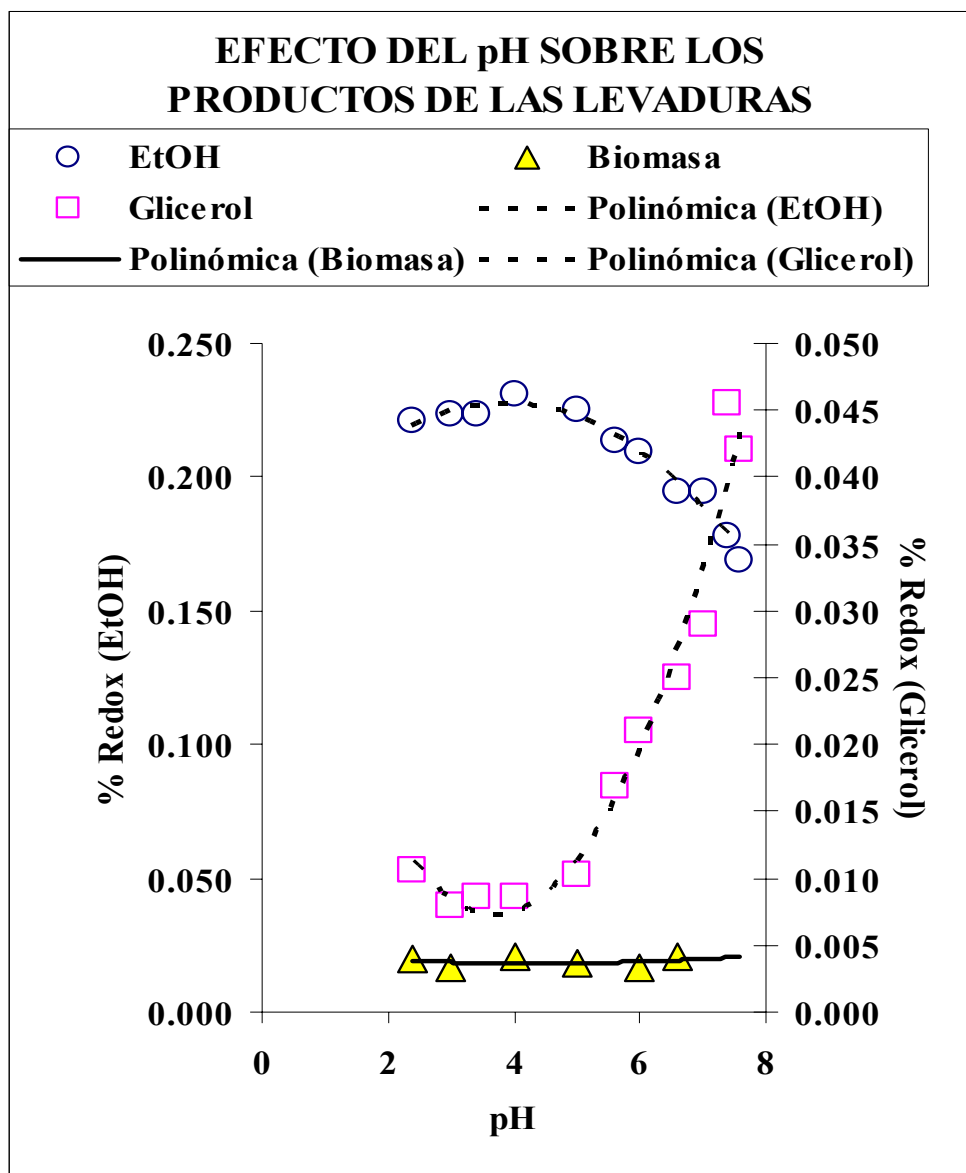
## Conclusiones

Se propone analizar la secuencia aparentemente interrumpida y caótica del razonamiento previo en función del propósito didáctico de enseñar la glucólisis de una manera más dinámica y atractiva que el método tradicional, de tipo lineal y secuencial.

En este ensayo se ha procurado utilizar el procedimiento llamado constructivista, que consiste en utilizar ejemplos e ilustraciones para deducir principios. Por ejemplo: se utilizó la evidencia del uso de inhibidores (ácido yodo acético y fluoruros) que bloquean la fermentación y facilitan el aislamiento de intermediarios. Y a partir de la estructura de esos intermediarios, se dedujo la estructura química de los precursores (las hexosas como precursoras de las triosas).

A su vez, se utilizaron los mecanismos de la química orgánica, en este caso la condensación aldólica, para ilustrar la importancia de la estereo química y la lógica del mecanismo de reacción de la enzima clave en el rompimiento: la aldolasa, cuyo nombre proviene precisamente de considerar la inversa de la condensación aldólica.





**Figura 15.** Efecto del pH sobre el patrón de producción de etanol y glicerol en un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. Las curvas punteadas fueron ajustadas por medio de un ajuste cuadrático de los puntos experimentales. Datos de Neish y Blackwood [5].

Este inicio heterodoxo facilita mucho la comprensión del esquema de la glucólisis. Tiene una mitad que se traduce en la transformación de las hexosas y otra mitad de las triosas. Además, facilita el entendimiento de la importancia de la isomerización de la glucosa en fructosa, pues de esa forma se facilita el mecanismo de rompimiento aldólico. Cosa que sería muy difícil con el carbonilo en el extremo de la hexosa.

El concepto de acoplamiento energético de las reacciones también facilita el entendimiento de los compuestos que dan lugar a la síntesis del ATP, pues la consulta con las tablas de energía libre de Gibbs permite ver la necesidad de tener ciertos compuestos de alta energía como los donadores de fosfato para sintetizar el ATP. De otra forma resulta incomprensible la madeja de conversiones de las triosas entre sí.

Finalmente, el balance redox, centrado en el par NAD, NADH, resulta un excelente pretexto para introducir el concepto de ingeniería metabólica, como la manipulación deliberada del metabolismo celular, por medios artificiales. En el caso de las fermentaciones de Neuberg, mediante el uso de inhibidores de la formación de etanol.

Un repaso sintético (no mostrado en este texto) mediante la enumeración de las reacciones secuenciales de la vía glucolítica resultará en la integración del conocimiento y un refuerzo a la memoria y a la coherencia del proceso aquí ilustrado.

El uso de imágenes de tipo tridimensional ya ha sido utilizado por los autores de los libros modernos como el de Voet & Voet (2004) El cual, se suministra con un CD-ROM que permite bajar imágenes de Internet acerca de las conformaciones de las proteínas. Esto puede ser ligado, sin mucha dificultad, con programas convencionales como el de Power Point y de esa manera se reforzará el entendimiento entre estructura y función de las enzimas. Una discusión detallada de esos casos queda fuera del espacio restringido de este ensayo didáctico pero ya ha sido preparado para los apuntes que pronto serán puestos en la dirección de Internet de nuestro curso impartido en la UAM.

## Referencias básicas

1. Voet, D., Voet, J., (2004) Biochemistry, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons Inc. Hoboken, N.J. USA
2. Nielsen, J., Villadsen, J. and Lidén G. (2003) Bioreaction Engineering Principles. 2<sup>nd</sup> Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
3. Buchner, E. (1907) "Cell free fermentation" Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, Netherlands (1966). (<http://www.nobel.se/chemistry/laureates>).
4. Mörner KAH (1907) "The Nobel Prize in Chemistry 1907" Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, Netherlands (1966). (<http://www.nobel.se/chemistry/laureates>).
5. Neish AC, Blackwood AC (1951) "Dissimilation of glucose by yeast at poised hydrogen ion concentrations" Canad. J. Tech. 29(2): 123-129.

## LA ENSEÑANZA DE LA GLUCÓLISIS ORIENTADA A LA INGENIERÍA METABÓLICA Y APOYADA CON IMÁGENES.

### Resumen.

En este breve ensayo didáctico se pretende mostrar que es posible orientar la enseñanza de una vía metabólica muy conocida, como es la glucólisis, usando como motivación el desarrollo de habilidades y destrezas elementales, que después serán usadas para atacar problemas más complicados como la ingeniería metabólica. Como guía documental para este ensayo se han utilizado dos textos fundamentales. El de Voet y Voet [1] y el de Nielsen et al., [2].

**Palabras clave:** glucólisis; ingeniería metabólica; didáctica; enseñanza; aprendizaje basado en problemas; constructivismo.

## **Semblanza del Dr. Gustavo Viniegra González.**



Nació en México en 1940. Obtuvo el grado de Médico Cirujano en la Universidad nacional Autónoma de México en 1965. Posteriormente se graduó en la Maestría en Ciencias (Bioquímica) del CINVESTAV en 1967 y de Doctor en Biofísica en la Universidad de California, San Francisco, en 1971. Actualmente es Profesor Titular C del Departamento de Biotecnología, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI), donde fue miembro de la Junta Directiva entre 1982 y 1990. Es miembro Emérito del Sistema Nacional de Investigadores. Su área de especialización involucra la microbiología industrial; las fermentaciones de sustratos sólidos por hongos filamentosos; la producción de enzimas por cultivos de *Aspergillus niger*; el aprovechamiento de los residuos agrícolas y agroindustriales; el desarrollo de modelos matemáticos del crecimiento de hongos filamentosos en sustratos sólidos; las estrategias para desarrollar tecnologías agroindustriales; y la asesoría a empresas agro-industriales para mejoras de procesos de transformación y de conservación del medio ambiente. Ha publicado 63 artículos internacionales; 14 artículos internacionales de revisión; 26 artículos nacionales; 20 artículos nacionales de revisión y 4 patentes, con lo que ha recogido más de 300 citas bibliográficas internacionales. Bajo su dirección se han obtenido 6 tesis de Licenciatura, 15 de Maestría y 7 de Doctorado. Ha recibido diversos premios como: el Premio Nacional al Mérito en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (1985); Profesor Distinguido de la UAM (1996); Doctor *honoris causa*, Université Aix-en-Provence, Marsella, Francia; Caballero de la Orden de las Palmas Académicas otorgado por el Ministerio de Educación, Francia; Ha pertenecido a diferentes organizaciones: Miembro de la Academia Mexicana de Ciencias (1985); fue miembro Fundador de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC (1981) donde fue Vicepresidente (1983-1985) y Presidente (1985-1987); Ha sido miembro del comité científico del International Life Sciences Institute (ILSI) de México, A.C (Biotecnología); asesor del Centro de Investigación y Desarrollo del Grupo Resistol S. A (mejoras a procesos de un consorcio azucarero); asesor de la Cámara Nacional de la Industria Azucarera (negociación sobre los aranceles de los azúcares fructosados); asesor de la Subdirección de Investigación del Instituto Mexicano del Petróleo; Directeur de Recherche 2ème degré, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM, ahora IRD) Montpellier, France (Veranos, 1989 y 1993); Dictaminador del Área de Ingeniería y Tecnología del Sistema Nacional de Investigaciones (1996-1998). Además, organizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM entre 1972 y 1976, el primer grupo de investigación biotecnológica con desarrollos aplicados a la industria; contribuyó en la UAMI al arranque y organización del Departamento de Biotecnología (1976-1978), donde se han desarrollado los siguientes programas académicos: el diseño de las carreras de Ingeniería Bioquímica e Ingeniería de los Alimentos (1977-1982), las mejoras del Tronco General de Asignaturas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (1993-1995), el programa de Posgrado en Biotecnología (1992) y el programa del Doctorado en Ciencias Biológicas (1993-1994). Organizó y fue el primer Jefe del Área de Microbiología (1976-1984) en el Departamento de Biotecnología de la UAM-I. Ha participado, en cooperación con la organización francesa llamada ORSTOM (ahora Institut de Recherche pour le Développement = IRD), en la formación de uno de los grupos de investigación de la fermentación en medio sólido más citados en la bibliografía especializada.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## PARTICIPACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Félix Recillas Targa y Martín Escamilla Del Arenal

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510.

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

### ROLE OF CHROMATIN STRUCTURE INTO GENE EXPRESSION

#### Abstract

*Regulation of gene expression in eukaryotes represents a central process in cell differentiation, proliferation and death. Gene regulation includes the binding of sites-specific transcription factors to the DNA and the recruitment of co-factors. In his natural milieu, all this processes occurs in the chromatin context in which histone modifications are one of the primordial targets. More recently the nuclear organization and dynamics with a broad and direct biological implications on gene expression has been the topic of intense research. Thus regulation of gene expression can be visualized in general terms at three different levels all of them interdependently related. The first level involves the genetic information codified by the DNA molecule. The second involves the natural context, in which the DNA is functional. It is based on the genome organization into chromatin and all the associated chromatin remodeling activities also known as epigenetic regulation. And finally, resent set of experimental data supports a more active and dynamic role of the cell nuclei on the regulation of gene expression. In the present chapter, we review the current knowledge on regulatory elements, the general transcription factors involved on transcription initiation, and we integrate all such information taking into consideration the chromatin structure and the contribution of the cell nucleus to the differential gene expression in eukaryotic cells.*

**Keywords:** Transcription, gene regulation, chromatin, nucleus, histone modifications.

#### Introducción

La complejidad adquirida por el genoma eucariota a través de la evolución ha requerido, a la par, el desarrollo de múltiples niveles de regulación, para poder llevar a cabo la expresión

genética de manera ordenada y permitir el desarrollo de un organismo. La regulación transcripcional se ha dividido en 3 niveles (1). El primero lo encontramos a nivel de las secuencias nucleotídicas que se codifican en la molécula de ADN. El segundo nivel involucra la estructura de la cromatina, donde la regulación de la expresión de un gen no solo depende de la información codificada en la secuencia del ADN, sino también de su organización en cromatina y la regulación epigenética asociada a ésta. Considerando a la regulación epigenética como los patrones heredables de la expresión de un gen, que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del ADN (2). El tercer nivel involucra la organización espacial del genoma al interior del núcleo.

En el presente capítulo revisaremos los principales niveles de regulación de la expresión transcripcional de un gen y el papel que desempeña en ella la estructura de la cromatina; todos estos procesos enmarcados en el entorno del núcleo de la célula. También mencionaremos la participación de las diferentes secuencias de control, cuyas funciones se ejecutan a grandes distancias, entre las cuales se encuentran los silenciadores ("silencers"), los potenciadores ("enhancers"), los elementos de control del locus (LCRs) y la formación de dominios transcripcionalmente activos.

## I- Elementos de Regulación

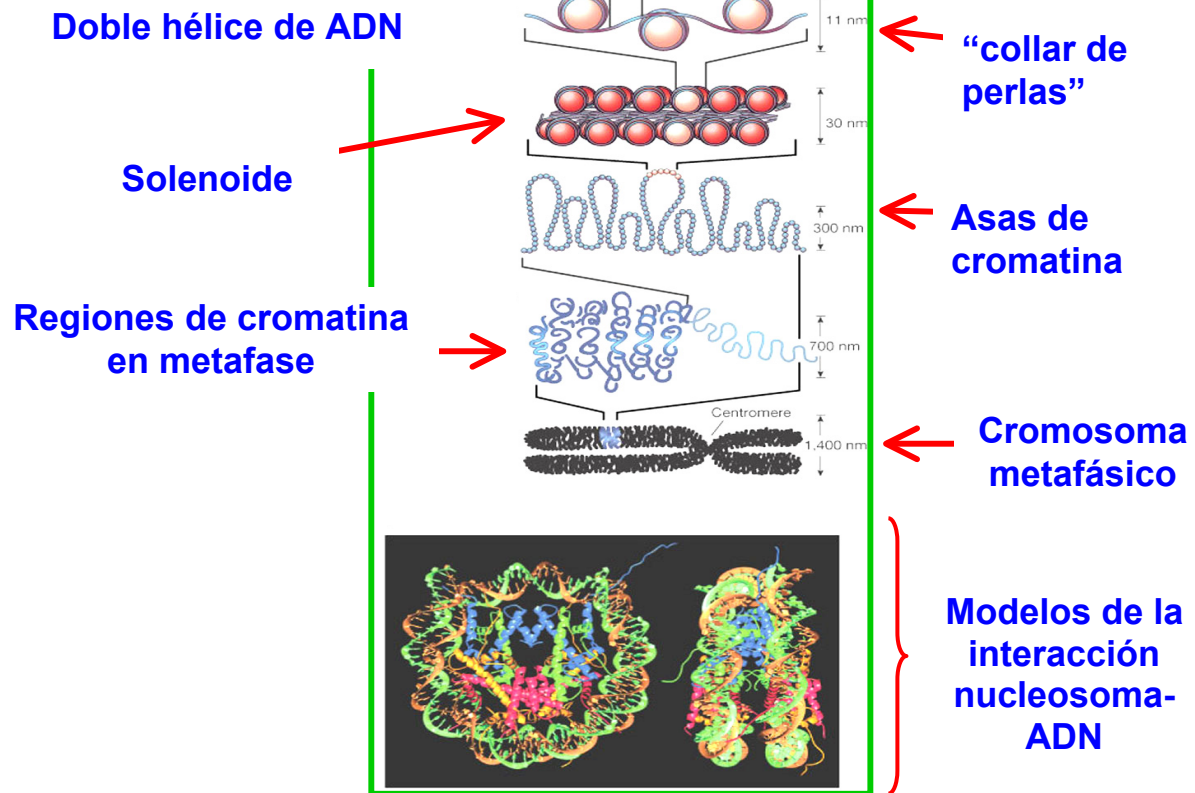
Las características que definen a una célula están dadas por las proteínas que la constituyen, las cuales son el resultado de patrones específicos de la expresión de sus genes (2). Un gen que codifica para un ARN mensajero está constituido por un segmento determinado de la cadena de ADN, involucrado en la síntesis de una cadena polipeptídica, es decir, de una proteína. Un punto crucial en la determinación de los patrones de expresión, está dado por los factores transcripcionales que reconocen secuencias nucleotídicas en el ADN, principalmente en las regiones promotoras de los genes (2). La interacción de estos factores con sus secuencias reguladoras, desencadena eventos que tendrán como resultado la activación o la represión de un gen ó grupos de genes.

Los organismos superiores tales como la levadura y el humano están constituidos por células de origen eucariota; lo anterior significa que tienen su ADN compartimentalizado en el núcleo. Al interior de este núcleo, el ADN no se encuentra disperso, por el contrario, se estructura a través de interacciones proteína-ADN formando el complejo que conocemos como cromatina la cual permite contener al genoma en el interior del núcleo celular (Fig. 1). La unidad

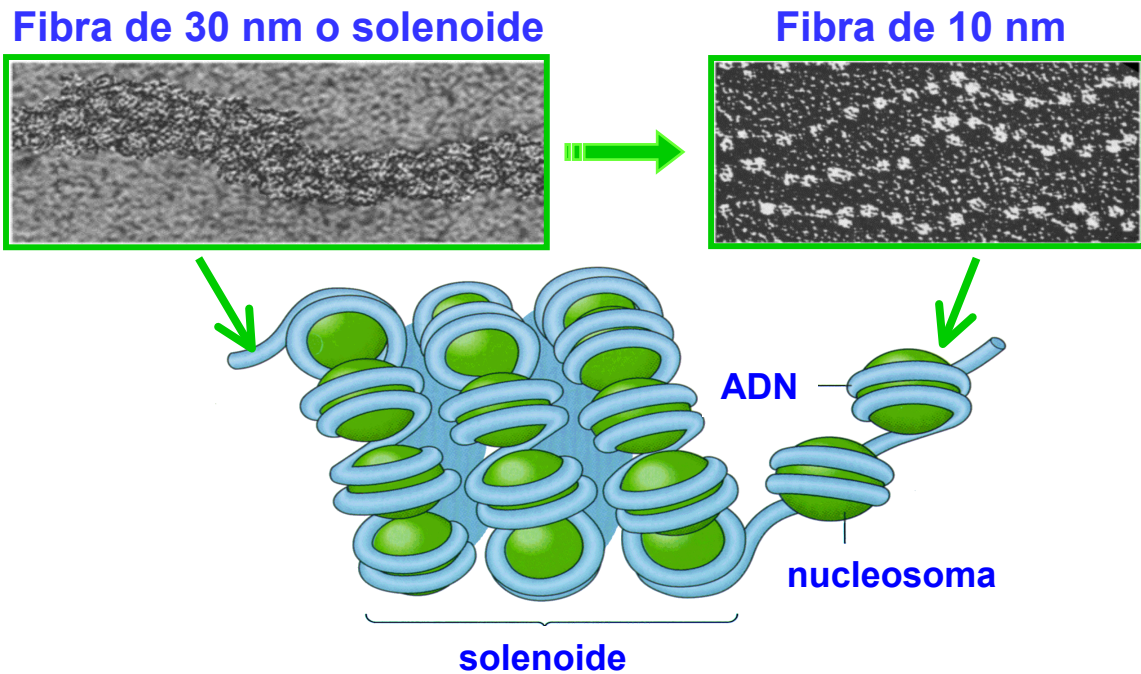
---

**Figura 1.** Distintos niveles de estructuración del genoma en la cromatina. A- El nivel primario de compactación del genoma está dado por el nucleosoma donde se encuentran interaccionando 147 pb de ADN, a lo que se conoce también como la fibra de 10 nm. Con la incorporación de una quinta histona, la histona H1 se pasa al nivel superior de compactación representada por un grupo de seis nucleosomas llamado solenoide o fibra de 30 nm. Posteriormente y en su estructura de solenoide se forman asas de cromatina que abarcan centenas de kilo bases. Poco se sabe sobre los mecanismos de compactación entre el solenoide y el nivel superior de compactación que es el cromosoma metafásico, estructura necesaria para la segregación de los cromosomas durante la mitosis. En la parte inferior se muestra un esquema de la estructura nucleosomal asociada al ADN (2). B- El solenoide constituye el medio ambiente natural donde deben llevarse a cabo todas los eventos de regulación, en particular el remodelaje de su propia estructura. En este esquema se muestran microscopías electrónicas de la fibra de 10 y 30 nm.

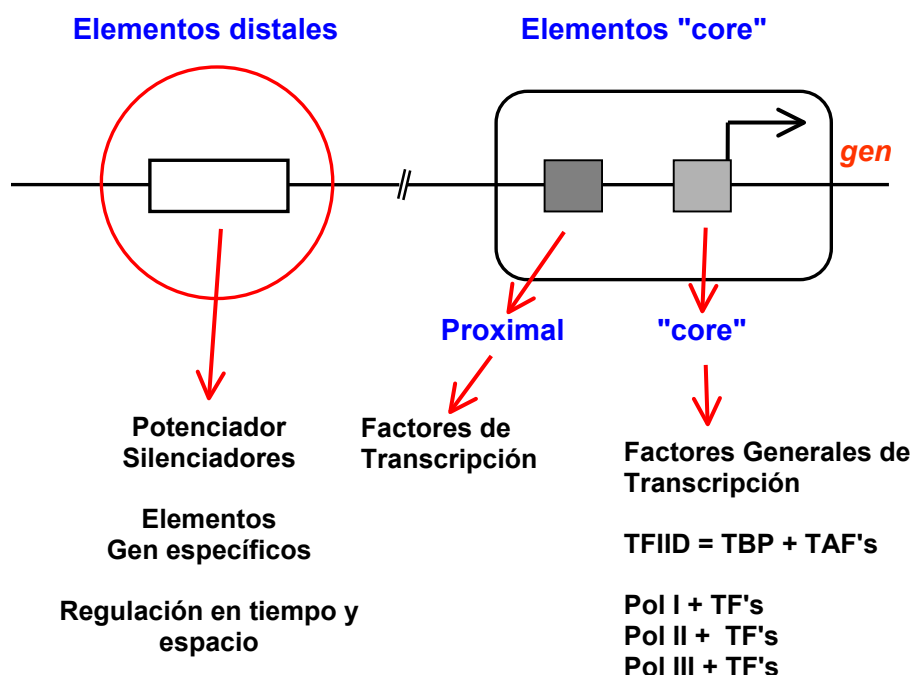
**A**



**B**



fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual esta constituido por el octámero de histonas (dos de cada una de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual interaccionan 147 pares de bases (pb) de ADN. Esta estructuración en cromatina, traerá como consecuencia una inaccesibilidad a las proteínas reguladoras que reconocen secuencias blanco en el ADN (2). Existen múltiples niveles de compactación del ADN siendo el cromosoma en metafase el nivel más elevado (Fig. 1A; 2, 3). Cabe mencionar que la gran mayoría de los eventos de remodelaje de la estructura de la cromatina ocurren en la fibra de 30 nm, también conocida como solenoide (Fig. 1B).



**Figura 2.** Esquema de los dos tipos de elementos de regulación que intervienen en el control de la expresión génica. El promotor está compuesto por el elemento "core" que se localiza cercano al sitio de inicio de la transcripción y donde encontramos a la caja TATA, secuencia a la cual se asocian el TBP, el TFIID, la RNAPol-II y el resto del complejo de preiniciación e iniciación de la transcripción. En un intervalo de 10 a 200 pb se encuentra el elemento proximal donde se incorporan factores transcripcionales tanto específicos como generales con la capacidad de formar puentes moleculares tanto con los TAF's del complejo TFIID o con los componentes del Mediador/srb asociado a la CTD de la RNA pol-II. Para completar el escenario, los elementos distales pueden localizarse a gran distancia tanto en el extremo 5' como en el 3' en relación con el gen y tienen la función de aumentar tanto los niveles de expresión de un gen como su especificidad (6).

Evolutivamente la organización del genoma eucariote en la cromatina, permite que éste sea contenido al interior del núcleo. Dado el elevado nivel de compactación del genoma, la



estructura de la cromatina se vuelve un obstáculo para la actividad transcripcional, es decir, para la expresión de los genes. Por lo anterior, es necesario remodelar dicha estructura represora para permitir la expresión regulada de los genes. Por lo tanto, el entender cómo se expresa un gen depende en gran medida de la capacidad de remodelar la estructura de la cromatina tanto al nivel de sus regiones control como de sus secuencias codificantes y no codificantes.

A continuación describiremos a los diferentes elementos de regulación para tratar de entender cómo los complejos de iniciación de la transcripción pueden activar de manera regulada la expresión de un gen.

#### *Regulación al nivel de secuencia.*

El desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de los organismos eucariotes, requiere de la regulación y expresión coordinada de cientos de genes. La expresión de éstos es controlada por una gran variedad de mecanismos, donde la cascada de eventos que preceden a la transcripción tiene como blanco final a las secuencias de ADN conocidas como promotores y al el sitio de inicio de la transcripción asociado a éstos (Fig. 2; 4-6).

La regulación al nivel de secuencia nucleotídica es la mejor estudiada. En ella se involucran a los elementos en *cis*, tales como los promotores, los potenciadores y los silenciadores. La función de estos elementos es dependiente de la atracción de las proteínas denominadas como los factores transcripcionales que se unen a las secuencias específicas en el ADN, de las interacciones proteína-proteína entre cofactores y de un conjunto de moléculas cuya finalidad es remodelar la estructura de la cromatina (1, 2).

### **Promotores**

Un promotor se define como la secuencia continua de ADN que es suficiente para dirigir la correcta iniciación de la transcripción de un gen mediada por la RNA polimerasa II (RNA pol-II) (4-9). Estas secuencias suelen encontrarse cercanas al sitio de inicio de la transcripción dentro de un intervalo que va de +20 a -30 en relación con el sitio de inicio de la transcripción (también conocido como el +1) las cuales se denominan elementos "core" del promotor (Fig. 2).

En las secuencias promotoras, existen diferentes motivos consenso de unión al ADN (Fig. 2; 8, 9), entre los más comunes encontramos a la caja TATA, los elementos iniciadores (Inr), los elementos de reconocimiento para el factor TFIIB (BRE) y los elementos promotores río abajo (DPE). Estos motivos de unión al ADN, suelen encontrarse en las secuencias promotoras, ya sea de manera individual o en diferentes combinaciones o acompañadas de otras secuencias que se mencionaran más adelante (5, 8, 9). Distintas combinaciones de estas secuencias constituyen los que se conoce como la "arquitectura" del promotor la cual permite establecer una combinación única y selectiva para el reconocimiento de moléculas reguladoras.

Un segundo grupo de las secuencias de regulación, es conocido como "elementos distales de regulación génica" (3, 6, 10). Éstos participan en la regulación otorgando una expresión en el tiempo y tejido específicos. Entre estas secuencias encontramos a los potenciadores, los silenciadores y los elementos aisladores. Todos estos elementos contienen



motivos de reconocimiento en el ADN, tanto para factores transcripcionales generales como específicos, que participarán de manera precisa y coordinada en la regulación transcripcional.

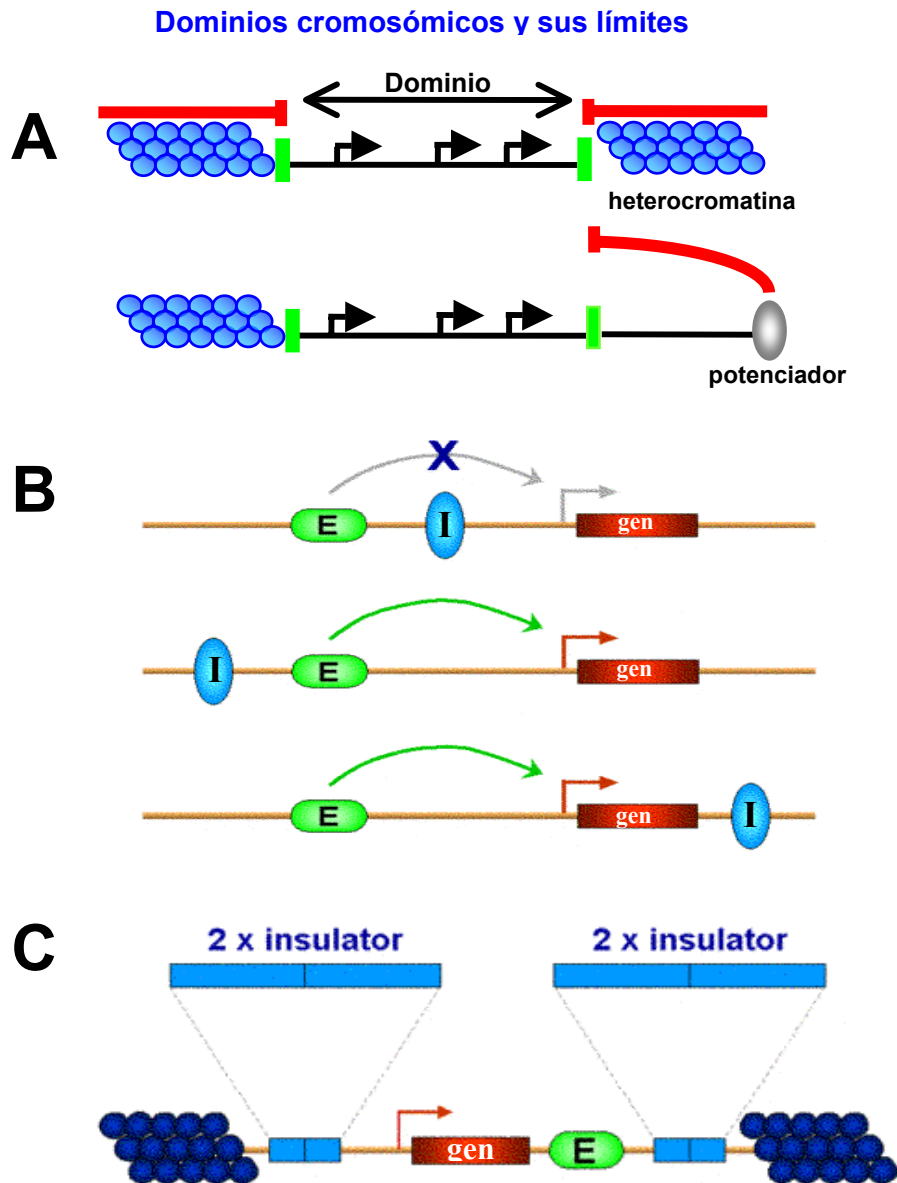
### **Potenciadores o "Enhancers"**

Los potenciadores son elementos de regulación en cuya secuencia interaccionan proteínas que transmitirán a distancia señales de activación específica (8). Los potenciadores fueron originalmente identificados como secuencias en *cis*, que pueden incrementar la transcripción de un gen, independientemente de la orientación y de la distancia a la que se encuentren en relación con el sitio de inicio de la transcripción (8).

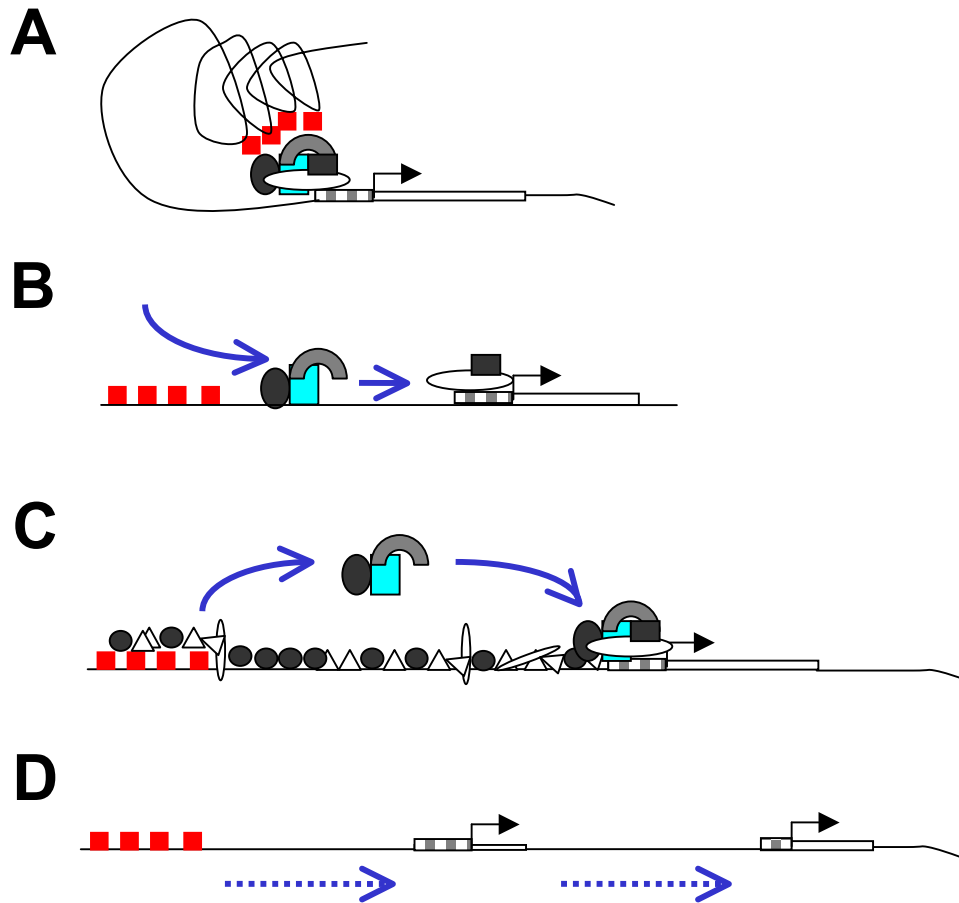
Al encontrar elementos de regulación que se podían situar a grandes distancias dentro de un intervalo que puede ir desde 200 pb hasta decenas e incluso centenas de kilo bases (kb) de los genes que están regulando, surgió el interés por comprender sus mecanismos de acción. Dentro de las diferentes propuestas para su funcionamiento en términos del incremento en la tasa transcripcional, el grupo de Kadonaga propuso que estos elementos podrían estar incrementando la probabilidad para que un gen se active en un momento dado de la diferenciación celular (8). Lo anterior significa que el potenciador estaría logrando que un mayor número de células activen transcripcionalmente a un gen en particular, lo que se conoce como el modelo de "encendido y apagado" (8). Un modelo alternativo sugiere que los potenciadores aumentan los niveles transcripcionales de manera homogénea en todas las células (8). Evidencias experimentales apoyan ambos modelos por lo que en la actualidad aún no se descifra el mecanismo *in vivo* de la activación a distancia por parte de un potenciador.

Las evidencias experimentales apoyan la idea de que estos elementos podrían estar interaccionando físicamente con la secuencia promotora del gen, a través de interacciones proteína-proteína, facilitando la formación de un asa. Lo anterior traería como consecuencia la formación de un complejo transcripcional, también conocido como holocomplejo, que facilita los procesos de la iniciación y la elongación en los que participa la RNA pol-II (3, 8). Esta interacción podría generar modificaciones a nivel de la estructura de la cromatina y de una manera regulada contrarrestar el efecto represivo por parte de ésta. Otra alternativa para la transcripción es la de facilitar o atraer diferentes actividades enzimáticas a la región promotora, como por ejemplo, la acetilación de histonas para relajar la estructura de la cromatina y favorecer la formación del complejo de preiniciación de la cromatina (CPT; 2, 3, 8, 9).

Uno de los modelos más novedosos para el funcionamiento de un potenciador, tiene que ver con el contexto tri-dimensional del núcleo. Donde el papel de los potenciadores sería el de relocalizar a un gen de las zonas transcripcionalmente inactivas, a regiones subnucleares donde se fomenta su activación (3, 10). Hay que recordar que los modelos antes descritos no son excluyentes entre ellos y que falta mucho trabajo para lograr comprender de manera detallada sus mecanismos de acción.



**Figura 3.** Organización del genoma eucariota en un dominio. Evidencias tanto bioquímicas como citológicas apoyan el concepto de una organización del genoma en dominios independientes. A- Recientemente se han descubierto un grupo de secuencias llamadas en inglés "insulators" o barrera (cajas verdes en el esquema) cuya función teórica es por un lado favorecer la formación de un dominio, es decir, la de facilitar la apertura de la cromatina al nivel de un dominio compuesto por uno o más genes. También se ha propuesto que sirven para mantener abierta esa región genómica y así evitar que la cromatina, en particular segmentos de heterocromatina, invadan y repriman la expresión de genes contenidos en el dominio. Además evitan la influencia inespecífica de elementos de regulación, como por ejemplo un potenciador, ajenos al dominio (17). B- Como parte de las propiedades funcionales de los "insulators" tenemos la actividad de bloqueo del potenciador, la cual es dependiente de su posición dado que la interferencia en la comunicación entre un enhancer (E) y su promotor ocurre únicamente cuando el "insulator" se encuentra entre ellos (17). C- La segunda propiedad funcional tiene que ver con la capacidad por parte de algunos "insulators" de proteger a un transgen de los efectos de posición causados por los distintos medios ambientes de la cromatina asociados al sitio de integración. Colocando a estas secuencias (2 x "insulators") es posible proteger al transgen del efecto de la cromatina circundante y a su vez mantener niveles de expresión constantes (17).



**Figura 4.** Modelos para el funcionamiento del LCR. A- Modelo de asa. Los factores transcripcionales interaccionan con el LCR, representado por las cajas rojas. El LCR forma un asa a través de múltiples interacciones entre factores transcripcionales con el promotor (cajas con diversas formas). B- Modelo de encarrilamiento ó “tracking” (3). Los factores transcripcionales se unen al LCR, forman un complejo que se encarrila a lo largo del ADN hasta encontrar al promotor que se activará. C- Modelo de relevo ó “linking” (3). Los diferentes factores transcripcionales se unen consecutivamente o forman un relevo molecular para favorecer interacciones a distancia entre el LCR y el promotor. D- Se ha planteado que el LCR podría estar contribuyendo en la apertura de la cromatina, dado que se han identificado transcritos intergénicos (flechas con líneas punteadas) a lo largo del *locus* que además inician en el LCR y son estadio y tejido específicos.

### Silenciadores

Los silenciadores se han definido como elementos a los que se unen factores nucleares que tienen un efecto negativo sobre la transcripción de manera independiente de su posición y orientación en relación con el sitio de inicio de la transcripción (11-13). Estos elementos poseen

una organización modular al igual que los potenciadores, pero con una función negativa sobre la expresión génica.

Además de los silenciadores clásicos se han definido secuencias denominadas elementos reguladores negativos, cuya actividad si es dependiente de su posición. Se ha propuesto que los mecanismos de acción de ambos elementos son diferentes, pues se cree que los silenciadores clásicos interfieren con el ensamblaje de la maquinaria transcripcional (13), mientras que los elementos reguladores negativos reclutan proteínas que interfieren con la fijación de otros factores transcripcionales a su sitio de unión al ADN. Esto ocurre en los elementos de regulación del extremo 5' afectando procesos de la regulación post-transcripcional como la edición de los intrones, la poliadenilación, los sitios de inicio de la traducción, la elongación y la estructura de la cromatina (14).

### **Delimitadores**

En años recientes se ha propuesto que los genes se encuentran organizados en regiones de la cromatina que se encuentran "abiertos" en un tiempo y espacio determinado del desarrollo. A estas regiones se les conoce como dominios cromosómicos transcripcionalmente activos (15). Se postula que éstos tienen límites bien definidos e incluyen a los elementos de regulación necesarios para llevar a cabo la regulación transcripcional de sus genes (Fig. 3A; 16).

Los límites están constituidos por lo que conocemos como los elementos frontera o delimitadores llamados en inglés: "insulators" o "boundary elements". Estos elementos frontera incluyen a las secuencias nucleotídicas que van de 0.5 a 3 kb, a las cuales se unen proteínas nucleares (17). Teóricamente los elementos frontera o "insulator" han sido propuestos como secuencias responsables de la formación y mantenimiento de un dominio o región en el cual un gen o grupo de genes se encuentran activos transcripcionalmente (15, 18). Funcionalmente los elementos frontera se definen por dos propiedades: 1) La capacidad de bloquear la acción positiva de un potenciador sobre su promotor siempre y cuando las secuencias tipo "insulator" se localicen entre el potenciador y el promotor (Fig. 3B) y 2) los elementos barrera o frontera tienen la propiedad de proteger a un transgen, es decir un gen exógeno, de los efectos de posición causados por los distintos ambientes de la cromatina en el entorno del sitio de integración al genoma (Fig. 3C).

En resumen los elementos barrera o "insulator" parecen contribuir a la formación de los dominios transcripcionalmente activos, por lo que se consideran como uno de los primeros niveles de regulación de la expresión del material genético. Lo anterior se basa en el hecho de que una vez definido el dominio, se llevarán a cabo al interior de éste, los eventos finos de regulación. Cabe señalar que no todos los genes o grupos de genes se encuentran de manera natural enmarcados por secuencias tipo "insulator" y que posiblemente será la organización del genoma la que dicte su presencia en regiones donde el ambiente cromatínico pueda influir en la regulación génica (18).

### **Los elementos de control del locus**

Al igual que los potenciadores, las regiones control del locus (LCR del inglés: "Locus Control Region"), contienen múltiples sitios de unión para los activadores transcripcionales

secuencia específica, que en su conjunto forman un sitio abierto en la cromatina que puede ser identificado por la accesibilidad del ADN al corte por la endonucleasa DNasa I. La DNasa I tiene la capacidad de cortar la doble hebra del ADN reconociendo al surco menor de la doble hélice del ADN. Los LCR's están formados generalmente por grupos de sitios de hipersensibilidad en zonas del genoma que abarcan de 200 a 600 pb donde la estructura de la cromatina es más laxa y por lo tanto la unión de los factores transcripcionales se ve favorecida (3, 16). Los LCR's están constituidos por dos funciones principales: una actividad tipo potenciador y otra que fomenta la apertura de la estructura de la cromatina al nivel de un dominio (3, 8, 16, 18,19). Resulta importante señalar que la función de los LCR's es tejido específica. Un aspecto que apoya la relevancia de este tipo de secuencias, es el número creciente de dominios que presentan un LCR entre sus elementos de regulación (16, 19).

Un aspecto práctico de los LCR's es que al colocarlos en presencia de un transgen, la expresión de éste en un contexto integrado al genoma, se ve favorecida y es dependiente del número de copias del transgen e independiente del sitio de integración de una manera tejido específica (3, 8, 16, 19). Al igual que los potenciadores, se ha propuesto que estos podrían estar incrementando la probabilidad de la expresión de un gen o grupo de genes en un mayor número de células (8, 19).

Actualmente y derivado de varios años de trabajo de un número considerable de grupos de investigación, se ha propuesto cuatro modelos que tratan de explicar la función de un LCR:

- 1- El modelo de formación de un asa o "Looping" (Fig. 4A). Este modelo favorece la idea de las interacciones físicas entre el LCR y los promotores individuales de los genes de manera regulada a lo largo del desarrollo. En este modelo el LCR actuaría como un holocomplejo para estimular la transcripción de genes individuales dentro del *locus* y a lo largo del desarrollo acercando al promotor del gen que se va a activar formando un asa que contribuye a aumentar la concentración de la maquinaria transcripcional de manera específica (3).
- 2- Modelo de encarrilamiento o "Tracking" (Fig. 4B). En este modelo se propone que diversos factores transcripcionales específicos y generales, así como cofactores, reconocen las secuencias presentes en el LCR formando un complejo de activación. Dicho complejo migraría o se "encarrilaría" a lo largo de la cromatina hasta topar con la maquinaria basal de la transcripción, que estaría situada en el promotor en turno, cercano al sitio de inicio de la transcripción (3).
- 3- El modelo de relevo o "Linking" (Fig. 4C). Este modelo sugiere una cadena o relevo de interacciones moleculares, que fomentan la formación de un "puente" molecular acercando el LCR al promotor. Esto se logra a través de interacciones entre los factores expresados en un estado de diferenciación específico, facilitando la formación de la estructura de la cromatina de manera específica y regulada para cada gen del dominio (3).
- 4- Los transcritos intergénicos (Fig. 4D). En el dominio  $\beta$ -globina humano, se han identificado transcritos intergénicos, es decir, en regiones no codificantes (que tomaron como molde el ADN situado entre los genes y los elementos de regulación distales, en particular el LCR  $\beta$ -globina). Aunque se desconoce su función, se ha demostrado una correlación entre transcritos no codificantes y la formación de la cromatina abierta. Se cree que estos podrían ser los responsables de contrarrestar el efecto represor de la cromatina compacta (3). El dominio  $\beta$ -globina de pollo, fue uno

de los primeros donde se describió la existencia de transcritos intergénicos en regiones no codificantes (3).

Como podemos observar la expresión de un gen constituye un evento biológico muy preciso y sofisticado donde ha sido necesario crear sistemas cada vez más complejos de control para lograr en tiempo y en espacio la transcripción de un gen. Pero los elementos de la regulación a distancia no son los únicos responsables, el ensamblaje de los complejos de iniciación de la transcripción en las zonas cercanas al inicio de ésta resulta fundamental y añade otro nivel de sofisticación como veremos a continuación.

## **II- La RNA polimerasa y los factores generales de la transcripción**

Una adecuada y eficiente transcripción, requiere de la RNA polimerasa y un conjunto de factores peptídicos auxiliares, mejor conocidos como factores “generales” o “basales” de la transcripción (TF's), entre los cuales se encuentran los complejos: TFIIA, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH y TFIIB, éste último formado por un solo péptido (5, 7, 20). Estos factores pueden unirse a las secuencias promotoras antes mencionadas y formar lo que conocemos como el complejo de preiniciación de la transcripción (Fig. 5).

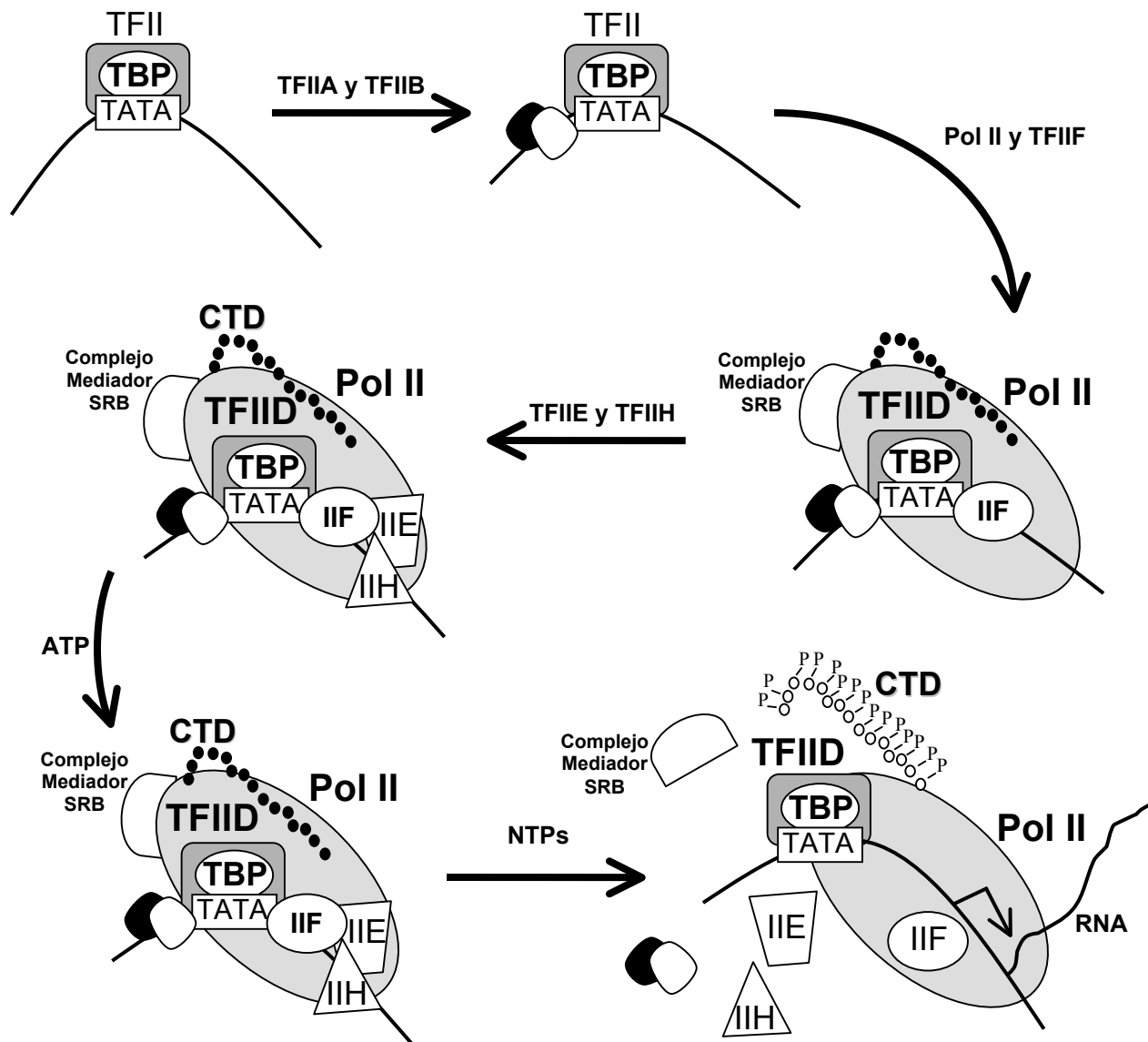
Uno de los principales paradigmas en la regulación transcripcional, se encuentra en entender como esta regulación puede llevar a un gen a ser expresado de manera específica en tejidos, niveles de expresión y etapa del desarrollo. El descubrimiento de los diferentes secuencias promotoras y tres formas diferentes de RNA polimerasa (I, II y III), localizadas en distintos compartimentos de la célula, ayudo a comprender que la especificidad necesaria para el control fino de la regulación transcripcional, está dada por combinaciones particulares en la composición de la maquinaria basal de la transcripción y los factores transcripcionales tanto específicos como generales (4-7, 20). Cabe mencionar que recientemente Orphanides y Reinberg han propuesto una teoría unificadora para el control de la expresión génica donde se propone que los procesos que llevan a la activación de un gen son secuenciales e inter-dependientes y que ocurren a múltiples niveles (21).

La idea de tres tipos de RNA polimerasas, con funciones distintas, generó una primera clasificación en grupos de genes, que dependen del tipo de RNA polimerasa por el que son transcritos (6, 7):

Clase I, genes que codifican para las subunidades largas de los RNA ribosomales (RNAr). Estos genes son transcritos por la RNA polimerasa I, la cual se encuentra localizada en el nucleolo.

Clase II, genes que codifican para algunos RNA nucleares pequeños, y principalmente para los RNA mensajeros (RNAm) que codifican para proteínas estructurales. Estos son transcritos por la RNA polimerasa II.

Clase III, genes que codifican para RNA estructurales pequeños y componentes de la maquinaria de procesamiento o "splicing" de los RNA's pre-mensajeros. Estos genes son transcritos por la RNA polimerasa III.



**Figura 5.** Modelo secuencial del ensamblaje del complejo de inicio de la transcripción por parte de la RNA polimerasa II. A través de la unión de TBP a la caja TATA se forma el complejo TFIID con la incorporación de un grupo de proteínas conocidas como TAF's, algunas de las cuales pueden ser incluso tejido específicas. Una vez asociado el complejo TFIID se incorporan TFIIA y TFIIB cuya función es la de determinar la distancia y orientación en la cual la RNA pol-II se posicionará en el "core" del promotor. Posteriormente la RNA pol-II, escoltada por el complejo TFIIF, es atraída al promotor. Cabe señalar que el complejo Mediador/srb viene acoplado a la RNA pol-II en su región carboxilo terminal (CTD). Resulta importante comentar que las interacciones moleculares generadas por las TAF's (en el complejo TFIID) y el Mediador/srb representan un "panel de control" donde pueden ocurrir múltiples interacciones moleculares, con un elevado grado de especificidad, entre factores transcripcionales generales, específicos e incluso con cofactores (coactivadores o corepresores). El siguiente paso es la incorporación de los complejos TFIIE y TFIIH, este último de suma importancia, dado que, en presencia de ATP y nucleótidos, TFIIH fosforila a la región CTD de la RNA pol-II permitiendo el proceso de elongación y por lo tanto la síntesis del RNA pre-mensajero (6, 7, 20, 21).

Como se ha mencionado, las polimerasas se asocian con distintos factores generales de transcripción los cuales forman el complejo de preiniciación de la transcripción que está compuesto por más de 100 proteínas (4-7, 20). En particular, para el grupo de genes transcritos por la RNA polimerasa II, al menos se requiere de 6 factores generales de transcripción, que en conjunto formarán lo que conocemos como el CPT (Fig. 5). La asociación estable de la RNA pol-II con la secuencia promotora, requiere de la unión previa de TFIID, en particular TBP y sus factores asociados conocidos como TAF's (del inglés: "TBP-associated factors"), TFIIB y TFIIF. Sin embargo para que la transcripción se pueda llevar a cabo se necesita de los factores transcripcionales TFIIIE y TFIIH (20).

El inicio de la transcripción requiere del previo reconocimiento de la caja TATA, por la proteína TBP (del inglés: "TATA-binding protein") y su unión genera una distorsión en la estructura de ADN (Fig. 5). Este complejo formado por la TBP y el ADN ahora distorsionado, será el blanco que reconocerá el TFIIB. Se ha propuesto que TFIIB no reconoce una secuencia en específico, sino la curvatura generada por la interacción de la TBP con la caja TATA. Además se propone que la unión del TFIIB podría estar indicando la direccionalidad del promotor (7, 20).

La asociación de la RNA polimerasa II al complejo ADN-TBP-TFIIB, requiere de la interacción del TFIIF con la polimerasa, su función será la de asistir la unión al promotor. Lo anterior es el resultado de la capacidad del TFIIF para interactuar con el TFIIB, la RNA pol-II y el ADN. Cabe señalar que el TFIIF interactúa río abajo del elemento TATA (Fig. 5) (7, 20).

Una vez que se ha establecido la unión de la RNA pol-II a la secuencia promotora, se necesita de la unión de los factores TFIIIE y TFIIH para lograr el proceso conocido como "alarge" del promotor (Fig. 5). Este evento permitirá liberar a la RNA polimerasa II de la secuencia promotora y facilitar el inicio de la transcripción, en un proceso mejor conocido como elongación (Fig. 5). El complejo multiprotéico TFIIH resulta ser imprescindible, dado que es el único factor general de transcripción que presenta una actividad enzimática clave para el inicio de la transcripción, consiste en la fosforilación de la región carboxilo terminal de la RNA polimerasa II, conocida como CTD (7, 20, 22). El complejo TFIIH además de incluir a la cinasa responsable de fosforilar a la región CTD de la RNA pol-II, tiene la capacidad de reparar el ADN mediante el proceso conocido como reparación por escisión de nucleótidos (22). Finalmente debemos recordar que la transcripción se realiza en el contexto natural en la presencia de los nucleosomas (Fig. 1) por lo que se ha propuesto que el proceso de elongación debe estar acoplado y coordinado por las actividades de remodelaje de la estructura de la cromatina (23).

En relación con lo anterior, el segundo nivel de regulación de la actividad transcripcional está dado por la modulación de la estructura de la cromatina. Para que la maquinaria general de la transcripción pueda unirse a la región promotora, primero se necesita contrarrestar el efecto represor de la estructura de la cromatina poniendo al descubierto las secuencias blanco para la unión de múltiples y variados factores transcripcionales. A continuación presentaremos una descripción de los eventos ligados al remodelaje de la cromatina.

### III- La expresión génica en el contexto de la estructura de la cromatina



Como se mencionó, el genoma eucariota se encuentra organizado en cromatina donde la unidad mínima de estructuración y por lo tanto de compactación está dada por el nucleosoma (2). En la actualidad la regulación de la expresión génica no puede ser entendida sin tomar en consideración a la estructura de la cromatina.

### **La regulación epigenética**

La regulación epigenética gira en torno a la estructuración del genoma en la cromatina y su efecto regulador sobre la expresión de los genes. Se consideran procesos de regulación epigenéticos, todos aquellos que influyen tanto de manera normal como anormal en la expresión heredable de los genes sin que ocurran cambios en la secuencia del ADN. Esto es, la información genética que viene codificada en la molécula de ADN no se ve afectada y se transmite su información sin problema alguno (por ejemplo el marco abierto de lectura que conforma la secuencia de un gen que dará origen a una proteína).

Los elementos que participan en la regulación epigenética responsables de permitir que la expresión génica tenga un vínculo muy estrecho con la estructura de la cromatina son básicamente cuatro: 1) las modificaciones post-traduccionales de las histonas, 2) la metilación del ADN, 3) los complejos de remodelaje ATP-dependientes y 4) los complejos originalmente descritos en *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta, llamados Polycomb y Trithorax (PcG y trxG). A continuación presentaremos las características de cada uno de estos elementos.

### **Modificaciones post-traduccionales de las histonas**

Los nucleosomas son uno de los constituyentes asociados a la cromatina más dinámicos. Son blanco de modificaciones post-traduccionales de las histonas (Fig. 1 y 6). Las regiones amino terminales de las histonas sobresalen de la estructura globular del nucleosoma. Mediante modificaciones post-traduccionales se favorecen o se relajan las uniones de estas proteínas básicas con el ADN. Estas regiones de las histonas son ricas en residuos de lisina, blanco de modificaciones covalentes tales como: acetilación, metilación, fosforilación y más recientemente se han descubierto modificaciones tales como la ubiquitinación y sumoilación, que marcan a las histonas como forma para regular su funcionamiento y degradación (Fig. 6) (24).

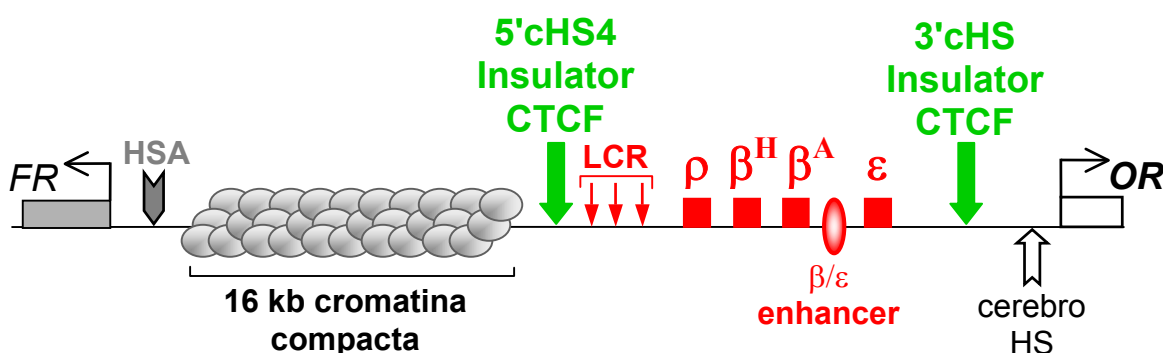
En la actualidad se ha establecido claramente la presencia de distintas combinaciones de éstas modificaciones, las cuales afectan tanto positiva como negativamente los distintos niveles de compactación de la estructura de la cromatina (Fig. 1 y 6). Estas combinaciones han incluso llevado a proponer su contribución en procesos celulares tan variados como la activación regulada de un gen hasta la segregación de los cromosomas ó el mismo control del ciclo celular (25).



**Figura 6.** Modificaciones covalente de las histonas. Las histonas H3, H4, H2A y H2B pueden ser modificadas en sus regiones amino terminales. Las principales modificaciones son: la acetilación y desacetilación de residuos lisina; la metilación (incluso existe la mon-, di- y tri-metilación); la fosforilación; la ubiquitinización y más recientemente la sumoilación (24-26). Todas estas modificaciones pueden darse en distintas combinaciones formando lo que Allis ha propuesto como el código de histonas que lleva a diversa respuestas regulatorias a nivel epigenético (24-26)

Recientemente se ha demostrado que las modificaciones postraduccionales favorecen la inter-comunicación entre nucleosomas afectando y regulando localmente la estructura de la cromatina, pero también al nivel de un dominio e incluso de un cromosoma completo (24). El efecto local se considera el que tiene relación con las regiones cercanas a los genes (Fig. 2), donde se localizan los elementos de control de la transcripción y a los propios genes donde las histonas se encuentran hiperacetiladas, característica consistente con una cromatina "abierta" y por lo tanto apta para ser transcrita. Por el contrario, en condiciones en las cuales la expresión

de un gen debe ser reprimida, sus histonas se encontrarán desacetiladas lo que favorece una cromatina compacta. Otro par de modificaciones involucra la metilación de los residuos de lisina 4 y 9 de la histona H3 cuyos efectos biológicos son antagónicos. La metilación de la lisina 4 de la histona H3 se asocia a la formación de eucromatina facilitando la actividad transcripcional (25, 26). Por el contrario, la metilación de la lisina 9 de la histona H3, por parte de la metil-transferasa de histonas SUV39H1, induce la incorporación de la proteína de heterocromatina 1 logrando como consecuencia un efecto represor en la actividad transcripcional (HP1; 26). Esta manera epigenética de inducir la formación de heterocromatina, es utilizada para silenciar promotores de genes como la ciclina E que es parte dependiente de la acción de E2F y Rb, moléculas reguladores del ciclo celular (27).



**Figura 7.** Esquema del dominio  $\beta$ -globina de pollo. El dominio abarca una región genómica de 55 kb y representa uno de los primeros ejemplos que validan el concepto de organización del genoma eucariota en dominios. El dominio  $\beta$ -globina de pollo está compuesto por un gen que se expresa en la etapa fetal ( $\rho$ ), dos genes adultos ( $\beta^H$  y  $\beta^A$ ) y un gen embrionario ( $\epsilon$ ), con un patrón de expresión diferencial a lo largo del desarrollo (17, 30). Los límites, tanto en el extremo 5' como en el 3', están definidos por dos elementos tipo "insulator" o barrera. De manera interesante, a cada uno de los "insulators" (5'cHS4 y 3'cHS) se le asocia el factor nuclear CTCF, lo cual hace pensar una posible interacción física y la formación de un asa cromatínica entre los extremos que definen al dominio  $\beta$ -globina de pollo (17). Río arriba en relación con el límite 5' del dominio  $\beta$ -globina, se identifican 16 kb de cromatina compacta, cuyo ADN se encuentra metilado y su estructura de la cromatina inaccesible al corte por parte de la endonucleasa DNasa I (18, 30, 31). Más "arriba" se identificó un gen que codifica para uno de los receptores de folato (FR) con un patrón de expresión eritroide pero en una etapa de diferenciación previa en la cual los genes  $\beta$ -globina se expresan (31). HSA, representa un sitio de hipersensibilidad con una actividad aparente de potenciador. Río abajo en relación con el límite 3' del dominio  $\beta$ -globina se identificó uno de los genes que codifican para uno de los miembros de la familia de receptores olfarios (OR) con un patrón de expresión no eritroide y que es cerebro específico (32).

A nivel de un dominio, existen ejemplos en la literatura tanto en vertebrados como en hongos, donde las histonas que definen regiones del genoma que contienen a un gen o grupo de genes pueden encontrarse hiperacetiladas (en un intervalo de varias ó incluso decenas de kilo bases; 18, 28, 29). Dichos dominios se encuentran delimitados por las histonas con marcas de cromatina abierta y sus límites definen claramente una transición entre la cromatina abierta y la

cerrada (Fig. 7; 29). Uno de los ejemplos más claros se presenta en el dominio  $\beta$ -globina de pollo el cual constituye una familia multigénica que se expresa de manera diferencial a lo largo del desarrollo (30). En su extremo 5' se ha identificado un elemento tipo "insulator" seguido río arriba de 16 kb de cromatina compacta y un gen que codifica para uno de los receptores de folato que posee una expresión eritroide específica y que se encuentra activo en una etapa previa a la expresión de los genes para la globina (Fig. 7; 31). En el extremo 3', se identificó otro elemento "insulator" que delimita al dominio  $\beta$ -globina de un gen que codifica para uno de los receptores olfatorios con una expresión cerebro específico (Fig. 7; 32). Este ha sido uno de los pocos ejemplos, que muestran la organización del genoma en dominios, cuyos límites se encuentran definidos por secuencias tipo "insulator" y con un patrón bien definido en cuanto al estado de acetilación de las histonas (29, 33).

Finalmente, al nivel de un cromosoma completo el ejemplo clásico es la determinación del sexo mediante la inactivación del cromosoma X (34). Para lograr dicha inactivación convergen múltiples señales de silenciamiento empezando por la presencia de transcritos antisentido que parecen ser la señal para atraer modificaciones de la cromatina tales como la desacetilación de histonas, metilación del ADN y metilación de la lisina 9 de la histona H3 entre otras (34). Así el cromosoma X se verá silenciado en la expresión de sus genes, por medio de la formación de una cromatina compacta, en la mayor parte de su extensión.

En resumen, queda de manifiesto la interdependencia entre las distintas modificaciones covalentes que además constituyen, como lo ha propuesto David Allis, las señales moleculares que pueden propagarse de nucleosoma a nucleosoma construyendo así una respuesta a las señales de regulación que llevan a la modulación de la estructura de la cromatina.

### ***La metilación del ADN***

La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en los últimos años e incorpora un nuevo concepto a la regulación conocida como "memoria epigenética" o "memoria celular". Este nuevo concepto de memoria se suma a la definición de epigenética en la cual los cambios en la expresión de los genes son heredables de una generación celular a otra.

La metilación del ADN desempeña un papel central en la transmisión de la información epigenética a través de la incorporación de un grupo metilo a la posición 5' de la citosina, siempre y cuando se encuentre en el contexto del dinucleótido CpG (Fig. 8; 35). La metilación del ADN es sinónimo de represión transcripcional mediada por la formación de una cromatina compacta. En términos generales la metilación del ADN contribuye a mantener la estabilidad del genoma, asegurando que las secuencias repetidas correspondientes a las secuencias de transposones no "salten", con lo cual se evita la inestabilidad genómica (36).

La metilación del ADN también participa en el silenciamiento de genes de manera permanente e irreversible en distintas etapas del desarrollo. Al momento del nacimiento se lleva a cabo una fuerte oleada de metilación la cual contribuye al "apagado" de genes embrionarios que no serán expresados en la etapa adulta del organismo (37). Otro ámbito en el cual la metilación del ADN contribuye a la memoria epigenética, es en el fenómeno conocido como "impronta genómica" en donde un grupo de dominios involucrados en la expresión de genes en

etapas tempranas del desarrollo poseen una expresión mono-alélica. Es decir, que la expresión de los genes improntados se lleva a cabo en el alelo paterno o en el alelo materno pero no en ambos (38). Recientemente se ha demostrado que para la mayoría de los loci improntados, una región de metilación diferencial contribuye en gran medida a que se realice una expresión mono-alélica (38).

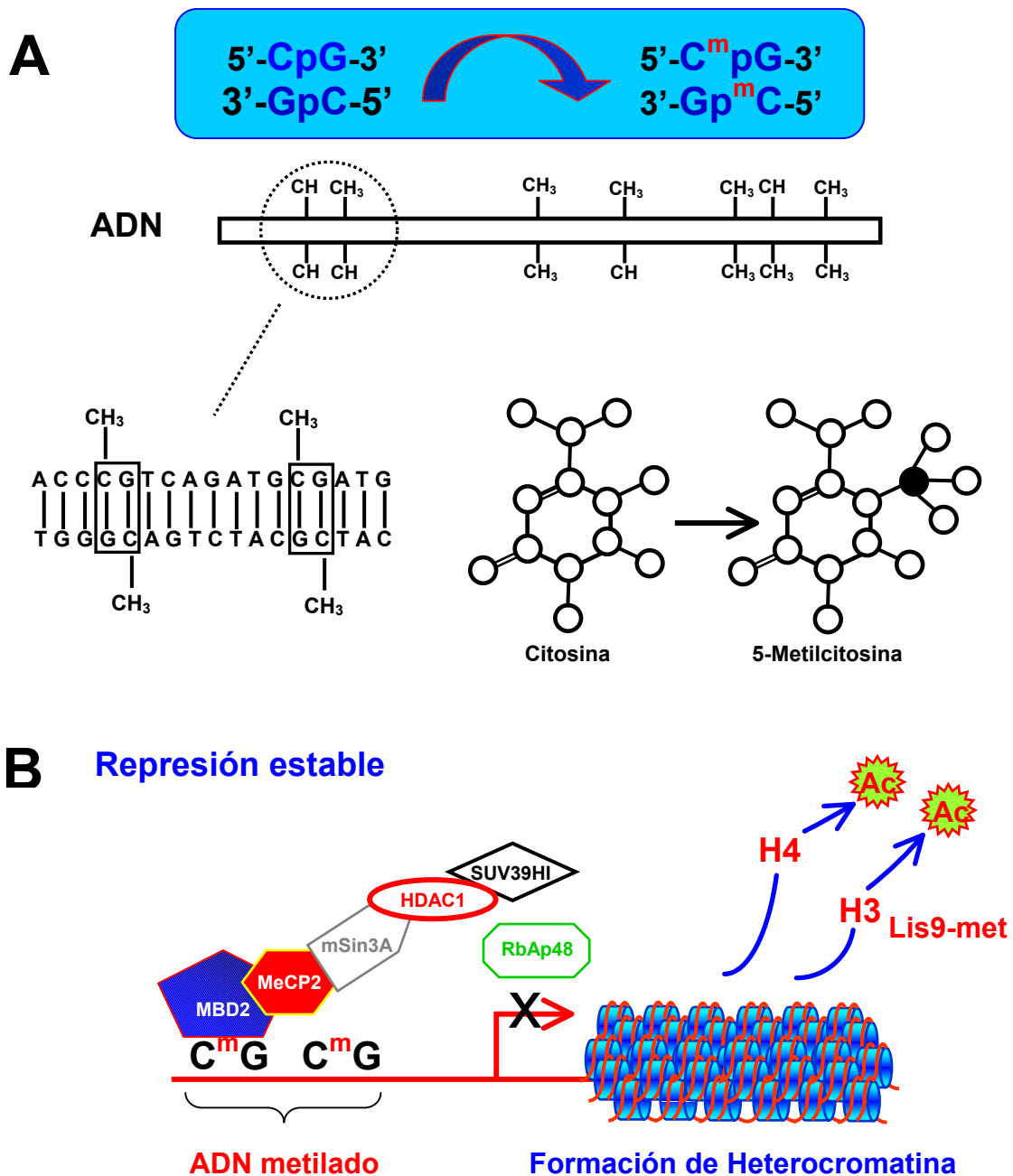
Investigaciones recientes han permitido identificar a una familia de proteínas con la capacidad de unirse al ADN conocidas como MBD's o MeCP's (del inglés: "Methyl-Binding Proteins" o "Methyl-CpG-binding Proteins", respectivamente (39)). Al interaccionar con el ADN metilado y con la ayuda de los corepresores, se inician las actividades de remodelaje de la cromatina que inducen una cromatina compacta, en particular, a través de la acción de desacetilasas de las histonas (Fig. 8; 39).

Finalmente se ha demostrado que las modificaciones post-traduccionales de las histonas se encuentran epigenéticamente ligadas a la metilación del ADN. En la planta *Arabidopsis thaliana* y en el hongo *Neurospora crassa* se ha demostrado que la metilación de la lisina 9 de la histona H3 constituye una señal molecular para atraer a las metil-transferasas del ADN y metilarlo localmente (25). Incluso en una publicación reciente se demostró en *Neurospora crassa* que el homólogo de la proteína HP1 es atraída por la metilación de la lisina 9 de la histona H3, evento necesario para la metilación del ADN (40). Lo anterior demuestra no sólo la interdependencia entre las modificaciones covalentes de las histonas sino también con otros procesos epigenéticos como el caso de la metilación del ADN.

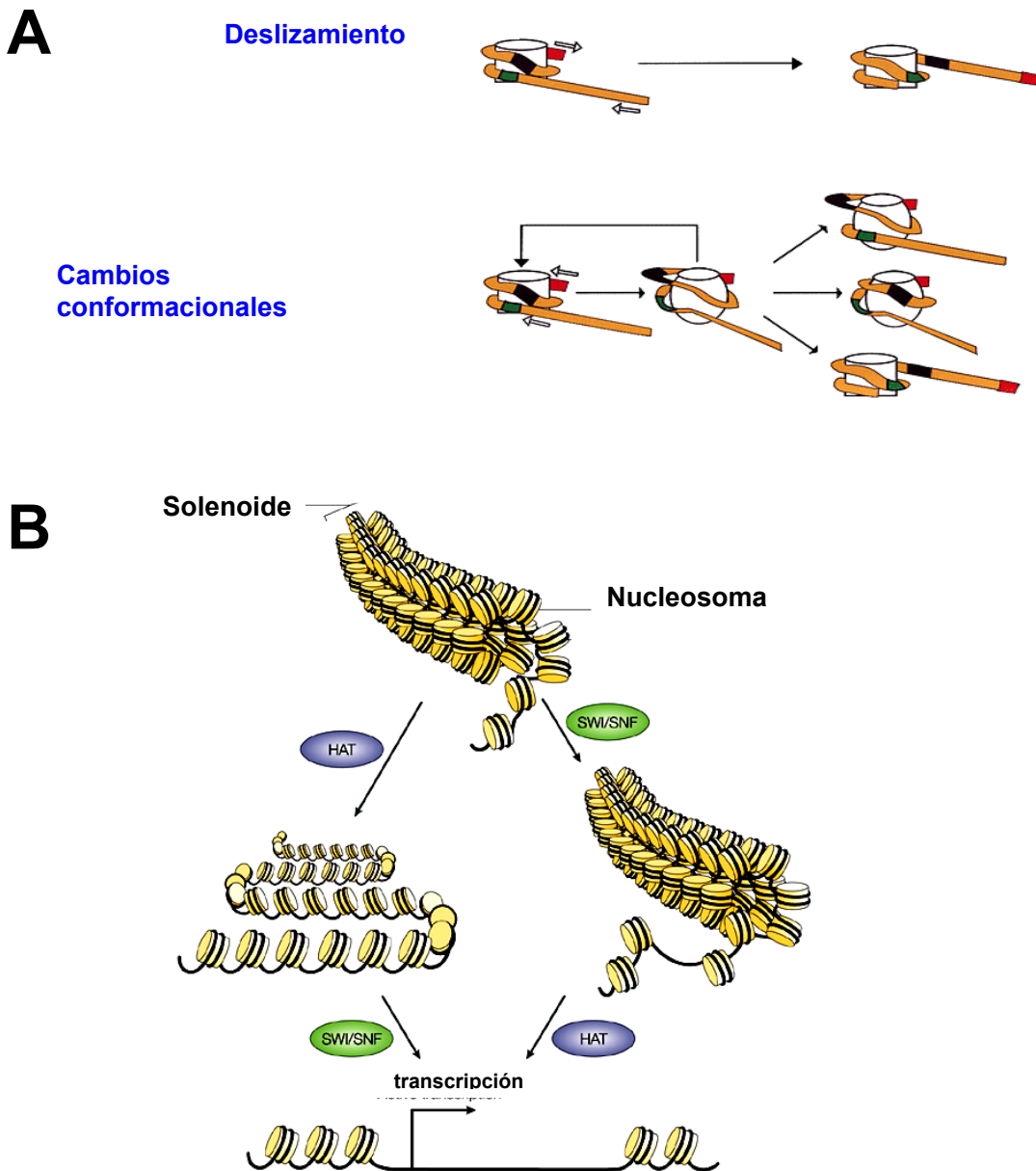
### **Los complejos de remodelaje ATP-dependientes**

Para activar o reprimir la expresión de un gen es necesario que factores transcripcionales tanto generales como específicos tengan acceso, reconozcan y puedan unirse a sus secuencias blanco en la molécula de ADN. En el contexto de la estructura de la cromatina este proceso se ve obstaculizado por la organización nucleosomal. Recientemente se han descrito una serie de complejos multipéptidicos cuya función, dependiente de ATP, es la de liberar dichas secuencias desplazando o re-posicionando a los nucleosomas (Fig. 9). Estos desplazamientos ocurren a distancias cortas y sin que los nucleosomas se disocien por completo de sus interacciones con el ADN (41). SWI/SNF originalmente estudiado en levadura y *Drosophila*, constituye el complejo pionero seguido por NURF, CHRAC y ACF entre otros (42). El complejo Mi-2/NuRD esta compuesto por desacetilasas de las histonas y las proteínas de unión al ADN metilado entre otras, por lo tanto posee tres actividades remodeladoras en un solo complejo (43).

Los modelos propuestos para el funcionamiento de estos complejos son básicamente dos. El primero atribuido a la capacidad de estos complejos para deslizarse a los nucleosomas mediante un proceso giratorio tanto del propio nucleosoma como de la molécula de ADN (Fig. 9A). El segundo modelo tiene que ver con un cambio conformacional del propio nucleosoma lo que facilita la exposición de secuencias en el ADN (Fig. 9A) (41, 42). Aparentemente la finalidad de estos complejos es la de liberar secuencias en el ADN que se encuentran ocultas por la estructuración del genoma en cromatina. Curiosamente lo opuesto también ocurre, es decir, se ha demostrado que estos complejos pueden actuar reposicionando a los nucleosomas de tal



**Figura 8.** La metilación del ADN constituye uno de los elementos centrales de la regulación epigenética. A- La metilación del ADN se refiere a la incorporación de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) en la posición 5 de la citosina siempre y cuando se encuentre formando el dinucleótido CpG. Cabe señalar que hasta ahora, esta reacción se considera como irreversible (35). B- La metilación del ADN debe considerarse como uno de los elementos de regulación epigenética con un efecto silenciador o represor sobre la expresión génica. Recientemente se ha favorecido el modelo en el cual la metilación del ADN se considera como uno de los factores críticos en el silenciamiento génico induciendo la formación de una estructura de la cromatina altamente compacta. Lo anterior se logra por medio de la unión de las proteínas que reconocen al ADN metilado (conocidas como MeCP's o MBD's) cuya función es la de atraer contactos moleculares con co-represores como el Sin3A, los cuales a su vez reclutan desacetilasas de histonas favoreciendo la compactación de la cromatina (35).



**Figura 9.** Los complejos de remodelaje ATP-dependientes en la modulación de la estructura de la cromatina. A- Actualmente se han descubierto un número creciente de complejos de remodelaje con distintas actividades. Hay dos modelos principales (aunque no son los únicos) para explicar la función de dichos complejos. El primero propone el deslizamiento del nucleosoma o "sliding" a lo largo del ADN sin que ocurra una disociación de las histonas del nucleosoma (41). Se ha demostrado que tanto el nucleosoma como la misma doble hebra del ADN giran facilitando dicho movimiento. Recordemos que la finalidad de estos complejos es modular tanto positiva como negativamente a la estructura de la cromatina, permitiendo que secuencias nucleotídicas sean expuestas o en su defecto ocultas, para su reconocimiento por parte de los factores de transcripción e incluso el propio complejo de iniciación de la transcripción. El segundo modelo sugiere, a diferencia del anterior, un cambio conformacional transitorio que puede darse a múltiples niveles sin llegar al extremo de disociar por completo al nucleosoma. B- Datos experimentales recientes han demostrado una acción orquestada entre las acetilasas de las histonas (HAT's) y los complejos de remodelaje ATP-dependientes (como por ejemplo SWI/SNF) con la finalidad de "abrir" la estructura de la cromatina de manera más eficiente (41, 42, 44).

forma que ahora las secuencias blanco para algún factor transcripcional, se oculten. Lo anterior trae como consecuencia la represión de la actividad de un gen. Por lo tanto los complejos de remodelaje ATP-dependientes con base a interacciones con cofactores son capaces de regular la expresión génica a nivel epigenético, tanto positiva como negativamente. Como si fuera poco se han demostrado procesos cooperativos entre los complejos de remodelaje y las acetilasas de las histonas sin que exista un orden predominante en la acción de estas proteínas sobre la región de control (42, 44). Lo que parece volverse una constante es que estas dos actividades de remodelaje de la cromatina son cooperativas (Fig. 9B) (42, 44).

En resumen, los complejos de remodelaje ATP-dependientes representan un eslabón más dentro de la regulación epigenética. Aún falta mucho por comprender en relación con estos complejos ya que su complejidad los hace un tema difícil pero a la vez fascinante de investigación.

### **Regulación epigenética y cáncer**

Entre un 50 y 60 % de los promotores de genes humanos poseen una alta densidad de dinucleótidos CpG's. Su característica principal es la de corresponder a una región no-metilable. A estas regiones de control se les conoce como "islas CpG's" y regulan a un gran número de genes entre los cuales se encuentran genes constitutivos, oncogenes y genes supresores de tumores. En el resto del genoma humano encontramos en promedio de entre 70 y 80 % de CpG's las cuales en su gran mayoría están metiladas. En este contexto se pretende entender a la metilación del ADN como una modificación epigenética del genoma a partir de la cual puede darse el origen y progresión a procesos tumorales con base a la metilación anormal de las islas CpG's localizadas en promotores críticos de genes involucrados en el control del ciclo celular. Dentro de estos promotores que se metilan de manera anormal se encuentra un grupo nada despreciable, aunque no son los únicos, de promotores de genes supresores de tumores tales como: *Rb* (retinoblastoma); *p16<sup>INK4a</sup>* (un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas); *BRCA1* (involucrado en la reparación del ADN) entre otros (45, 46). Como se mencionó, los mecanismos que rigen a la regulación epigenética tienen que ver con la metilación del ADN y eventos de remodelamiento de la cromatina. Recientemente se ha demostrado que el uso individual de inhibidores de la metilación del ADN, como la 5-azacitidina e inhibidores de las desacetilasas, como la tricostatina A (TSA), permite la reactivación de la expresión génica. Un punto importante que muestra la convergencia de estos mecanismos ligados a la estructura de la cromatina es que al utilizar simultáneamente ambos inhibidores se logran niveles de reactivación más elevados. Este último punto nos hace pensar seriamente en la aplicación de estos compuestos como agentes terapéuticos. A pesar de conocer poco sobre el espectro de acción de estas drogas y sus posibles efectos colaterales, su uso se encuentra ya en distintas fases de análisis clínico para su futura aplicación en pacientes.

La importancia al nivel celular de las enzimas responsables de la metilación del ADN está claramente demostrada por la mutación de dichas proteínas, lo cual provoca un fenotipo letal en ratón. Basados en estas mutaciones tipo "knock-out" y los resultados experimentales, se ha propuesto a la Dnmt3a y la Dnmt3b como las metil-transferasas de ADN responsables de la metilación *de novo* del ADN, mientras que la Dnmt1 se considera como la enzima responsable de mantener a la metilación en cada división celular. Estas actividades concuerdan con la



definición de la epigenética dado que la información molecular derivada de sus actividades es heredable ya que se sugiere que dicha información o "memoria molecular" puede ser transmitida de generación en generación lo cual representa un mecanismo epigenético de regulación (35, 46).

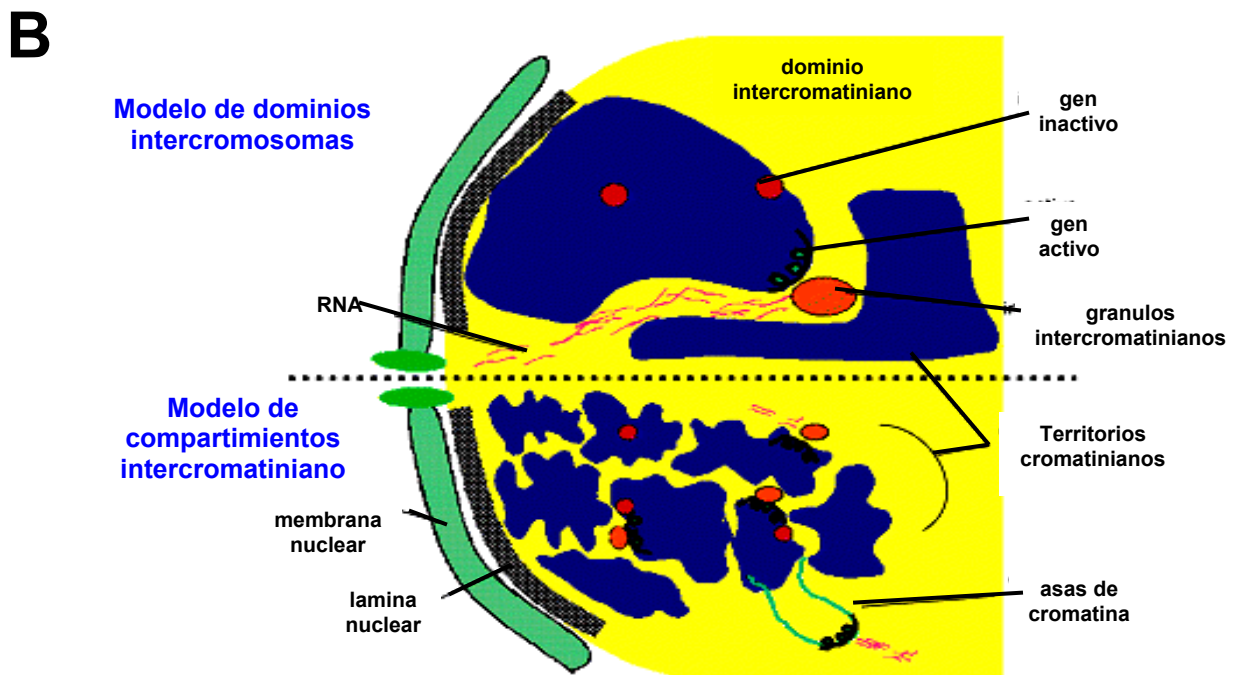
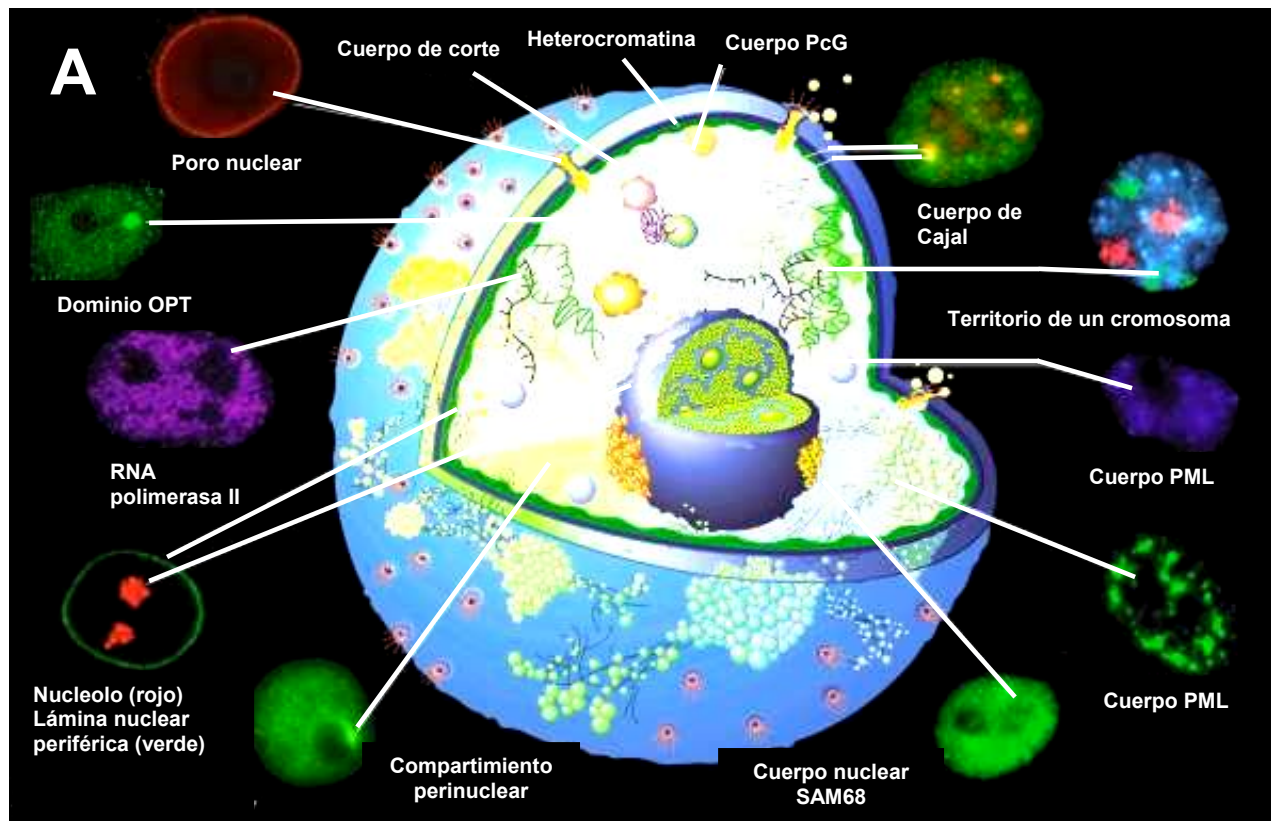
Otro fenómeno biológico donde la regulación epigenética desempeña un papel crítico, es la impronta genómica o "imprinting" que se refiere a la expresión mono-alelica de genes. En particular con los grupos de genes involucrados en el desarrollo embrionario de los mamíferos. Parte de los mecanismos que definen la expresión específica de un alelo y el silenciamiento del otro alelo esta dada por una región conocida como el dominio de metilación diferencial el cual por lo general se encuentra no metilado en el alelo que va a ser expresado mientras que el alelo silenciado se encuentra metilado. Por lo tanto, parte de la regulación de la expresión en los dominios improntados está dada por los mecanismos epigenéticos. La pérdida de esta expresión mono-alelica trae como consecuencia la desregulación de muchos genes incluyendo oncogenes y genes supresores de tumores al igual que la aparición de ciertos síndromes (38, 47).

### ***Regulación epigenética a través de los complejos Polycomb y Trithorax***

Los grupos de genes Polycomb y Trithorax fueron originalmente descritos en *Drosophila* como proteínas que regulan la expresión de los genes homeóticos. El grupo de genes Polycomb (PcG) codifica para un conjunto de proteínas que regulan negativamente a los genes homeóticos mientras que Trithorax (trxG) lo hace positivamente (48-50). Se ha postulado que PcG y trxG son parte de los mecanismos que contribuyen a la memoria epigenética. En particular, las proteínas del grupo PcG son responsables de silenciar no sólo a los genes homeóticos fomentando una

---

**Figura 10.** El núcleo participa activamente en la regulación de la expresión génica. A- El núcleo constituye hoy en día un organelo subcelular mucho más complejo de lo imaginado pero sobre todo muy dinámico y que influye en la expresión de los genes. En este esquema se resaltan varios ejemplos de compartimientos y estructuras subnucleares, en particular la organización del genoma eucariota en dominios. Cabe hacer notar que el avance en las técnicas de marcaje fluorescente y de la microscopia de fluorescencia han permitido incluso proponer una organización de los cromosomas en territorios en un núcleo en interfase (53-55). B- La organización del genoma en territorios ha llevado a proponer los modelos de dominios inter cromosómicos o de compartimientos inter cromosómicos. Ambos modelos proponen que el relajamiento de la estructura de la cromatina y la transcripción ocurre en la periferia de los territorios en contacto con los canales intercromatinianos donde se localiza una mayor densidad de los factores tanto de transcripción como de procesamiento e incluso organelos sub-nucleares como los cuerpos de Cajal y los "speckles" entre otros. Debemos recordar que este modelo contempla el facilitar el procesamiento de los transcritos nacientes y su localización en los canales intercromatinianos facilita su transporte hacia los poros nucleares y la subsecuente migración hacia el citoplasma. En el modelo de dominios inter cromosómicos los territorios abarcan grandes áreas y en sus regiones centrales los genes se encuentran silenciados e inmersos en una estructura de la cromatina compacta. Consecuentemente la activación de un gen requerirá de una re-localización de dicha secuencias, de zonas centrales a la periferia de un territorio. Por el contrario el modelo de compartimientos inter cromosómicos prevé que los territorios estén formados por subterritorios y el acceso a la periferia de estos se vería facilitado (53, 55).



estructura de la cromatina represora evitando así la incorporación de factores de transcripción y por lo tanto la transcripción. Uno de los modelos propuestos contempla la formación de complejos multiptéidicos que reconocen a las secuencias llamadas PRE (del inglés: "Polycomb Response Elements"). Proteínas homólogas al grupo PcG y trxG han sido identificadas en diversos organismos incluyendo al humano (42, 49). En particular, los miembros del grupo PcG han sido asociados a la regulación de genes ligados al control del ciclo celular vía la proteína retinoblastoma (Rb; 51). Por otra parte, la sobre expresión anormal de los miembros de PcG se asocia directamente a la proliferación celular relacionado con la progresión del cáncer de próstata (52). De igual manera mutaciones en los miembros de trxG han mostrado tener relación con la aparición de tumores pediátricos, en particular a través del complejo hBrm que corresponde a un elemento de remodelaje ATP-dependiente asociado al grupo trxG (42).

En resumen, poco se sabe a cerca de estos complejos en cuanto a su función en la regulación epigenética pero resulta indudable que son parte de ella y que su acción es una vez más a través de modificar y modular diversas formas a la estructura de la cromatina.

#### **IV- La estructura de la cromatina y la organización nuclear**

Durante años el núcleo celular fue considerado como un organelo subcelular con la única función de contener en su interior a la información genética de la célula.

Apoyados en los avances de la microscopia electrónica y recientemente de la microscopia de fluorescencia, ha sido posible determinar que el núcleo celular es una entidad dinámica y que en definitiva participa en la regulación de la expresión génica (Fig. 10A; 53, 54). El núcleo de una célula eucariota se encuentra compartimentalizado en zonas de heterocromatina y eucromatina pero también por estructuras subnucleares tales como los cuerpos de Cajal, los cuerpos promielocíticos (PML), los "speckles" y el nucleolo. Cada uno de estos compartimientos poseen funciones bien definidas que van desde almacenar a los factores de transcripción, los factores ligados al procesamiento de los RNA pre-mensajeros hasta los genes ribosomales en el caso del nucleolo entre otros. De manera general la relación que existe entre estos compartimientos es prácticamente una, el llevar a cabo de manera regulada, la expresión génica y el procesamiento de los RNA's mensajeros.

Uno de los aspectos más novedosos al respecto, es la organización del genoma en territorios al interior del núcleo. Estudios realizados por microscopia de fluorescencia, con base a la posibilidad de marcar de manera fluorescente cromosomas completos han demostrado su localización en territorios bien definidos (Fig. 10B; 53). En un mismo territorio el genoma varía en cuanto a su organización de la cromatina. Se ha propuesto que en las regiones más centrales al interior de un territorio, la estructura de la cromatina se encuentra en un alto grado de compactación. Por otra parte al interior de un territorio se presentan zonas de heterocromatina mayoritariamente asociadas a la periferia nuclear y perinucleolar (Fig. 10B). A partir del surgimiento del concepto de organización del genoma en territorios al interior del núcleo se planteó un nuevo modelo en el cual las regiones entre territorios, conocidas como regiones intercromatinianas participan activamente en la expresión génica (55). El modelo propone que las regiones del genoma que serán transcritas se relocalizan (por mecanismos aún desconocidos) en la periferia de los territorios y en contacto con los compartimientos

intercromatinianos donde además se encuentran posas de los factores transcripcionales, las RNA polimerasas y los factores de procesamiento (Fig. 10B; 55). Experimentalmente se ha demostrado que las histonas asociadas al genoma en las zonas internas en un territorio se encuentra mayoritariamente desacetiladas mientras que las zonas más expuestas y en contacto con las regiones intercromatinianas se encuentran hiperacetiladas (55, 56). Este modelo resulta ser muy atractivo dado que al citolocalizar tanto al ADN a ser transcrito, los elementos de regulación y de procesamiento, al generar un transcrito maduro podría ser a su vez transportado por estos "canales" pericromatinianos dirigiendo y facilitando su transporte a través de los poros nucleares hacia el citoplasma para que dicho mensaje sea traducido en una proteína funcional (Fig. 10B; 55, 56).

Un aspecto más reciente que confirma la participación de la dinámica nuclear en la regulación de la expresión génica, son los procesos de relocalización (57). La relocalización se refiere al hecho de asociar, tanto regiones de cromatina como factores transcripcionales a las zonas de heterocromatina o eucromatina, ocasionando la represión o activación de la expresión génica, respectivamente. Actualmente son tres los ejemplos que apoyan a la relocalización al interior del núcleo como un nivel novedoso de regulación:

- 1- Represión por relocalización mediada por la proteína Ikaros. Ikaros es una proteína específica del linaje celular linfóide y cuya función es reprimir la expresión de los genes relacionados con el sistema inmune (58, 59). Ikaros actúa reclutando genes que no deben ser transcritos, asociando dichos genes a regiones centroméricas y por lo tanto heterocromatinizándolas, causando su represión a nivel transcripcional (58-60).
- 2- Utilizando al modelo de los genes  $\beta$ -globina se ha demostrado que los elementos de la regulación a distancia, como lo es un potenciador o "enhancer", en células no eritroides o en caso de las mutaciones en el potenciador, éste es inactivo con base a su asociación con las regiones de heterocromatina centromérica (61).
- 3- En las células eritroides se ha demostrado que el factor transcripcional NF-E2p45, el cual se dimeriza con el factor NF-E2p18, se encuentra en compartimientos distintos al interior del núcleo (62). En particular el factor NF-E2p45 se encuentra mayoritariamente asociado a zonas de heterocromatina al interior del núcleo cuando los genes globina no se encuentran activos. Al diferenciarse las células eritroides y los genes globina volverse activos transcripcionalmente, NF-E2p45 se relocaliza en las regiones transcripcionalmente activas asociándose con el factor NF-E2p18 y uniéndose a sus secuencias blanco para llevar a cabo sus funciones de regulación (62).

En resumen, resulta indudable que la visión actual del núcleo es mucho más dinámica de lo imaginado y con una mayor ingerencia en la regulación de la expresión de los genes.

## ***V- Conclusiones y perspectivas***

La regulación de la expresión de los genes influye en un gran número de los procesos, tanto normales como anormales, a lo largo de la vida de una célula. En sus inicios el estudio de la expresión génica parecía considerar únicamente la necesidad de atraer a las RNA polimerasas a regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción y llevar a cabo la expresión de un gen. Actualmente nos encontramos en un momento histórico donde las investigaciones de los últimos 10 años nos muestran un escenario insospechado, mucho más complejo de lo anticipado.

La activación coordinada en el tiempo y el espacio de un gen requiere de múltiples niveles y de interacciones secuenciales e interdependientes entre un gran número de moléculas. Además son necesarios los elementos de regulación, tanto proximales como distales, con una arquitectura particular elevando los niveles de especificidad. Por si fuera poco, todo esto ocurre en el contexto fisiológico representado por la estructura de la cromatina. Además, el núcleo celular también participa en la expresión específica de los genes de una manera más activa de lo antes previsto.

El ambiente en el cual deben ocurrir la gran mayoría de los eventos de la regulación, de control de la progresión del ciclo celular, de la duplicación y la reparación del ADN, los eventos de recombinación, de impronta genómica y muchos otros tiene lugar en el contexto de la estructura de la cromatina. Los descubrimientos relacionados con la modulación de la estructura de la cromatina han mostrado su papel crítico en la regulación epigenética. Por lo tanto y de manera integral la transmisión de la información genética, principalmente codificada en la molécula del ADN, no puede entenderse sin una estricta dependencia con procesos de la regulación epigenética y viceversa.

De lo anterior surgen evidencias que demuestran que la desregulación al nivel de la estructuración del genoma en la cromatina representa hoy en día una de las causas del origen y progresión de procesos tumorigénicos. Durante muchos años los esfuerzos fueron canalizados en los defectos genéticos, minimizando la contribución de los procesos epigenéticos en el desarrollo de diversas enfermedades principalmente en el cáncer. Con base a lo anterior se pone de manifiesto la necesidad de invertir tiempo y esfuerzo en conocer mejor los mecanismos de regulación epigenética, para en conjunción con la información genética se logren desarrollar estrategias predictivas y terapéuticas en beneficio del sector salud.

### **Agradecimientos**

Agradecemos a Irene Patricia del Arenal y Héctor Rincón Arano por la lectura crítica del manuscrito. Las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio son apoyadas económicamente por: Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN203200 y IN209403), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (33863-N y 42653-Q), Third World Academy of Sciences (TWAS, Grant 01-055 RG/BIO/LA) y Fundación Miguel Alemán. MEDA es apoyado por parte del CONACYT (166354) con una beca de doctorado.

### **Referencias**

- 1- van Driel R, Fransz PF, Verschurre PJ (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116: 4067-4075.
- 2- Felsenfeld G, Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453.
- 3- Bulger M, Groudine M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13:2465-2477.
- 4- Butler JEF, Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16:2583-2592.
- 5- Kadonaga JT (2004) Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116:247-257.
- 6- Roeder RG (1998) Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eucariotic transcription. In *Mechanisms of Transcription*. Cold Spring Harbor Lab Press, Vol. LXIII pp. 201-218.
- 7- Reinberg D, Orphanides G, Ebright R, Akoulitchev S, Carcamo J, Cho H, Cortes P, Drapkin R, Flores O, Ha I, Inostroza JA, Kim S, Kumar P, Lagrange T, Leroy G, Lu H, Ma D-M, Maldonado E, Merino A,

- Mermelstein F, Olave I, Sheldon M, Shierhattar R, Stone N, Sun X, Weis L, Yeung K, Zawel L. (1998), The RNA polimerasa II general Transcription factors: Past, Present and Future. In Mechanisms of Transcription. Cold Spring Harbor Lab Press, Vol. LXIII pp. 83-103.
- 8-Blackwood EM, James T Kadonaga JT (1998), Going the distance: A current view of enhancer action. Science 281:60-63.
- 9- Smale ST (2001) Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. Genes Dev 15: 2503-1508.
- 10- Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai Y-F, Fracer P (2002) Long-range chromatin regulatory interactions *in vivo*. Nature Genet 32:623-626.
- 11- Brand AH, Breeden L, Abraham J, Sternglanz R, Nasmyth K. (1985) Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. Cell 41:41-48.
- 12- Kamakaka R (1997) Silencers and locus control regions: opposite sides of the same coin. Trends Biochem Sci 22: 124-128.
- 13- Ogbourne S, Antalis TM. (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. Biochem J 331: 1-14.
- 14- Clark AR, Docherty K. (1993) Negative regulation of transcription in eukaryotes. Biochem J 15: 521-541.
- 15- Recillas-Targa F, Razin SV. (2001) Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 11:227-242.
- 16- Valadez Graham V, Recillas Targa F (2002) Características y formación de un dominio transcripcionalmente activo en eucariotes. REB 21: 21-40.
- 17- West AG, Gaszner M, Felsenfeld G (2002) Insulators: many functions, many mechanisms. Genes Dev 16: 271-288.
- 18- Razin SV, Farrell CM, Recillas-Targa F (2003) Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level. Int Rev Cytol 226: 63-125.
- 19- Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G (2002) Locus control regions. Blood 100: 3077-3086.
- 20- Lemon B, Tjian R (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. Genes Dev 14: 2551-2569.
- 21- Orphanides G, Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. Cell 108: 439-451.
- 22- Zurita M, Merino C (2003) The transcriptional complexity of the TFIIH complex. TIGS 19: 578-584.
- 23- Carrozza MJ, Kusch T, Workman JL (2003) Repairing nucleosomes during transcription. Nat Struct Biol 10: 879-880.
- 24- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) Histone and chromatin cross-talk. Curr Opin Cell Biol 15: 172-183.
- 25- Hake SB, Xiao A, Allis CD (2004) Linking the epigenetic "language" of covalent histone modifications to cancer. Br J Cancer 90: 761-769.
- 26- Lachner M, Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. Curr Opin Cell Biol 14: 286-298.
- 27- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, CLeary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T (2002) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. Nature 412: 561-565.
- 28- Noma K, Allis CA, Grewal SI (2001) Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. Science 293: 1150-1155.
- 29- Litt MD, Simpson M, Recillas-Targa F, Prioleau M-N, Felsenfeld G (2001) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. EMBO J 20: 2224-2235.
- 30- Recillas-Targa F (2000) The chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene domains and their chromatin organization. Cell Mol Biol Lett 5: 451-467.
- 31- Prioleau M-N, Nony P, Simpson M, Felsenfeld G (1999) An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken  $\beta$ -globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. EMBO J 18: 4035-4048.
- 32- Saitoh N, Bell AC, Recillas-Targa F, West AG, Simpson M, Pikaart M, Felsenfeld G (2000) Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken  $\alpha$ -globin domain. EMBO J 19: 2315-2322.
- 33- Litt MD, Gaszner M, Simpson M, Allis CD, Felsenfeld G (2001) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken  $\beta$ -globin locus. Science 293: 2453-2455.
- 34- Lee JT (2003) Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting ? Curr Biol 13: R242-R254.
- 35- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16: 6-21.
- 36- Wolffe AP, Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. Science 286: 481-486.
- 37- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat Rev Genet 3: 662-673.
- 38- Recillas-Targa F (2002) DNA methylation, chromatin boundaries and mechanisms of genomic imprinting. Arch Med Res 33: 428-438.

- 39- Wade PA (2001) Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays* 23: 1131-1137.
- 40- Freritag M, Hickey PC, Khalafallah TK, Read ND, Selker EU (2004) HP1 is essential for DNA methylation in *Neurospora*. *Mol Cell* 13: 427-434.
- 41- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487.
- 42- Roberts CWM, Orkin SH (2004) The SWI/SNF complex-chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 133-142.
- 43- Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, Wade PA (2004) Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* 1677: 52-57.
- 44- Fry CJ, Peterson CL (2002) Unlocking the gates to gene expression. *Science* 295: 1847-1848.
- 45- Baylin SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *TIG* 16: 168-173.
- 46- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428.
- 47- Tilghman SM (1999) The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96: 185-193.
- 48- Pirrotta V (1998) Polycomb the genome: PcG, TrxG and chromatin silencing. *Cell* 93: 333-336.
- 49- Francis NJ, Kingston RE (2001) Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 2: 409-421.
- 50- Orlando V (2003) Polycomb, epigenomes and control of cell identity. *Cell*, 112, 599-606.
- 51- Dahiya A, Wong S, Gonzalo S, Gavin M, Dean DC (2001) Linking the Rb and Polycomb pathways. *Mol Cell* 8: 557-568.
- 52- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienka KJ, Sewalt RGAB, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629.
- 53- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292-301.
- 54- O'Brien TP, Bult CJ, Cremer C, Grunze M, Knowles BB, Langowski J, McNally J, Pederson T, Politz JC, Pombo A, Schmahl G, Spatz JP, van Driel R (2003) Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience. *Genome Res* 13: 1029-1041.
- 55- Kosak ST, Groudine M (2002) The undiscovered country: chromosome territories and the organization of transcription. *Dev Cell* 2: 690-692.
- 56- Parada LA, Misteli T (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* 12: 425-432.
- 57- Francastel C, Schubeler D, Martin DI, Groudine M (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 137-143.
- 58- Hahmk K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashik A, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST (1998) Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 12: 782-796.
- 59- Georgopoulos K (2002) Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and Ikaros. *Nat Rev Immunol* 2: 162-174.
- 60- Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahn K, Markenschlager M, Fisher AG (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91: 845-854.
- 61- Schubeler D, Francastel C, Cimbora DM, Reik A, Martin DR, Groudine M (2000) Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev* 14: 940-950.
- 62- Francastel C, Magis W, Groudine M (2001) Nuclear relocation of a transactivator unit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12120-12125.

## PARTICIPACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### Resumen.

La regulación de la expresión genética en los eucariontes representa un proceso central en la diferenciación, la proliferación y la muerte celular. La regulación genética incluye la unión de los factores de transcripción a sitios específicos del ADN y el reclutamiento de diferentes cofactores. En su medio ambiente natural, todo este proceso ocurre en el contexto de la cromatina en el cual, las modificaciones de las histonas son uno de los principales objetivos. Actualmente, la organización y dinámica del núcleo, así como sus implicaciones biológicas sobre la expresión genética, son tópicos de estudio por parte de diferentes grupos científicos. La regulación de la expresión genética puede ser visualizada, en términos generales, en tres diferentes niveles, todos ellos interrelacionados. El primero de ellos involucra la información genética codificada por la molécula del ADN. El segundo involucra el contexto natural en el cual el ADN es funcional. Esta es la base de la organización del genoma en la estructura de la cromatina y todas las actividades asociadas al remodelaje de ésta, conocido también como la regulación epigenética. Finalmente, un importante número de datos experimentales apoyan la idea de un papel más activo y dinámico del núcleo celular en la regulación de la expresión de los genes. En el presente capítulo, revisamos el conocimiento actual sobre los diferentes elementos relacionados con la regulación de la expresión genética, los factores generales involucrados en el inicio de la transcripción, e integramos esta información tomando en consideración la estructura de la cromatina y la contribución del núcleo celular en la expresión genética diferencial en una célula eucarionte.

**Palabras clave:** Transcripción, regulación genética, cromatina, núcleo, modificación de histonas.

### Semblanza del Dr. Félix Recillas Targa.



Nació el 11 de julio de 1961 en la Ciudad de México. Es biólogo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (1986) y doctor en Ciencias con especialidad en Bioquímica, por la Universidad de París 7, Francia (1993). Tesis realizada en el laboratorio del Dr. Klaus Scherrer en el Instituto Jacques Monod del CNRS. Realizó una primera estancia post-doctoral en el Instituto de Biotecnología de la UNAM de 1993 a 1996. Realizó una segunda estancia post-doctoral en el laboratorio del Dr. Gary Felsenfeld en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH) de 1996 a 1999 en Bethesda, Maryland, EU. Actualmente es investigador titular del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM desde 1999. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 2. Su desarrollo científico versa sobre el estudio del efecto de la estructura de la cromatina y la regulación génica a distintos niveles. En particular, emplea los dominios  $\alpha$ - y  $\beta$ - de las globinas como sistema experimental. Su trabajo experimental se ha publicado en 40 artículos internacionales y 10 nacionales, que han recogido más de 600 citas internacionales. Ha dirigido 2 tesis de licenciatura, 2 tesis de maestría y actualmente 5 tesis de doctorado. Es miembro de diferentes cuerpos académicos, entre los que se encuentran la Sociedad Mexicana de Bioquímica, la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo y la Academia Mexicana de Ciencias; asimismo, es Miembro del Consorcio promotor del Instituto Mexicana de Medicina Genómica, Miembro del Comité de Difusión de Información sobre el Genoma Humano de la Comisión Nacional para el Genoma Humano y Socio Fundador y Tesorero de la Sociedad Mexicana de Medicina Genómica (SOMEGEN).





---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## GENIO Y FIGURA DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

Rosario A. Muñoz Clares<sup>1</sup> y Roberto Velasco García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química; <sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

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

### TEMPER AND FIGURE OF BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE

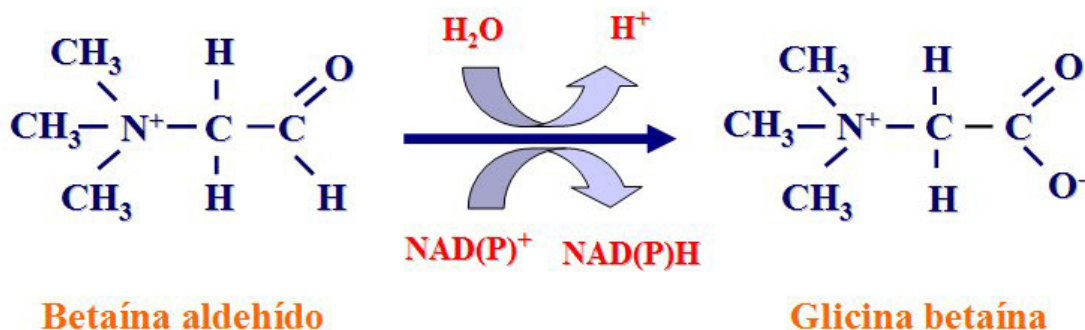
#### Abstract.

*Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) catalyzes the irreversible NAD(P)<sup>+</sup>-dependent oxidation of betaine aldehyde. In a wide variety of organisms, ranging from bacteria to mammals, this reaction is the last step in the biosynthesis of glycine betaine, an efficient osmoprotectant, but in those bacteria able to grow in choline as their only source of carbon and nitrogen, this reaction is an intermediate step in the catabolism of this compound. To understand how the functional and/or structural properties of this enzyme are modified to accomplish different metabolic roles, we are carrying studies on two BADHs: that of the leaves of the plant amaranth and that of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen. The first of these two enzymes is an example of the anabolic BADHs involved in the response to osmotic stress, and the second of the amphibolic BADHs, as it provides reduction equivalents for catabolism, NADH, and for anabolism, NADPH, when the bacteria are growing in choline or choline precursors, compounds that are abundant in the infection sites. In this article we describe the different kinetic properties and kinetic mechanisms of both enzymes, their similar chemical mechanisms, their long- and short-term regulation, and their structural and stability similarities and differences. In addition, as BADH might be a key enzyme in the establishment and growth of the pathogen, and thus a suitable target for antimicrobial agents, we briefly describe our studies with irreversible inhibitors of the enzyme*

**Keywords:** betaine aldehyde dehydrogenase; *Pseudomonas aeruginosa*; amaranth; kinetics; regulation; structure

## Introducción

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) (EC 1.2.1), enzimas que catalizan la oxidación, irreversible, de los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, con la concomitante reducción del  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . Concretamente las BADHs catalizan la oxidación irreversible de la betaína aldehído (Figura 1).



**Figura 1.** Reacción catalizada por las BADHs

Las ALDHs son de origen muy antiguo pero no todos sus miembros están representados a lo largo de la escala filogenética. Las BADH sí lo están, encontrándose desde las arqueobacterias hasta los mamíferos. Esto habla de la importancia de la función o funciones fisiológicas de esta actividad enzimática y justifica plenamente el interés de su estudio. Pero a este interés de conocer a fondo cómo una enzima lleva a cabo la catálisis, cómo se regula su actividad catalítica, cuáles son sus propiedades fisicoquímicas y estructura, qué relación existe entre su estructura y función, etc, se une el de conocer y entender cómo sus propiedades funcionales y/o estructurales se modifican y adaptan para que aun catalizando la misma reacción se integre a diferentes contextos metabólicos. La BADH constituye un excelente modelo para llevar a cabo este tipo de estudios, que los grupos de trabajo de los autores de este artículo han abordado en dos enzimas: las presentes en la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* y en la planta *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto). A continuación exponemos lo que hasta el momento hemos logrado conocer acerca de la función *-genio-* y de la estructura *-figura-* de esta enzima y nos referiremos a aquellas preguntas que nos parecen relevantes y que aún están sin contestar.

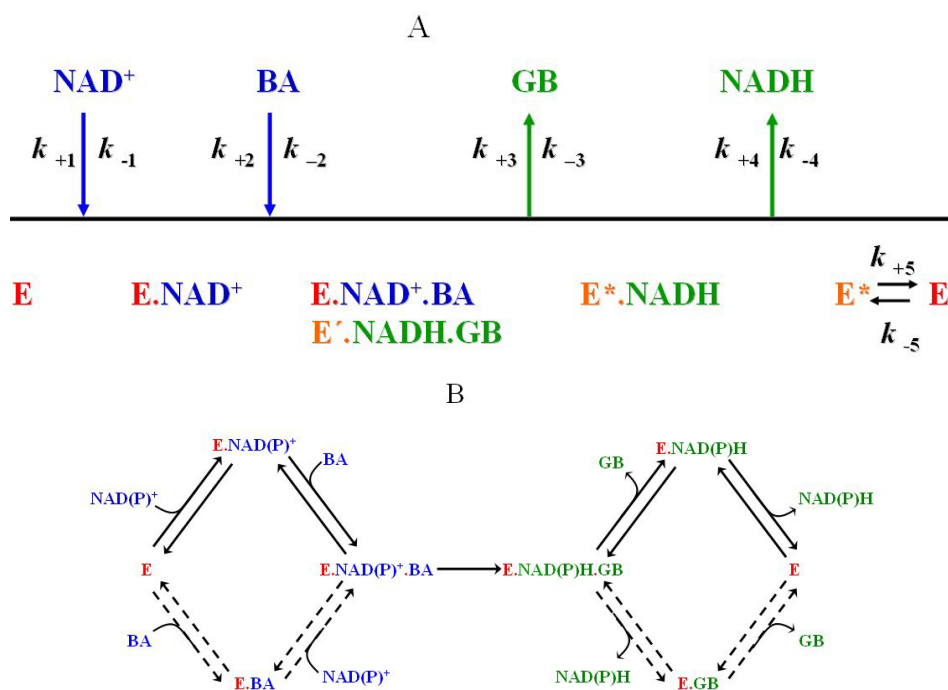
## GENIO

### Propiedades cinéticas

A pesar de que en las bases de datos de genes y proteínas existen las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de BADHs obtenidas desde los genomas secuenciados de diferentes organismos, la mayoría de ellas han sido reconocidas por su homología con las ya caracterizadas bioquímicamente y hasta la fecha son pocas las que han sido estudiadas cinéticamente a fondo. En todos los casos se han encontrado cinéticas michaelianas, tanto para el sustrato aldehído como para la coenzima. El  $\text{NAD}^+$  es la coenzima preferida en la mayor parte

de ellas, incluidas las enzimas de plantas (1) y de animales (2), pero unas pocas bacterianas usan indistintamente  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , siendo un ejemplo de estas últimas la enzima de *P. aeruginosa* (3). El grado de especificidad con respecto al sustrato aldehído también es variable, aunque en forma general es alto. Algunas enzimas, como la de amaranto (4), o la de hígado de bacalao (5) son capaces de oxidar a otros aldehídos que guardan cierto parecido estructural con la betaína aldehído, por ejemplo el dimetilsulfoniopropionaldehído o el  $\gamma$ -amino butiraldehído. Otras, como la de *Pseudomonas* (6), son altamente específicas para betaína aldehído.

El mecanismo cinético se ha determinado sólo en cuatro BADHs. El primero fue el de la enzima de *E. coli*, encontrándose un mecanismo cinético Ping Pong Bi Bi (7), que es poco compatible con la química de la reacción, de la que hablaremos más adelante. En cambio los otros tres estudiados, los de la enzimas de hoja de amaranto (8), de riñón de cerdo (9) y de *P. aeruginosa* (10), son mecanismos secuenciales Bi Bi en estado estacionario. Las dos primeras enzimas presentan un mecanismo ordenado, en el que el primer sustrato en unirse a la enzima es el nucleótido oxidado y el último producto en liberarse es el nucleótido reducido. Además, existe un paso de isomerización de la enzima libre, propio de un mecanismo Iso (11), de manera que ambos nucleótidos se unen a formas diferentes de la enzima (Figura 2A). Éste uno de los pocos mecanismos Iso que se conocen, lo que es de gran interés teórico y posiblemente tenga implicaciones fisiológicas, como se discutirá más adelante. En el caso de la enzima de *Pseudomonas*, el mecanismo es al azar, es decir la enzima libre puede unir al nucleótido oxidado o a la betaína aldehído, aunque la ruta preferida es aquella en la que el primer sustrato es el nucleótido oxidado (Figura 2B).



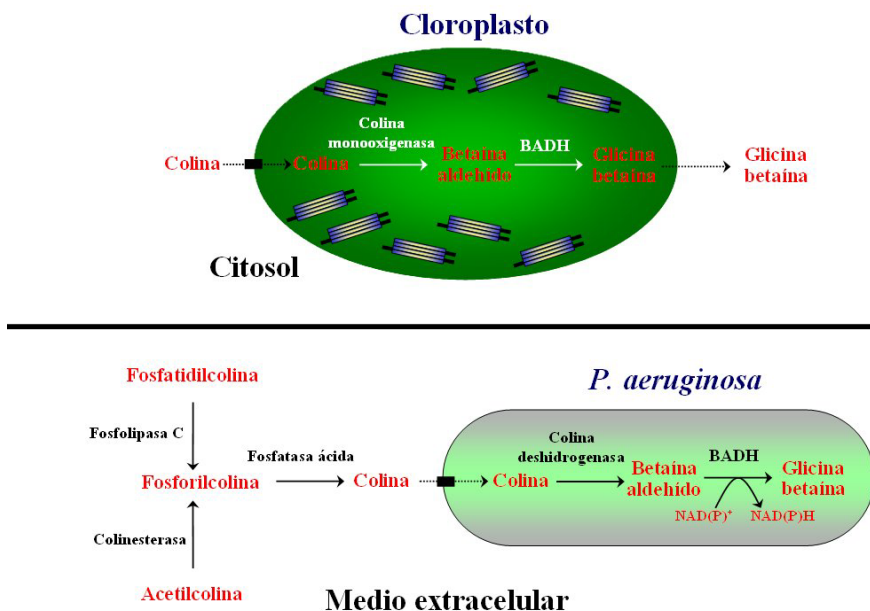
**Figura 2.** Mecanismo cinético de la BADH de amaranto (A) y de *P. aeruginosa* (B).

Aun cuando el mecanismo cinético no se haya determinado en todos los casos, se conocen valores para los parámetros cinéticos aparentes de varias de estas enzimas. En general la afinidad para el nucleótido y el aldehído, medida por los valores de  $K_m$ , es mayor en las

enzimas de bacterias (7), plantas (8), y animales (9) que usan preferentemente al  $\text{NAD}^+$ , con valores de  $K_m$  que van de 20 a 80  $\mu\text{M}$  para el  $\text{NAD}^+$ , y de 50-310 para la betaína aldehído, que en aquellas enzimas bacterianas que usan ambos nucleótidos (10), en las que estos valores están en los intervalos de 70-1075 y de 36-507, respectivamente. Este último grupo de enzimas bacterianas presenta valores de  $V_{\text{max}}$  muy superiores, cercanos a los 200  $\mu\text{moles/min/mg}$  proteína, a los del resto de las BADHs, que están en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{moles/min/mg}$  proteína para las enzimas de plantas (8) o animales (9) y alrededor de 70  $\mu\text{moles/min/mg}$  proteína para el resto de las bacterianas (7).

### Función fisiológica

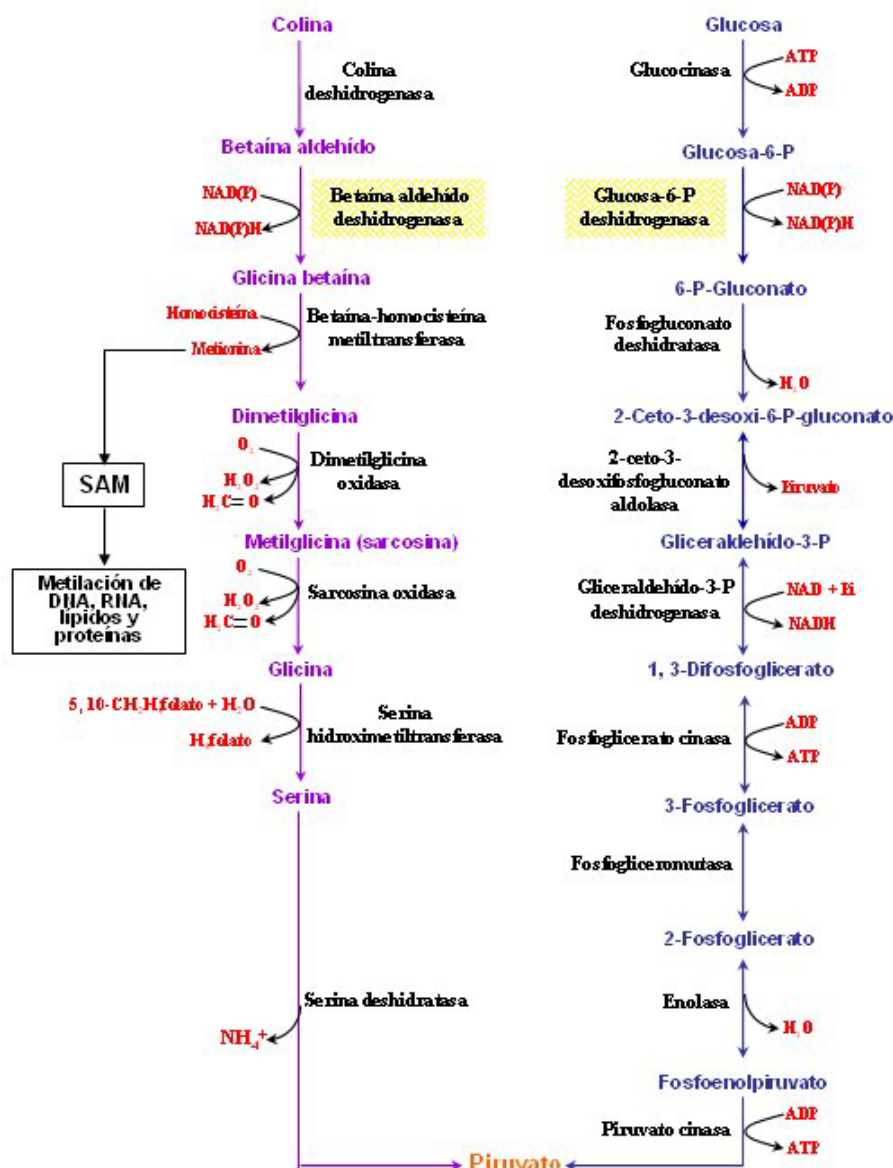
En la mayor parte de los organismos, la reacción catalizada por la BADH es el paso final de la ruta biosintética de glicina betaína a partir de colina o de sus precursores (Figura 3). La glicina betaína es un soluto compatible u osmoprotector que diversos procariotas y eucariotas acumulan en respuesta a un estrés osmótico externo (12-14). Este compuesto es compatible con las funciones celulares y no interfiere con el metabolismo, pero además, se ha demostrado que éste y otros osmolitos protegen a las enzimas de la salinidad, el calor, la deshidratación y el congelamiento (15,16). El ácido dimetilsulfoniopropiónico, producto de la reacción cuando el dimetilsulfoniopropionaldehído es el sustrato, es un también un eficiente osmoprotector en algunas especies vegetales (13).



**Figura 3.** Síntesis de glicina betaína en cloroplasto y metabolismo de colina en *P. aeruginosa*.

En aquellas bacterias que tienen la capacidad de crecer en colina o precursores de colina - acetilcolina, fosfatidilcolina o fosforilcolina - como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, la BADH cataliza un paso intermedio del metabolismo de estos compuestos y al mismo tiempo provee a la bacteria no sólo del osmoprotector glicina betaína sino también de equivalentes de reducción para el catabolismo ( $\text{NADH}$ ) y el anabolismo ( $\text{NADPH}$ ). Un ejemplo de este tipo de BADH anfóbica es la de *P. aeruginosa* (10). Puesto que colina o sus precursores

están presentes en los tejidos infectados por esta bacteria, la BADH puede ser un enzima clave en el establecimiento y crecimiento del patógeno. En la Figura 4 se comparan las rutas de degradación de colina y glucosa en estas bacterias para mostrar cómo la BADH cumple un papel metabólico semejante al de la glucosa-6P deshidrogenasa, con la que guarda además gran parecido en sus propiedades cinéticas. Es de notar que estas bacterias no usan la glucólisis clásica (ruta de Embden-Meyerhof) sino una modificada en la que no participan ni la fosfogluconato isomerasa, ni la fosfofructocinasa ni la aldolasa y en su lugar poseen a la glucosa-6-P deshidrogenasa, la fosfogluconato deshidratasa y la 2-ceto-3-desoxifosfogluconato aldolasa (ruta de Entner-Doudoroff).



**Figura 4.** Vías de degradación de la colina y de glucosa (vía de Entner-Doudoroff) en *P. aeruginosa*.

En animales, la glicina betaína además de su función osmoprotectora que es fundamental en el riñón (14), parece ser una importante fuente de metilos. Glicina betaína reacciona con homocisteína en una reacción catalizada por la enzima betaína homocisteína metil transferasa formando dimetilglicina y metionina, la que es después convertida a S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de metilos que utilizan las metilasas que adicionan estos grupos al DNA, RNA, lípidos y proteínas (17) (Figura 4). Resulta interesante que en humanos los elevados niveles de homocisteína han sido asociados con un alto riesgo de enfermedades cardiovasculares, y que una dieta rica en glicina betaína o en colina estabiliza los niveles de homocisteína sanguínea y disminuye el riesgo de estas enfermedades (18). Puesto que se ha sugerido que la acumulación de homocisteína y su autooxidación generan especies reactivas de oxígeno (19), las BADHs podrían ayudar en la prevención de un estrés oxidativo letal para la célula. Además, estas enzimas también parecen estar involucradas en el metabolismo de las poliaminas, ya que pueden utilizar como sustrato a varios de los aldehídos intermediarios en dichas vías (20).

### Mecanismo químico

La reacción catalizada por las BADHs, como la catalizada por el resto de las ALDHs, es la oxidación de un aldehído por transferencia de un hidruro ( $H^-$ ) al nucleótido,  $NAD^+$  o  $NADP^+$ . Esto no es una tarea fácil porque exige abstraer un electrón a un átomo de carbono que es deficiente en electrones debido a la aidez por éstos del oxígeno que tiene unido. Por ello, la estrategia que siguen estas enzimas es convertir el carbono trigonal planar del aldehído en un carbono tetraédrico no deficiente en electrones y al que, por tanto, sea fácil abstraerle un hidruro. La formación del carbono tetraédrico lo logran mediante catálisis covalente en la que fundamentalmente intervienen tres residuos del sitio activo que están conservados en todas las enzimas secuenciadas hasta la fecha: una cisteína, un glutámico y una asparagina. Los pasos catalíticos se muestran esquemáticamente en la Figura 5 y se describen a continuación.

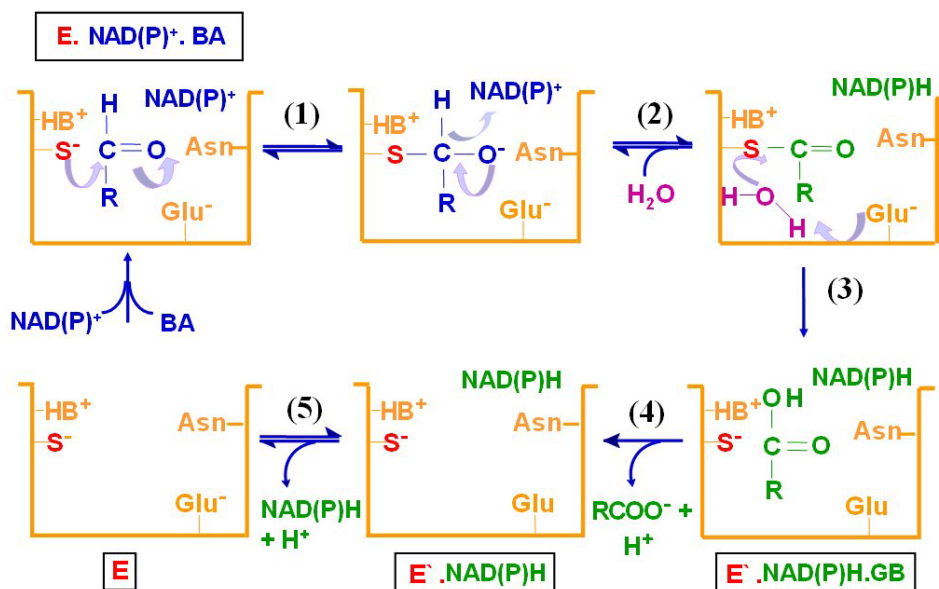


Figura 5. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las BADHs.



Una vez que el nucleótido y el aldehído se han unido a la enzima en forma reversible formando el complejo ternario productivo E-NAD(P)<sup>+</sup>-aldehído, se produce un ataque nucleofílico del residuo de cisteína catalítico sobre el sustrato formándose un tiohemiacetal intermediario con la ayuda de un residuo ácido (el glutámico catalítico) que cedería un protón (paso 1) (21). Otros autores proponen que no hay tal transferencia del protón y que por tanto se forma el oxianión del tiohemiacetal (22). En cualquier caso, la formación del intermediario tiohemiacetal implica un cambio conformacional del sustrato, ya que un carbono trigonal plano cambia a tetraédrico, lo que causa un movimiento en el átomo de oxígeno del carbonilo que pasa a ocupar una región del sitio activo que se conoce como “el hoyo del oxianión”, en donde el oxianión, o el hidroxilo, forma un puente de hidrógeno con el grupo amida de la asparagina catalítica. Se estabiliza así este intermediario permitiendo una eficiente transferencia del hidruro hacia la posición C4 de la coenzima, que queda reducida al mismo tiempo que el tiohemiacetal se oxida al correspondiente tioéster (paso 2). Un residuo aminoácido básico (el glutámico catalítico) desprotona a una molécula de agua, que ataca e hidroliza al tioéster, formando el producto ácido de la reacción, la glicina betaína (paso 3) (22). Posteriormente se produce la liberación ordenada de los productos regenerándose la enzima libre (pasos 4 y 5). En el caso de la BADH de hoja de amaranto tiene lugar posteriormente la isomerización de la forma libre de la enzima (paso no mostrado en el esquema de la Figura 5).

Mucho más fácil que oxidar a un aldehído por abstracción de un ion hidruro sería oxidar a un hidrato de aldehído, como lo es oxidar a un alcohol, puesto que en estos casos el carbono es tetraédrico y no deficiente en electrones. Y dado que los aldehídos en solución acuosa están en equilibrio con sus hidratos, de hecho en la mayoría de los casos el equilibrio está muy desplazado hacia los hidratos, surge la pregunta: ¿por qué las aldehído deshidrogenasas no usan a los hidratos de aldehído como sustratos de oxidación y en lugar de ello oxidan a los aldehídos? El objetivo inmediato de la reacción de oxidación catalizada por estas enzimas es producir el ácido correspondiente al aldehído y/o equivalentes de reducción y este objetivo podría alcanzarse por cualquiera de los dos caminos. No es lógico suponer que la primera enzima en la que surgió esta actividad enzimática, el ancestro de las enzimas que hoy conocemos, eligió por azar, de entre los dos sustratos posibles, al aldehído y que así se ha mantenido hasta nuestros días en todas las ALDHs. Porque igualmente podría haber surgido la actividad que oxida al hidrato de aldehído. Pero si ésta surgió, lo que es probable, parece que fue eliminada en el curso de la evolución y ello fuertemente indicaría que esta actividad no satisfizo los requerimientos de una ALDH. ¿Y por qué, si ambas como dijimos serían capaces de producir el ácido y el nucleótido reducido? La respuesta podría estar en que la oxidación del hidrato de aldehído, por un mecanismo semejante a la oxidación del alcohol, es totalmente reversible mientras que la oxidación del aldehído es irreversible bajo condiciones fisiológicas y experimentales. La pregunta inmediata a esta respuesta es: ¿y para qué se requiere una reacción irreversible?

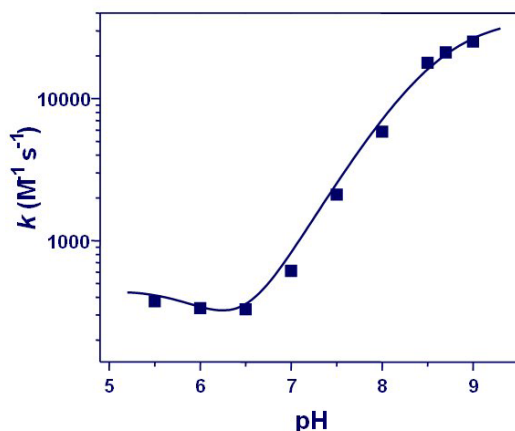
Para tratar de contestar esta pregunta tendremos que considerar la(s) función(es) fisiológica(s) que desempeñan estas enzimas. Los aldehídos, son compuestos electrofílicos, altamente reactivos, que interactúan con tioles y grupos amino. Pocos de ellos son benéficos o terapéuticos, como el retinaldehído (retinal), cuyas propiedades de absorción de la luz son indispensables para la visión (23). La mayoría son citotóxicos, genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos, aun a muy bajas concentraciones (24). Por ello se podría considerar a la actividad de muchas de las ALDHs como una forma efectiva de destoxificación y es claro que ésta será mucho más efectiva si la reacción no es reversible. Pero centrándonos en la reacción catalizada por la BADH también encontramos claras ventajas de una reacción irreversible sobre una reversible. Así, en aquellos organismos que en respuesta a un estrés osmótico acumulan glicina betaína, ésta es el producto final de una ruta metabólica y la irreversibilidad de la reacción en que se produce es muy conveniente para lograr que se acumule hasta las altas concentraciones requeridas para su función como un osmoprotector. Además, los organismos productores de glicina betaína con fines de osmoprotección, como *Escherichia coli* (25) o las

plantas (26) son incapaces de metabolizar a este osmolito una vez sintetizado, lo que redundaría en su acumulación.

Sin embargo, no todas las ALDHs producen compuestos que son un producto de deshecho o el producto final de una ruta metabólica. Un ejemplo lo tenemos en la BADH de *Pseudomonas* y otras bacterias que como ya mencionamos cataliza un paso intermedio en la ruta de degradación de colina o sus precursores cuando la bacteria está creciendo en alguno de estos compuestos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. La necesidad de una reacción irreversible en este caso no es tan clara, pero se hace evidente si analizamos la ruta metabólica en la que la BADH participa (Figura 4) y consideramos su papel anfibólico en este metabolismo, proveyendo de equivalentes de reducción para el catabolismo (NADH) y para el anabolismo (NADPH). Es tentador pensar que una reacción irreversible constituye una eficiente fuente de nucleótidos reducidos, particularmente de NADPH que es requerido no sólo con fines anabólicos sino además en la respuesta al estrés oxidativo al que patógenos como *P. aeruginosa* están sometidos por parte del organismo al que infectan (27).

### Reactividad de la cisteína catalítica

Para que la reacción catalizada por la BADH tenga lugar a valores de pH fisiológicos, los pasos de acilación y desacilación requieren que el grupo tiol de la cisteína catalítica y la molécula de agua que realiza la hidrólisis estén "activados" para ser buenos agentes nucleofílicos, es decir que hayan perdido un protón. Se sabe que el residuo de glutámico catalítico actúa como una base general activando a la molécula de agua, pero aún existen dudas sobre el mecanismo que activa a la cisteína catalítica.



**Figura 6.** Dependencia del pH de la constante de velocidad de inactivación de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con MMTS. La línea es el resultado del ajuste de los datos a la ecuación que considera dos valores de  $pK_a$ .

Puesto que es el ion tiolato ( $S^-$ ), no la forma tiol ( $-SH$ ), la especie que es reactiva como nucleófilo, la reactividad del residuo de cisteína catalítico está determinada en gran parte por la fracción del tiol que está presente en la forma de tiolato, lo que a su vez depende de la basicidad del grupo tiol, es decir de su  $pK_a$ . A pesar de que el grupo tiol de los residuos de cisteína es el nucleófilo más potente de los existentes en las proteínas, su valor de  $pK_a$  es de 8.9, y de ser éste el del residuo de cisteína catalítico la enzima no sería activa a valores de pH fisiológicos. Se requiere por lo tanto que el sitio activo esté diseñado de tal manera que el tiol de la cisteína



catalítica tenga un valor de  $pK_a$  considerablemente disminuido. Una forma de lograrlo es mediante la formación de un par iónico con un residuo de un aminoácido cargado positivamente. Nosotros exploramos esta posibilidad en la enzima de amaranto y de *P. aeruginosa* determinando el efecto del pH sobre la reactividad de la cisteína catalítica con un reactivo específico para tioles, el metil metanotiosulfonato (MMTS), el cual modifica en forma covalente a la cisteína catalítica inactivando a la enzima. La dependencia del pH de la constante de velocidad de inactivación para ambas enzimas (Figura 6) mostró dos valores de  $pK_a$  para esta cisteína: uno muy bajo, aproximadamente de 4, que es el del tiolato cuando está formando un par iónico con otro residuo del sitio activo cargado positivamente, de naturaleza aún desconocida, y otro, de aproximadamente 7.6, que es el del tiolato libre (28). La formación de pares iónicos provoca así una disminución de varias unidades de pH en el  $pK_a$  del tiol y, por lo tanto, a los valores de pH del medio intracelular el residuo de cisteína catalítica está mayoritariamente en forma de tiolato muy reactivo.

La alta reactividad de la cisteína catalítica podría ser de utilidad para el diseño de fármacos específicos que pudieran utilizarse como agentes antibacterianos en la lucha contra el patógeno *P. aeruginosa*, que presenta una alta resistencia hacia los antibióticos debido a su baja permeabilidad membranal y a su activo sistema de expulsión multidrogas (29). En un primer intento de explorar esta estrategia, estudiamos el efecto del disulfiram (DSF), sobre la BADH de este microorganismo, y con fines comparativos, en la BADH de amaranto. Esta sustancia, que se utiliza como un auxiliar en el tratamiento del alcoholismo crónico, inhibe irreversiblemente a la aldehído deshidrogenasa hepática involucrada en el metabolismo del alcohol (ALDH2), provocando una acumulación del acetaldehído, lo que desencadena una reacción desagradable (náuseas y vómitos) (30). En el caso de la betaína aldehído, el sustrato de la BADH, se ha comprobado que su acumulación resulta letal para *P. aeruginosa* (31), por lo que esta enzima parecería ser un blanco excelente de agentes antibacterianos. A diferencia de la BADH de hígado de humano, que es insensible a la inhibición por DSF (32), las enzimas de *P. aeruginosa* y de amaranto se inactivan por este compuesto (33), abriendo así un camino de investigación para el posible desarrollo de un nuevo agente terapéutico contra las infecciones de este patógeno oportunista. También es interesante el efecto inactivante que sobre la BADH de amaranto tiene el DSF, porque éste es un compuesto análogo a un grupo de compuestos herbicidas de uso muy extendido, los tiocarbamatos.

### Regulación a largo plazo

La regulación a largo plazo se ejerce modificando los niveles de la enzima presentes en la célula, ya sea por un cambio en su síntesis o en su degradación. No se conocen hasta el momento ni los mecanismos de degradación de la BADH ni su vida media en ningún organismo, pero se sabe que es una enzima inducible. En las bacterias y plantas en las que BADH juega un papel relevante en la respuesta al estrés osmótico se ha demostrado que en los niveles de mRNA, proteína y actividad de BADH se incrementan notablemente bajo esta condición adversa, ya sea provocada por déficit de agua o por una elevada salinidad del medio (1,6,34). De hecho, en muchos de estos organismos, los niveles de expresión del gen que codifica para la BADH en ausencia de este estrés son muy bajos, prácticamente nulos. Por el contrario, en las bacterias en que la BADH participa en la degradación de colina o sus precursores, como en *P. aeruginosa*, el estrés osmótico no la induce, pero sí la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo (3,6,35). En una de estas bacterias, *Rhizobium meliloti*, este estrés disminuye la actividad de las enzimas que degradan glicina betaína (35), lo que provoca la acumulación del osmoprotector.

### Regulación a corto plazo

La regulación a corto plazo de una actividad enzimática se lleva a cabo por cambios en la actividad de la enzima preexistente a consecuencia ya sea de la unión de algún ligando -

sustratos, productos, activadores o inhibidores - o de modificación covalente. El mecanismo de esta regulación puede involucrar un cambio en la conformación de la enzima provocado ya sea por la unión de los ligandos o por la modificación covalente. De aquí el nombre de regulación a corto plazo, ya que ocurre en un tiempo muy corto, que va desde los micro o milisegundos requeridos para un ciclo catalítico, hasta unos pocos minutos que ciertos cambios conformacionales requieren. Generalmente los cambios son reversibles, pero pudieran ser irreversibles o de reversión lenta.

Hasta el momento no se conoce ningún compuesto fisiológico o no fisiológico activador de las BADHs, ni de las ALDHs en general, pero sí se conocen inhibidores reversibles - productos, sustratos y metabolitos análogos de éstos - y compuestos no fisiológicos que actúan a través de modificación química irreversible. Hablaremos a continuación de los compuestos fisiológicos que producen inhibición reversible.

#### Inhibición por producto

Aun cuando la reacción catalizada por la BADH es irreversible, para lograr que el aldehído se convierta eficientemente en el ácido se requiere que este producto no sea un inhibidor de la reacción, de manera que no inhiba su propia síntesis. La regla general es que el producto de cualquier reacción catalizada, aunque ésta sea irreversible, es un inhibidor porque forma complejos con la enzima reduciendo así su concentración disponible para unir al sustrato y/o realizar la catálisis. Debido a ello, para que un producto no inhiba la reacción en la que es formado la enzima que participa debe tener una afinidad muy baja por él, de manera que las concentraciones de estado estacionario de los complejos de la enzima con este producto sean muy bajas, prácticamente despreciables, aun a concentraciones altas del producto. En todas las ALDHs en las que se ha estudiado la posible inhibición por el producto ácido se ha encontrado que éste no inhibe. En el caso concreto de la BADH, hemos encontrado que aun a concentraciones superiores a 100 mM la glicina betaína no inhibe significativamente la reacción en que es producida, lo que permite que se acumule hasta los niveles necesarios para ejercer su función osmoprotectora. A pesar de la relevancia de este aspecto para la función fisiológica de las ALDHs, hasta el momento no se conoce cuál o cuáles son las características del sitio activo de estas enzimas que permiten el tener una afinidad alta por el aldehído y muy baja por ácido.

El otro producto de la reacción, el nucleótido reducido NAD(P)H, sí es un inhibidor: mixto con respecto al NAD<sup>+</sup> en el caso de la BADH de hoja de amaranto (8), y competitivo con respecto a NADP<sup>+</sup> y mixto con respecto a NAD<sup>+</sup> en el caso de la enzima de *P. aeruginosa* (10). Las constantes de inhibición están en el intervalo de 50-180  $\mu$ M, indicando una alta afinidad por la enzima. Particularmente efectiva puede ser la inhibición mixta por NADH con respecto al NAD<sup>+</sup>, que contrasta con la inhibición competitiva observada en mayoría de las deshidrogenasas conocidas. La inhibición competitiva puede ser revertida por el incremento de la concentración del sustrato que inevitablemente sigue a la inhibición, mientras que el componente incompetitivo de la inhibición mixta hace que el grado de inhibición no sólo no disminuya sino que se incremente a medida que se acumula el sustrato (36). Esto significa que en el mecanismo Iso y en la reacción NAD<sup>+</sup>-dependiente de la BADH de *P. aeruginosa*, el nucleótido reducido es un inhibidor mucho más efectivo que si produjese inhibición competitiva, y por tanto puede ejercer un mayor control sobre la velocidad de la reacción.

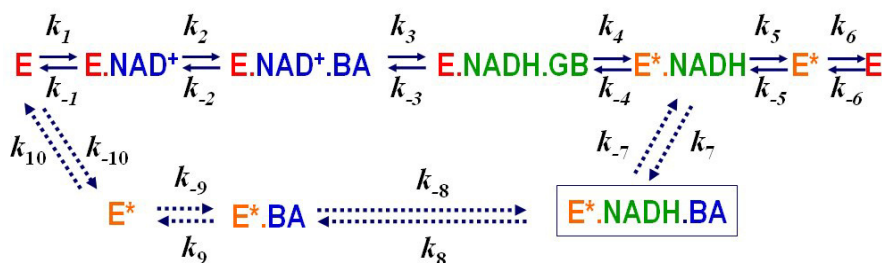
Sin embargo, en cualquier caso, si el nucleótido reducido es oxidado por otras reacciones a una velocidad tal que evite su acumulación, y por tanto la inhibición, la reacción de oxidación del aldehído puede continuar hasta el agotamiento de este último. Pero ¿qué ocurriría si hay un suministro continuo del aldehído por una reacción precedente, como ocurre en la ruta de biosíntesis de glicina betaína o en el catabolismo de colina en las bacterias, y la velocidad de regeneración del NAD(P)<sup>+</sup> es menor que la de producción del nucleótido reducido?. Aun cuando el incremento en los niveles del NAD(P)H inhiban en cierto grado su propia producción, si esta

inhibición no es suficiente se corre el riesgo de disminuir el cociente  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  y así alterar otras rutas metabólicas en forma que puede ser deletérea para la célula. Ésta podría ser la razón por la que las BADHs, al menos las estudiadas por nosotros, presentan inhibición por el sustrato aldehído (1,6), cuyos niveles se incrementarán como consecuencia de la disminución en la velocidad a la que se produce su oxidación a medida que progresa la inhibición por el nucleótido reducido.

### Inhibición por sustrato

Generalmente el fenómeno de inhibición por sustrato, en el que concentraciones altas de sustrato en lugar de incrementar la velocidad, como es de esperar, la disminuyen, no posee relevancia fisiológica. Pero creemos que en el caso de ciertas BADHs, concretamente en el de la enzima de hoja de amaranto en la que se ha hecho una caracterización cinética completa de esta inhibición (37), sí la tiene.

La inhibición de la BADH por betaína aldehído es parcial y debida a la aparición de una ruta alterna de liberación del NADH más lenta que la ruta que opera a bajas concentraciones del aldehído (Fig. 7). A concentraciones altas, la betaína aldehído puede unirse no sólo al complejo binario que forma la enzima con el nucleótido oxidado, que es la forma productiva de unión en la que se genera el complejo ternario enzima-nucleótido oxidado-aldehído que va a producir la catálisis, sino que también puede unirse al complejo enzima-nucleótido reducido dando lugar a un complejo no productivo. Sin embargo, el nucleótido reducido puede liberarse de este complejo, y como el complejo enzima-aldehído que se produce cuando el nucleótido reducido se libera es muy inestable, rápidamente se regenera la enzima libre. La inhibición resulta de que el paso limitante de la reacción es la liberación del nucleótido reducido del complejo binario que forma con la enzima y de que este paso se hace aun más lento cuando el nucleótido se libera del complejo que forma con la enzima y el aldehído. En otras palabras, la constante de velocidad  $k_8$  mostrada en el mecanismo de la Figura 7, es menor que la constante de velocidad  $k_5$ .



**Figura 7.** Mecanismo cinético de la BADH de amaranto a altas concentraciones de betaína aldehído.

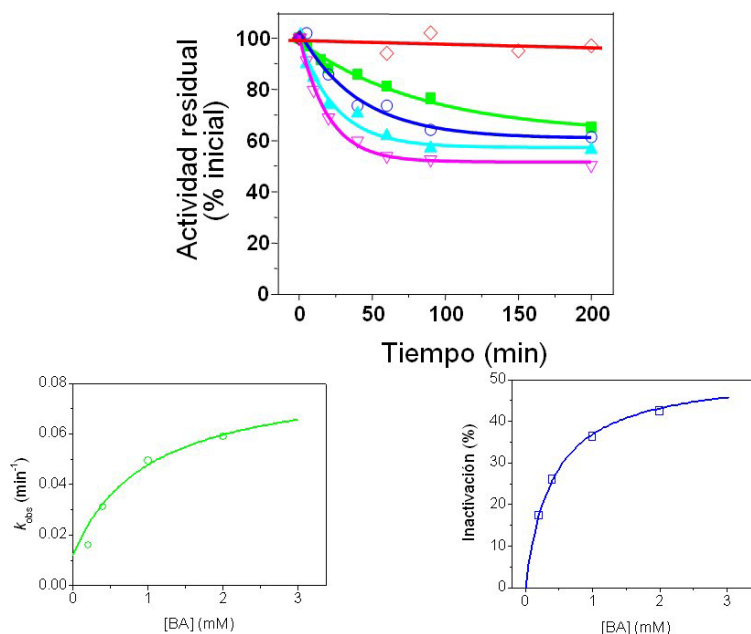
### Inhibición por análogos de los sustratos

Particularmente interesante puede ser la inhibición por los nucleótidos de adenina - ATP, ADP y AMP - que se comportan como análogos del  $\text{NAD(P)}^+$  y al ser unidos por la enzima inhiben la reacción. De esta forma, la actividad de la BADH podría estar sujeta a regulación por la carga energética celular. Hemos estudiado la cinética de inhibición por estos compuestos de las enzimas de hoja de amaranto y de *P. aeruginosa*, encontrando que los tres nucleótidos son

inhibidores de ambas enzimas, competitivos frente a  $\text{NAD(P)}^+$ . Lo que resulta interesante es que el orden de potencia como inhibidores de estos nucleótidos es inverso en la enzima vegetal que en la enzima bacteriana. En la primera AMP es el inhibidor más potente, seguido de ADP y finalmente de ATP, mientras que en la segunda ATP inhibe más que ADP y éste más que AMP (Velasco-García, R, Mújica-Jiménez C y Muñoz-Clares RA, resultados no publicados). Este comportamiento es consistente con el papel biosintético de la BADH de amaranto y principalmente degradativo de la enzima de *P. aeruginosa*.

#### Cambios conformacionales inducidos por los ligandos

Las BADHs de *Pseudomonas* y amaranto sufren importantes cambios conformacionales cuando unen a las coenzimas (ambas enzimas) o a la betaína aldehído (la enzima de amaranto) (28,38). La cinética de estos cambios en ambas enzimas puede seguirse por una disminución en la reactividad o accesibilidad del tiolato del residuo de cisteína catalítico, lo que se refleja en una disminución en la velocidad y el grado de inactivación producido por modificación química con reactivos específicos de grupos tioles. Solamente en el caso de la enzima de amaranto, los cambios conformacionales inducidos por betaína aldehído o NADH se acompañan de pérdida de actividad catalítica, pero no así los inducidos por  $\text{NAD}^+$ . Tanto la constante de velocidad de la pérdida de actividad como la actividad residual al equilibrio muestran una dependencia hiperbólica de la concentración del ligando (Fig 8), lo que indica que se establece un equilibrio entre una forma activa y otra inactiva de la enzima que tiene unido al ligando:



**Figura 8.** (A) Cinética de inactivación de la BADH de amaranto por incubación con 0.25 (■), 0.5 (○), 1 (▲), y 2 (▼) mM betaína aldehído. Enzima incubada en ausencia del aldehído (◇). (B) Dependencia de la constante de inactivación de la concentración de betaína aldehído. (C) Dependencia del grado de inactivación al equilibrio de la concentración de betaína aldehído.

### Oxidación de la cisteína catalítica

Las BADHs vegetales involucradas en la respuesta al estrés osmótico están localizadas en el cloroplasto y se sabe que las reacciones de transporte de electrones en este organelo generan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) por transferencia incompleta de electrones a los aceptores fisiológicos finales. Bajo las condiciones de estrés osmótico en las que la BADH de cloroplasto funciona, la producción de ROS se incrementa debido a que el cierre de los estomas, que es la primera respuesta de la planta para evitar la pérdida de agua por transpiración, conduce a una disminución en las reacciones de asimilación del CO<sub>2</sub> y por tanto a una disminución en los niveles de aceptores de electrones. Se sabe también que durante la invasión de *P. aeruginosa* las células infectadas, como un mecanismo de defensa, producen ROS, a las que tiene que enfrentarse la bacteria (27). Como consecuencia, las BADHs de ambas fuentes funcionan en ambientes con estrés oxidativo, lo que parecería ponerlas en una situación especialmente difícil ya que, como hemos mencionado, su catálisis depende de la existencia en el sitio activo de un tiolato excepcionalmente reactivo y por tanto muy susceptible a oxidación. Se podría esperar por ello que estas enzimas fuesen rápidamente inactivadas bajo las condiciones oxidativas del cloroplasto o del sitio de infección. Sin embargo, puesto que ambas son activas bajo esas condiciones, es mucho más lógico suponer que han desarrollado algún mecanismo que les permite evitar la oxidación de su cisteína esencial, y que incluso pudieran sacar ventaja de las condiciones oxidativas para regular su actividad.

Para explorar este posible mecanismo tratamos *in vitro* tanto a la BADH bacteriana como a la de la planta con peróxido de hidrógeno y confirmamos que efectivamente ambas enzimas son bastante resistentes a oxidación por este compuesto, incluso a concentraciones superiores a las que pueden darse *in vivo*. Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó en presencia de betaína aldehído, ambas enzimas fueron altamente susceptibles de oxidación, inactivándose en su totalidad la enzima bacteriana y hasta un máximo de aproximadamente 50% la enzima vegetal. Este es un resultado sorprendente porque era de esperarse que el aldehído al reaccionar en forma covalente con el tiolato catalítico - primer paso de la catálisis - lo protegería de la oxidación. ¿Por qué entonces encontramos el efecto opuesto? La explicación definitiva no la tenemos por el momento, pero podría deberse a que este experimento se realiza bajo condiciones no catalíticas, es decir en ausencia de la coenzima, por lo que se forma un complejo enzima-betaína aldehído que no se forma durante la catálisis cuando tanto el aldehído como la coenzima están presentes, ya que la enzima une a la coenzima antes que al aldehído. En este complejo binario enzima-aldehído pudiera ser que no ocurriera la formación del tiohemiacetal, sino que por el contrario el tiolato catalítico quedase aun más expuesto al solvente o más reactivo de lo que lo está en la enzima libre. Una explicación alternativa es que sí se formara el tiohemiacetal pero que éste fuera susceptible a oxidación. Cualquiera que sea el mecanismo por el cual betaína aldehído incrementa la oxidación de la cisteína catalítica cuando se une a la enzima libre, una pregunta relevante es: ¿tiene alguna consecuencia fisiológica el que el aldehído no sólo no proteja a la enzima de la inactivación por el oxidante sino que la desproteja? Solamente lo tendrá en el caso de que *in vivo*, bajo alguna condición, exista una fracción de enzima que lleve unido exclusivamente al aldehído, lo que ocurrirá cuando los niveles del nucleótido oxidado sean muy bajos (recuérdese que el nucleótido se une con mayor afinidad a la enzima que el aldehído). En esta situación puede ser muy ventajoso para la célula el que la enzima se inactive, como discutimos a continuación.

### Implicaciones fisiológicas de los mecanismos de regulación a corto plazo

Los mecanismos de inhibición e inactivación que hemos descrito adquieren relevancia fisiológica si se considera que la reacción catalizada por la BADH es irreversible. Una reacción irreversible es como un coche sin frenos moviéndose cuesta abajo. Si la velocidad de la reacción no se controla, el peligro es que todo, o una importante fracción del NAD(P)<sup>+</sup> sea reducido a

NAD(P)H, si las reacciones que regeneran al  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  no son capaces de mantener el balance entre nucleótidos oxidados y reducidos, lo que podría tener consecuencias metabólicas graves. Esto puede ser particularmente frecuente en el caso del cloroplasto ya que la poza del par  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  no está en equilibrio con la del  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , por lo que los niveles de  $\text{NAD}^+$  no se pueden regular mediante las reacciones fotosintéticas de asimilación del carbono. Por ello la síntesis del osmoprotector glicina betaína en la planta requiere de un control estricto para evitar no sólo la producción incontrolada de este compuesto, que al no metabolizarse posteriormente puede significar un desperdicio de carbono y nitrógeno, sino también situaciones potencialmente catastróficas, como sería el agotamiento del  $\text{NAD}^+$  intracloroplástico.

Normalmente el frenado en las reacciones irreversibles corre a cargo de la inhibición por los productos, pero como en el caso de la BADH la glicina betaína no inhibe, este papel regulador parece quedar a cargo del producto NADH y del sustrato betaína aldehído, ambos inhibidores como hemos descrito. No sólo eso, sino que la inhibición se potencia cuando ambos ligandos - sustrato y producto nucleótido - están juntos, dado que la inhibición por el sustrato betaína aldehído ocurre principalmente por su unión al complejo E-NADH. Pero aún más, ambos ligandos conducen a una lenta inactivación parcial y betaína aldehído favorece la inactivación por oxidación. Es tentador pensar que estos efectos negativos del aldehído y del nucleótido reducido forman parte de un mecanismo de regulación a corto plazo desarrollado por la BADH de amaranto con la finalidad de evitar el agotamiento del  $\text{NAD}^+$  intracloroplástico. Este mecanismo es novedoso, en el sentido de que no ha sido descrito hasta la fecha para otras enzimas, y muy efectivo, puesto que puede funcionar tanto bajo condiciones reductoras como oxidantes.

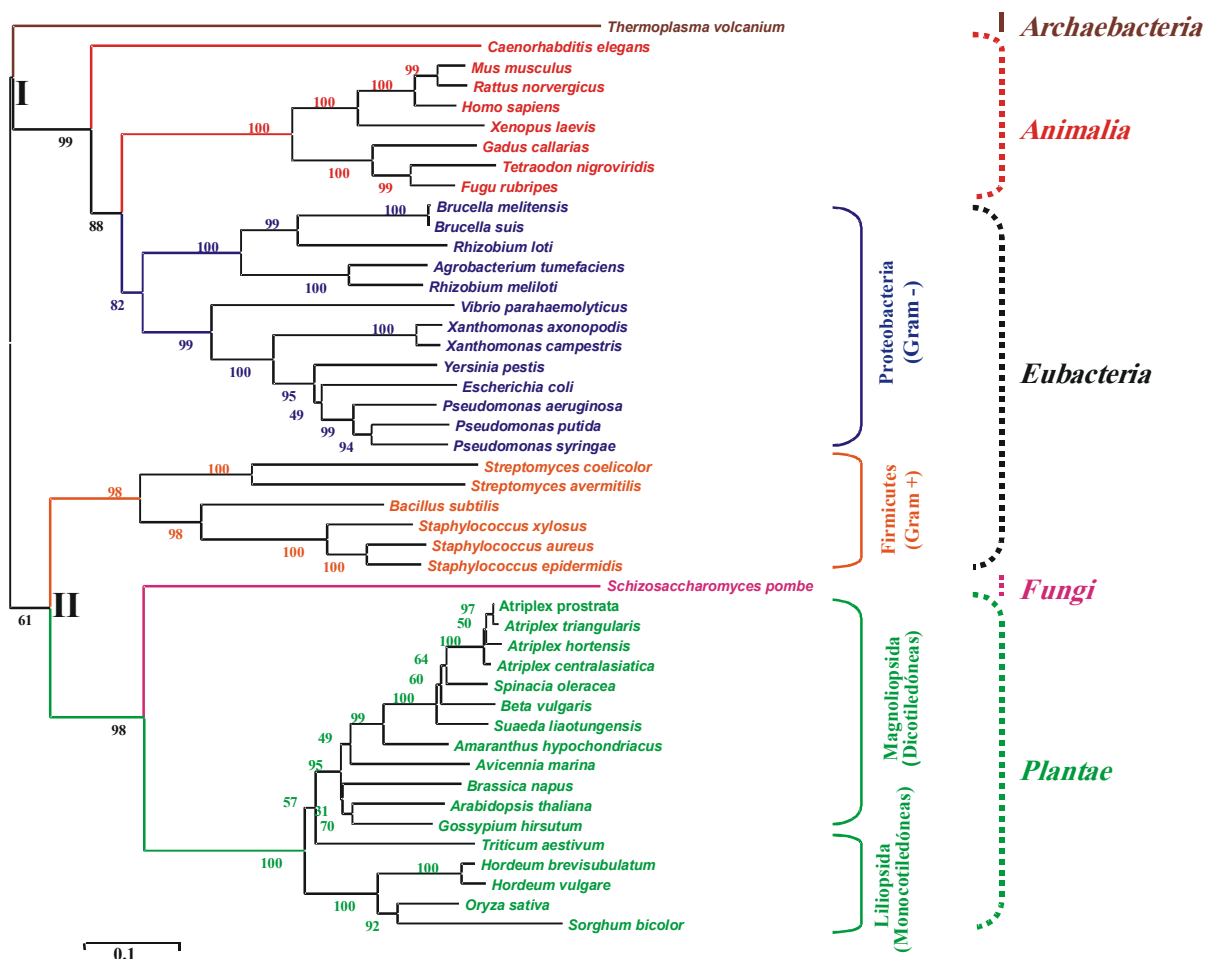
## FIGURA

### Estructura primaria

A la fecha (mayo del 2004), el número de secuencias de genes de ALDHs y BADHs disponibles en la base de datos GenBank es de 753 y 50, respectivamente. Entre estas últimas se encuentran las secuencias de *A. hypochondriacus* y de *P. aeruginosa*. La del vegetal fue publicada en el año 1998, en una colaboración de nuestro grupo de investigación (34), y la de la bacteria en el 2000, junto con la secuencia completa del genoma de este microorganismo (39). En un alineamiento múltiple realizado con 46 secuencias aminoacídicas de BADHs - 1 de arqueobacteria, 1 de hongo, 19 de eubacterias, 17 de plantas y 8 de animales (a estas últimas también se les denomina ALDH9) - encontramos que de los aproximadamente 500 residuos de aminoácidos que tiene cada secuencia, 40 están estrictamente conservados. Entre éstos se encuentran la cisteína catalítica, en la posición 286 en la secuencia de *P. aeruginosa* y 294 en la de amaranto, el glutámico catalítico (E252 y E260, respectivamente) y la asparagina catalítica (N153 y N162, respectivamente). Nosotros hemos corroborado la función esencial de la cisteína catalítica en la enzima de *P. aeruginosa*, al obtener por mutagénesis sitio específica una mutante (C286A) estructuralmente similar a la silvestre y con la capacidad de unir la coenzima  $\text{NAD(P)}^+$  pero carente de actividad (40).

A partir del alineamiento de las 46 secuencias de BADHs mencionadas realizamos un análisis filogenético (40) y obtuvimos el árbol que se presenta en la Figura 9, en el que se observan dos grandes grupos. El Grupo I reúne a las proteínas de proteobacterias (55-83 % de identidad con respecto a la de *P. aeruginosa*), a las de los animales (44-53 %) y a la de la arqueobacteria *Thermoplasma volcanium* (37%). En el grupo II se encuentran las de bacterias firmicutes (41-43 %), la del hongo *Schizosaccharomyces pombe* (36 %) y las de plantas (37-42 %). Esta división parece reflejar un evento de duplicación del gen que codifica para la BADH que pudo haberse presentado en tiempos ancestrales, antes de la aparición de las eubacterias. Esta hipótesis está apoyada por la inclusión de la secuencia de la arqueobacteria en el Grupo I, y está de acuerdo con lo propuesta realizada por otros autores de que la familia de las BADHs es una

las más “antiguas” dentro de la superfamilia de las ALDHs, y de que su aparición es previa a la divergencia de eucariontes y eubacterias (41).

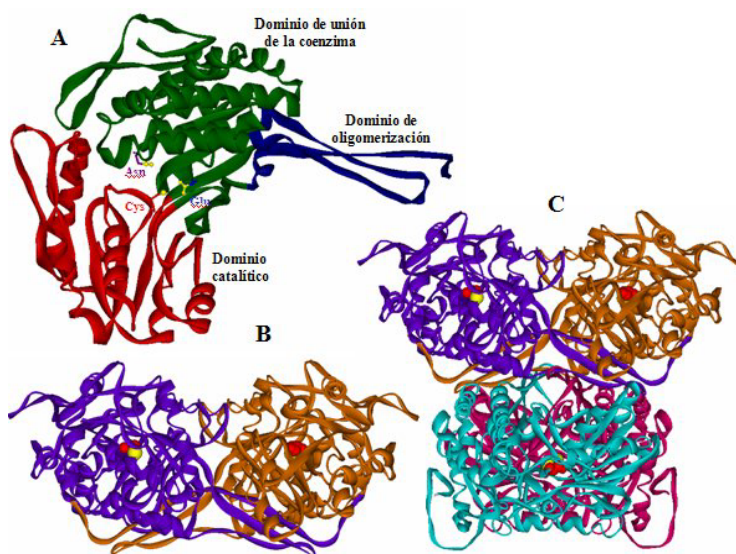


**Figura 9.** Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos de la BADH de 46 diferentes organismos.

### Estructura nativa y estabilidad

A partir de las coordenadas cristalográficas de la enzima de hígado de bacalao, *Gadus callarias*, que es la única BADH cuya estructura tridimensional ha sido resuelta por cristalografía y difracción de rayos X (5), obtuvimos modelos tridimensionales del monómero, dímero y tetramero de la BADH de *P. aeruginosa* (42) (Figura 10). Como ocurre en todas las ALDHs cristalizadas hasta la fecha, cada subunidad de las BADHs tiene tres dominios distintos: uno de unión a la coenzima, que presenta una estructura  $\alpha/\beta$  con un plegamiento tipo Rossmann, otro catalítico que une al aldehído y muestra cierta semejanza estructural con el primero, y un tercero, de oligomerización, que podría considerarse como una extensión del dominio de unión a la coenzima y que interviene en la formación del dímero. En la Figura 10 también se muestran los tres residuos catalíticos: C286, E252 y N153, que durante la catálisis realizan el ataque nucleofílico sobre el aldehído, la activación de la molécula de agua y la estabilización del oxianión, respectivamente, como ya se describió.





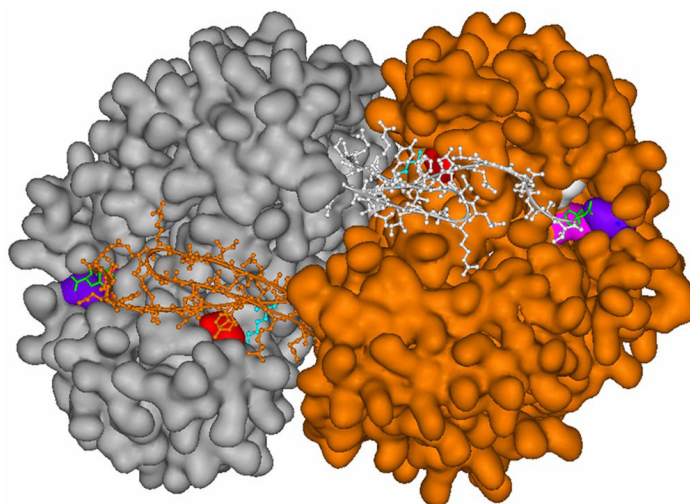
**Figura 10.** Modelo tridimensional del monómero (A), dímero (B) y tetrámero (C) de la BADH de *P. aeruginosa*. El monómero muestra los tres dominios característicos de todas las ALDHs, así como los residuos esenciales para la catálisis de esta BADH. El dímero y el tetrámero presentan a la Cys esencial en esferas rojas y amarillas (átomo de azufre).

De las 46 BADHs mostradas en la Figura 9, sólo se conoce la estructura cuaternaria de 8, entre ellas la de amaranto (1) y la de *P. aeruginosa* (43). Las enzimas de proteobacterias y animales (5,7,43,44), son tetraméricas (dímero de dímeros), mientras que las de bacterias firmicutes y las de vegetales (1,45) son dímeros, por lo que parece existir una correlación entre la inclusión de una enzima en el Grupo I o II del árbol filogenético y su estado de agregación.

Las enzimas tetraméricas de *P. aeruginosa* y de riñón de cerdo, pero no la dimérica de hoja de amaranto, se disocian a bajas concentraciones de iones monovalentes (43), indicando que éstos son importantes para la estabilidad del tetrámero, probablemente debido a que hay una gran densidad de cargas negativas en la región de contacto entre los dímeros. Ambas enzimas tetraméricas mantienen su estructura cuaternaria nativa a la concentración fisiológica de KCl (43).

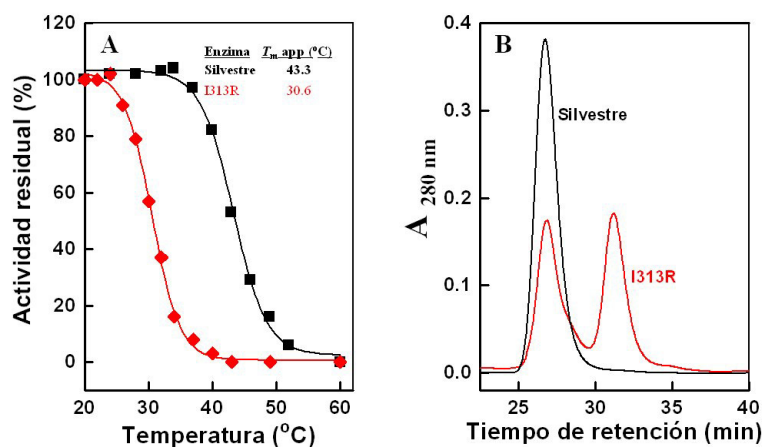
No se conoce el factor que determina la estructura cuaternaria de las ALDHs o de las BADHs, aunque se ha encontrado que el área de contacto dímero-dímero es considerablemente más hidrofóbica en las ALDHs tetraméricas que su correspondiente en las diméricas, por lo que se propone que estas interacciones hidrofóbicas podrían ser las que disparan la formación de los tetrámeros. Una vez que se ha producido el ensamblaje del tetrámero, aminoácidos muy específicos se involucrarían en el mantenimiento (estabilidad) de la estructura cuaternaria de las ALDHs, a través de la formación de puentes de hidrógeno o salinos interdímeros (46). A nosotros nos interesó estudiar la contribución a la estabilidad total del tetrámero de las interacciones que se dan entre monómeros de una misma unidad dimérica, usando como modelo la enzima de *P. aeruginosa* y seleccionando dos residuos que se localizan en la interfase monómero-monómero: I313 y C439. En el modelo tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa*, I313 está formando, junto con F279 y V275 de la misma subunidad, un hoyo hidrofóbico en donde encaja el último residuo de la otra subunidad, la F490 (Figura 11), haciendo una especie de broche que indudablemente contribuye a la estabilidad de la unidad dimérica. Esto es consistente con que todas las BADHs poseen en un residuo hidrofóbico (isoleucina, leucina o valina) en la posición equivalente a I313. En cuanto a C439, parece estar formando un puente de hidrógeno, o un puente salino si su grupo tiol está ionizado, con K477 de la otra subunidad.





**Figura 11.** Posición en el modelo tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa* de los residuos Ile313 y Cys439, en morado y rojo, respectivamente. El último residuo de cada subunidad, la Phe490, se presenta con bastones color verde, interactuando con la Ile313, Val275 (en blanco) y Phe279 (en rosa). La Cys439 parece formar un puente de hidrógeno con Lys477 (en azul celeste).

Los resultados de experimentos de inactivación térmica de las enzimas modificadas en estos residuos I313R y C439S señalan que estas interacciones son muy importantes para la estabilidad del tetrámero, pues muestran una sensible disminución (de aprox. 13 °C) en su  $T_m$  aparente con respecto a la de la enzima silvestre (Figura 12A). Otra indicación de su baja estabilidad es que las mutantes mencionadas tienen una mayor tendencia que la enzima silvestre a disociarse hasta monómeros cuando la concentración de iones monovalentes en el medio es baja (Figura 12B).



**Figura 12.** (A) Estabilidad térmica de las (■) BADHs silvestre y (♦) mutante I313R de *P. aeruginosa*, incubadas durante 60 min a las temperaturas que se indican. (B) Estado oligomérico de las proteínas antes señaladas, después de eliminar el  $K^+$  de su medio.

## Agradecimientos

Los trabajos de nuestro grupo aquí descritos se realizaron con la colaboración entusiasta y sumamente valiosa de numerosos estudiantes, coautores de los artículos citados. Fueron apoyados financieramente por DGAPA (IN210198, IN221001) y CONACYT (1713-N9209, 2552P-N9209 y 37820-N9209).

## Referencias

1. Valenzuela-Soto EM y Muñoz-Clares RA (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J Plant Physiol* 143: 145-152.
2. Guzmán-Partida AM y Valenzuela-Soto EM (1998). Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp Biochem Biophys part B* 119: 485-491.
3. Nagasawa T, Kawabata Y, Tani Y y Ogata K (1976). Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr Biol Chem* 40: 1743-1749.
4. Vojtechová M, Hanson AD y Muñoz-Clares RA (1997). Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD<sup>+</sup>-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch Biochem Biophys* 337: 81-88.
5. Johansson K, El-Ahmad M, Ramaswamy S, Hjelmqvist L, Jornvall H y Eklund H (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Prot Sci* 7: 2106-2117.
6. Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Mendoza-Hernández G y Muñoz-Clares RA (1999). Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181: 1292-1300.
7. Falkenberg P y Stroem AR (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1034: 253-259.
8. Valenzuela-Soto E M y Muñoz-Clares RA (1993). Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J Biol Chem* 268: 23818-23824. Additions and Corrections (1994) 268: 4692
9. Figueroa-Soto CG y Valenzuela-Soto EM (2000). Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 596-603.
10. Velasco-García R, González-Segura L y Muñoz-Clares RA (2000). Steady-state kinetic mechanism of NADP<sup>+</sup>- and NAD<sup>+</sup>-dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 352: 675-683.
11. Cleland WW (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim Biophys Acta* 67: 104-137.
12. Galinski EA y Truper HG (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15: 95-108.
13. Rhodes D y Hanson AD (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 44: 357-384.
14. Grunewald RW y Eckstein A (1985). Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney Int* 48: 1714-1720.
15. Pollard A y Wyn Jones RG (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* 144: 291-298.
16. Lippert K y Galinski EA (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 61-65.
17. Niculescu MD y Zeisel SH (2002). Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 132: 2333S-2335S.
18. Steenge GR, Verhoef P y Katan MB (2003). Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 133: 1291-1295.
19. Mangiagalli A, Samuele A, Armentero MT, Bazzini E, Nappi G y Blandini F (2004). Effects of homocysteine on apoptosis-related proteins and anti-oxidant systems in isolated human lymphocytes. *Eur J Biochem* 271: 1671-1676.
20. Kikonyogo A y Pietruszko R (1997). Cimetidine and other H<sub>2</sub>-receptor antagonists as inhibitors of human E3 aldehyde dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 52: 267-271.

21. Farres J, Wang TTY, Cunningham SJ y Weiner H (1995). Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34: 2592-2598.
22. Marchal S, Cobessi D, Rahuel-Clermont S, Tête-Favier F, Aubry A y Branlant, G. (2001). Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Chem Biol Interact* 130-132: 15-28
23. Duester G (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function-Production of visual pigment and retinoic acid *Eur J Biochem* 267: 4315-4324
24. Lindahl R (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 283-335.
25. Perroud B y Le Rudulier D (1985). Glycine betaine transport in of *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J Bacteriol* 161: 393-401.
26. Weigel D, Lerma C y Hanson AD (1988). Choline oxidation by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 86: 54-60.
27. Bals R, Weiner DJ y Wilson JM (1999). The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103: 303-307.
28. González-Segura L, Velasco-García R y Muñoz-Clares RA (2002). Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 361: 577-585.
29. Hancock RE (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27: S93-S99.
30. Kitson T (1977). The disulfiram-ethanol reaction. A review. *J Stud Alcohol* 202: 96-113.
31. Sage AE, Vasil AI y Vasil ML (1997). Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 23: 43-56.
32. Kurys G, Ambroziak W y Pietruszco R (1989). Human aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 264: 4715-4721.
33. Velasco-García R, Chacón-Aguilar VM, Hervet-Hernández D y Muñoz-Clares RA (2003). Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram. *Chem Biol Interact* 143-144: 149-158.
34. Legarí J, Rajsbaum R, Muñoz-Clares RA, Villegas-Sepúlveda N, Simpson J e Iturriaga G (1998). Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* 218: 69-76.
35. Smith LT, Pocard JA, Bernard T y Le Rudulier D (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 170: 3142-3149.
36. Cornish-Bowden A (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. (2a edn.), Portland Press, London.
37. Vojtechova M, Rodríguez-Sotres R, Valenzuela-Soto EM y Muñoz-Clares RA (1997). Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim Biophys Acta* 1341: 49-57.
38. Muñoz-Clares RA, González-Segura L, Mújica-Jiménez C y Contreras-Díaz L (2003). Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. *Chem Biol Int* 143-144: 129-137.
39. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GKS, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S y Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
40. Velasco-García, R. González-Segura L, Villalobos MA, Iturriaga G y Muñoz-Clares RA (2004). Cloning, over-expression, chemical modification and site-directed mutagenesis of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Enviado a J Bacteriol*.
41. Rzhetsky A, Ayala FJ, Hsu LC, Chang C y Yoshida A (1997). Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase supports the "introns-late" theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6820-6825.
42. González-Segura L, Velasco-García R, Rudiño-Piñera E, Mújica-Jiménez C y Muñoz-Clares RA (2004). Insights into the stability of the tetrameric betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* revealed by site-directed mutagenesis of non-essential cysteine residues. *Enviado a Biochem J*.
43. Valenzuela-Soto EM, Velasco-García R, Mújica-Jiménez C y Muñoz-Clares RA (2003). Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, amaranth leaves and porcine kidney. *Chem Biol Interact* 143-144: 139-148.

44. Kurys G, Ambroziak W y Pietruszco R (1989). Human aldehyde dehydrogenase. J Biol Chem 264: 4715-4721.
45. Boch J, Nau-Wagner G, Kneip S y Bremer E (1997). Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. Arch Microbiol 168: 282-289.
46. Rodríguez-Zavala JS y Weiner H (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. Biochemistry 41: 8229-8237.

## GENIO Y FIGURA DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

### Resumen

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible dependiente de  $\text{NAD(P)}^+$  de la betaína aldehído. En una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta animales, esta reacción es el paso final de la biosíntesis de glicina betaína, un eficiente osmoprotector, pero en aquellas bacterias que son capaces de crecer en colina como única fuente de carbono y nitrógeno, es un paso intermedio en el catabolismo de este compuesto. Para entender cómo las propiedades funcionales y/o estructurales de esta enzima se modifican y adaptan para integrarse a diferentes contextos metabólicos, hemos abordado el estudio de dos de ellas: las presentes en las hojas de la planta *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto) y en la bacteria patógena oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. La primera es un ejemplo de las BADHs anabólicas involucradas en la respuesta al estrés osmótico, y la segunda de las anfibólicas, ya que cuando la bacteria crece en colina o precursores de colina, compuestos que son muy abundantes en los tejidos humanos que infecta, proporciona equivalentes de reducción para el catabolismo, NADH, y el anabolismo, NADPH. En este artículo describimos sus diferentes propiedades y mecanismos cinéticos, su semejante mecanismo químico, su regulación a largo y corto plazo, y sus semejanzas y diferencias estructurales y de estabilidad. Además, puesto que la BADH puede ser un enzima clave en el establecimiento y crecimiento del patógeno, y por tanto un posible blanco de agentes antimicrobianos, describimos brevemente los estudios que estamos realizando con inhibidores irreversibles de esta enzima.

**Palabras clave:** betaina aldehído deshidrogenasa; *Pseudomonas aeruginosa*; amaranto; cinética; regulación; estructura.

## Semblanza de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares.



Nació en Granada, España, en cuya universidad realizó sus estudios de licenciatura y doctorado. Después de estancias posdoctorales en la Universidad de Kent, y Manchester, Inglaterra; se incorporó al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, en el que actualmente es Profesor Titular C de Tiempo Completo. Ha realizado estancias de investigación en la Universidad Autónoma de Madrid y en la Universidad de Vanderbilt, en Nashville, EUA. Su quehacer científico, que versa sobre la caracterización cinética y molecular de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas, así como el estudio de la relación estructura función de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa se ha publicado en 39 artículos científicos internacionales y 8 nacionales. En la Universidad Nacional Autónoma de México ha impartido 46 cursos de licenciatura y posgrado; además, en su laboratorio se han graduado 11 alumnos de licenciatura y 13 de posgrado. La comunidad científica la ha invitado a impartir 13 conferencias en diferentes congresos nacionales e internacionales. Dentro de la Universidad se ha desempeñado como Coordinadora de la Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Química; Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química; Miembro de la Comisión Dictaminadora y Comités de Evaluación de diferentes Centros e Institutos de Investigación. La Dra. Muñoz ha recibido diversos premios y reconocimientos, entre los que destacan el Premio Extraordinario en la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad de Granada, España; Accésit al Premio Nacional de Licenciatura en Ciencias Biológicas, España; Reconocimiento Catedrático de la UNAM; Miembro Regular de la Academia Mexicana de Ciencias y del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.



---

Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

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

(ISSN-0188-137X)

---

## SUSTRATO NEURAL DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS<sup>1</sup>

Hugo Aréchiga

División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México.  
Unidad de Posgrado. 1 er. piso. Ciudad Universitaria.  
México DF 04510, México

### NEURAL SUBSTRATE FOR BIOLOGICAL RHYTHMS

#### Abstract.

Introduction and method. *The various bodily functions vary rhythmically along the 24-hour cycle. These circadian rhythms, display common properties and are generated by common cellular and molecular mechanisms. The basic rhythm is endogenously produced in cellular pacemakers in various regions; the most conspicuous are located in the central nervous system. They are composed by cells endowed with the molecular substrate necessary to generate rhythmicity, and to send the circadian time signal to the effectors of the overt rhythms. The rhythmicity in the pacemaker cells is generated by specific genes integrated in a negative feedback double loop. The structure of the genes responsible for the rhythmicity is phylogenetically well preserved. The circadian pacemakers are in turn synchronized by environmental stimuli, being light the best characterized, but other external agents, such as food and some homeostatic factors and products of metabolic activity are also effective. These synchronizing signals are conveyed to the pacemakers via specific receptors and pathways. The role of some neurotransmitters in the synchronizing action has been demonstrated.*

Conclusion. *The functional integrity of this complex biochronometrical system is necessary for the maintenance of health. Its alteration results in specific ailments, and enhances the vulnerability to certain diseases. [REV NEUROL 2003; 36: 49-60]*

**Keywords.** Biological clocks. Biological rhythms. Chronobiology. Circadian rhythms.

---

<sup>1</sup> Artículo reproducido con permiso de Viguera Editores S.L., Revista de Neurología (2003) 36: 49-60. (<http://www.revneurolog.com/>).

## Introducción

Durante el último medio siglo, ha cobrado vigencia la noción de que todas las funciones corporales, en la diversidad de los seres vivos, varían de manera rítmica en fase con los ciclos de rotación de la Tierra y de su traslación alrededor del Sol. En los seres humanos, esta ritmicidad es necesaria para el mantenimiento de la salud. Su alteración se traduce en trastornos y molestias, y en una mayor vulnerabilidad a diversos padecimientos [1-4], vulnerabilidad que es reversible al corregir la alteración cronobiológica [5].

Si bien todas las funciones corporales varían rítmicamente, los valores mínimo y máximo se alcanzan a distintas horas del ciclo nictameral. Ahora bien, guardan entre sí relaciones constantes de fase, lo cual sugiere la operación de un sistema cronobiológico finamente integrado, dotado de poderosos mecanismos de sincronización interna [6]. Estos ritmos biológicos de periodicidad diurna o estacional persisten incluso en condiciones ambientales constantes, lo cual indica la existencia de dispositivos fisiológicos capaces de generar la ritmicidad: de ahí el concepto de 'relojes biológicos' [7]. Desde luego, en condiciones normales, los ritmos circadianos están sincronizados por las variaciones geofísicas.

Luego de amplias y variadas observaciones en distintas funciones y especies biológicas, se ha comprobado que todos los ritmos presentan una fenomenología común, con propiedades también comunes, entre las que destacan las siguientes:

1. Sus períodos son cercanos a 24 horas en condiciones ambientales constantes. Al suprimirse la influencia sincronizante del medio ambiental, la ritmicidad persiste, pero con un período que ya no es exactamente 24 horas. De ahí proviene la denominación de circadianos, propuesta por Franz Halberg [8], para denotar los ritmos ligados al ciclo diurno. Los de naturaleza estacional se denominan circanuales.
2. Los ritmos circadianos se amortiguan en condiciones ambientales constantes. La tasa de amortiguación varía con cada ritmo y durante estos lapsos transitorios se da el fenómeno de 'desincronización interna'; los ritmos quedan desfasados entre sí en un organismo dado, lo cual produce trastornos que pueden afectar negativamente a la salud, como ya se mencionó. La amortiguación en condiciones constantes sugiere también la necesidad de que la ritmicidad sea normalmente sincronizada por los ciclos ambientales.
3. La magnitud y el signo del efecto sincronizador de los factores ambientales sobre los ritmos biológicos dependen de la fase del ciclo endógeno en la que se apliquen los estímulos sincronizantes; es decir, que un mismo estímulo exterior puede producir adelantos o retrasos en la fase de un ritmo, o bien no afectarla, según el momento del ciclo en el que se le aplique. La magnitud misma de estos efectos también varía según la fase del ritmo en la que incida el estímulo. Esto genera la 'relación fase-respuesta', que es una propiedad fundamental de cada ritmo, que establece los límites de su sincronizabilidad [9]. Así, se ha determinado que no es posible inducir ritmos circadianos de período menor de 20 horas o mayor de 30. Por otra parte, aun en condiciones ambientales constantes, la duración del período circadiano depende de la naturaleza del ambiente y del sujeto en estudio, ya que, en animales de hábitos diurnos, la iluminación constante produce acortamientos del período circadiano, mientras que la oscuridad constante produce alargamientos; incluso bajo iluminación constante, la duración del período circadiano disminuye en proporción a la intensidad de la iluminación. En especies

- nocturnas, la relación es la inversa. Estas relaciones se conocen como ‘Reglas de Aschoff’, en honor de Jürgen Aschoff, quien las describió [10].
4. La duración del período circadiano es independiente de la temperatura ambiental; es decir, su Q10 es igual a 1,0. Esta propiedad, puesta de relieve por Colin Pittendrigh y sus colaboradores [11], revela la existencia de poderosos mecanismos homeostáticos que mantienen constante la periodicidad ante amplias variaciones de la temperatura, que tenderían a acelerar o retrasar el mecanismo de biocronometría, alterando su precisión. Ésta es una propiedad indispensable en cualquier dispositivo cronométrico e implica, en el caso de los relojes biológicos, basados en reacciones bioquímicas con cinética dependiente de la temperatura, la existencia de mecanismos compensatorios que, en ocasiones, llegan a excederse y producen valores de Q10 inferiores a 1,0.
  5. Los ritmos circadianos son heredables. Esta propiedad fue identificada inicialmente en poblaciones de moscas del género *Drosophila*, en las que se demostró que, tras muchas generaciones, en las que los especímenes habían sido mantenidos en oscuridad constante y la ritmicidad se había amortiguado, la exposición a un pulso breve de luz restablecía la ritmicidad. Esto sugería que la capacidad de generar ritmos había persistido y se había transmitido entre generaciones sucesivas [12]. Este fenómeno se ha confirmado con persistencia hasta por 600 generaciones [13].

Ulteriormente, Ron Konopka, en el laboratorio de Seymour Benzer, logró identificar mutantes de *Drosophila* carentes de ritmicidad circadiana, o bien dotadas de períodos menores o mayores que el normal de la especie. El cruzamiento de estos especímenes demostró que la ritmicidad se transmitía de forma dominante [14]. Más recientemente, se han encontrado mutaciones en la periodicidad circadiana en otras especies, incluyendo al ser humano. Así se ha avanzado en la caracterización, que revisaremos luego, del sustrato genómico de la ritmicidad.

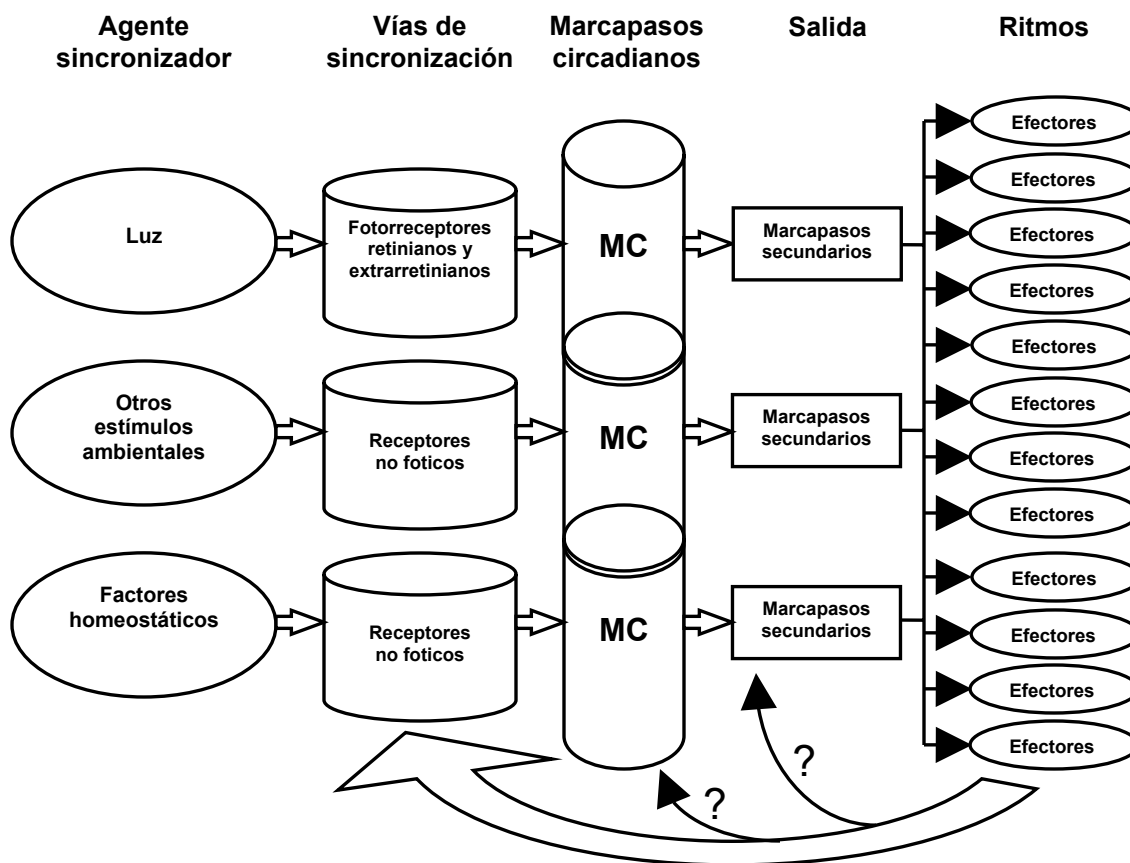
### Organización funcional del sistema biocronométrico

La identidad en las propiedades fenomenológicas de los ritmos circadianos ha llevado a postular la existencia de un sistema biocronométrico formado por tres componentes básicos [15,16] (Figura 1):

1. Un sistema generador de la ritmicidad constituido por marca-pasos circadianos, acoplados entre sí y capaces de generar una señal de tiempo con periodicidad cercana a las 24 horas.
2. Un sistema de sincronización por estímulos externos, compuesto por los receptores y vías sensoriales que transmiten a los marcapasos circadianos la información sincronizante sobre los ciclos ambientales.
3. Un sistema de sincronización interna, entre los marcapasos circadianos y los efectores que expresan la ritmicidad.

Como se expresa en la figura, no todos los marcapasos muestran la misma independencia para generar la ritmicidad y algunos parecen requerir la sincronización procedente de otros más robustos, y de ahí su distinción como secundarios. Por su parte, los órganos efectores de la ritmicidad pueden influir sobre las estructuras marcapasos y sobre las vías de sincronización. A continuación revisaremos los aspectos más sobresalientes de estos tres niveles de integración, que, en buena parte, tienen su asiento en el sistema nervioso central.





**Figura 1.** Representación esquemática de los niveles de integración funcional del sistema biocronométrico. Como puede advertirse, normalmente los marcapasos circadianos (MC), aunque capaces de generar la señal rítmica de tiempo, son sincronizados por agentes externos o factores homeostáticos, y envían su información a otros elementos del sistema: marcapasos secundarios (pueden generar la señal de tiempo, pero requieren de la sincronización de los marcapasos centrales) y a los efectores de la ritmicidad, cuya actividad puede, a su vez, modificar la entrada de las vías de sincronización y, aunque existe menor sustento experimental –de ahí los interrogantes– también puede actuar sobre los propios marcapasos. Modificado de [16].

### **Caracterización de marcapasos circadianos**

#### **Lesiones selectivas de estructuras cerebrales**

Los primeros intentos exitosos de localizar marcapasos circadianos se iniciaron hace casi cuatro décadas y, al igual que para otras estructuras de gobierno de las funciones fisiológicas, se realizaron mediante lesiones selectivas en el sistema nervioso. Se encontró así que la destrucción o ablación del pedúnculo óptico en insectos, [17] y en crustáceos [18], o de la glándula pineal en gorriones [19], suprimían el ritmo locomotor; igualmente, la del núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) lo hace en mamíferos [20]. Si bien resultó claro de estos experimentos que hay estructuras especializadas como marcapasos circadianos, también fue evidente que ninguna de ellas suprime todos los ritmos circadianos de las distintas funciones

fisiológicas; así, por ejemplo, el ritmo de temperatura corporal y el de anticipación al alimento [21-24] persisten en ausencia del núcleo supraquiasmático. Por ello, es poco probable la existencia de un 'reloj maestro' para todos los ritmos. Más bien habrá que buscar la integración de una multiplicidad de marcapasos, como veremos más adelante. Por otra parte, de acuerdo al esquema de la figura 1, la ablación sola es insuficiente como prueba de que la estructura suprimida es un marcapasos circadiano, ya que podría tratarse de una parte de la vía de salida. Por ello, se han añadido otros criterios complementarios.

### ***Restitución de ritmos por implantación de órganos***

Este criterio ha sido ya satisfecho por algunos de los candidatos mencionados anteriormente, como el pedúnculo óptico de invertebrados [25], la glándula pineal de aves [19] y el núcleo supraquiasmático de mamíferos [26], cuya reimplantación restituye los ritmos suprimidos al lesionar o extirpar dichas estructuras. Además, en algunos casos se ha logrado rescatar no sólo la ritmicidad, sino la fase misma de un ritmo dado [25], o bien, el período. Por ejemplo, en mutantes arrítmicas de *Drosophila*, se ha generado un ritmo que nunca existió mediante la implantación del pedúnculo de animales con período corto [27,28]; en mutantes de hámster dorado con períodos circadianos cortos se recuperó la ritmicidad, pero con período corto, mediante la implantación del NSQ de mutantes con ese fenotipo; correlativa-mente, los animales mutantes y lesionados, implantados con el NSQ de animales normales, adquirieron la ritmicidad con período normal [29].

### ***Generación, por parte del marcapasos circadiano en aislamiento, de la ritmicidad con características similares a las desplegadas en el organismo íntegro***

Este criterio ha sido satisfecho por el ojo aislado de los moluscos *Aplysia* [30] y *Bulla* [31] –generador de un ritmo de actividad eléctrica–, diversas estructuras de insectos [32, 33], la glándula pineal [34] y la retina de aves, peces [35] y mamíferos [36] –produce ritmos de regulación de pH y secreta melatonina– y para el pedúnculo ocular y la retina de los crustáceos – genera un ritmo de actividad eléctrica y neurosecretora– [37-39]; pero el órgano más estudiado a este respecto es el NSQ del hipotálamo de los mamíferos, que produce ritmos de actividad eléctrica y metabólica y de secreción de neurotransmisores [40-45]. Empero, también se ha descrito ritmicidad circadiana en otros órganos aislados, e incluso en explantes celulares de diversas estirpes, como veremos con posterioridad. Con estos experimentos, se ha logrado demostrar algo singular en neurobiología, y es que un programa completo, el generador de un ritmo circadiano, pueda ser integrado en una red neuronal identificada, mantenido *in vitro* y transportado de un individuo a otro. Pero estos experimentos sólo muestran la existencia de marcapasos circadianos, no cómo se produce en ellos esa función: A continuación, revisaremos los mecanismos celulares y moleculares propuestos como sustrato de la generación de ritmos biológicos.

### ***Generación de la ritmicidad circadiana***

Inicialmente se plantearon dos posibilidades, que la ritmicidad se genere como una propiedad emergente, a partir de marcapasos con períodos más cortos que el circadiano, es

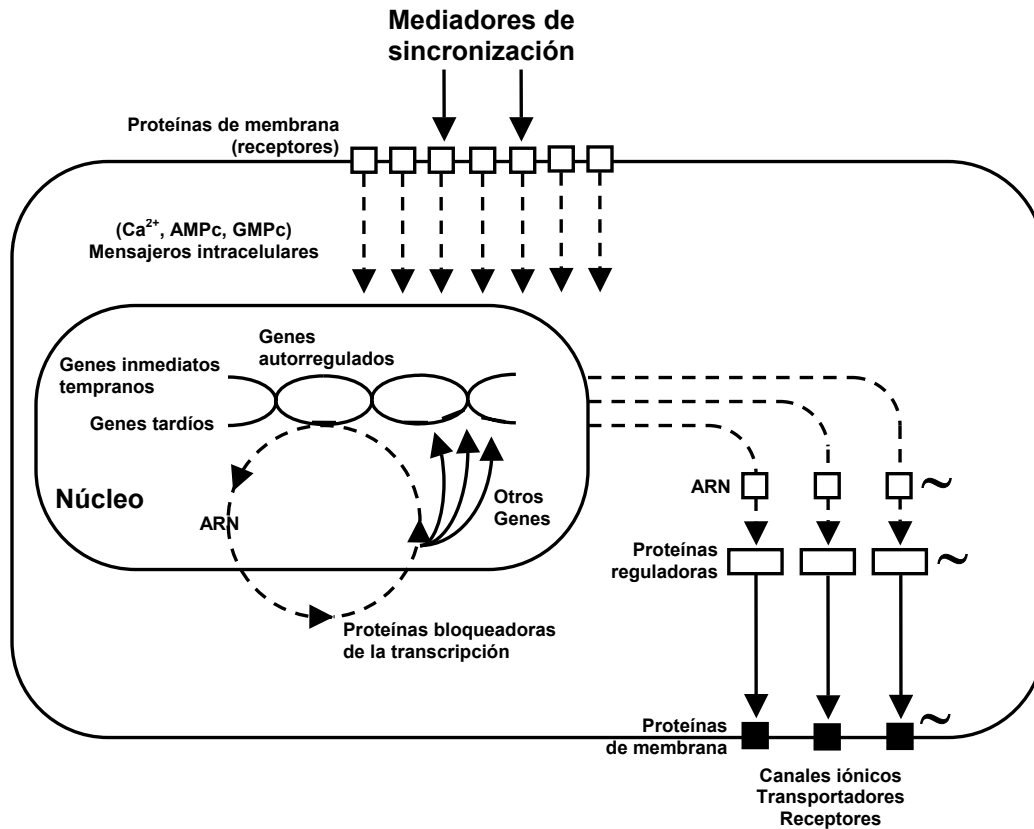
decir, mediante la síntesis de frecuencias de osciladores ultradianos [46], o bien que se genere mediante marcapasos celulares independientes, cada uno con frecuencia circadiana, y acoplados entre sí. Una forma de dilucidar el problema fue el análisis de la conectividad neuronal en las estructuras marcapasos y de la actividad circadiana en células aisladas, mediante el cual se encontró que ésta se asienta aun en células individuales; tal ha sido el caso en todos los órganos que han sido caracterizados como marcapasos circadianos; sin excepción, se ha identificado en ellos periodicidad circadiana a nivel celular. Además, se ha documentado la ritmicidad en células aisladas de estos órganos, por ejemplo, en pinealocitos en cultivo, que mantienen un ritmo circadiano de secreción de melatonina [34], así como en células aisladas del ojo de *Bulla* [47] y en neuronas del NSQ [48], que mantienen ritmos de actividad eléctrica y secreción de neurotransmisores [49-51]. Además, la implantación de neuronas aisladas de NSQ puede inducir ritmicidad en ratas arrítmicas por lesión del propio NSQ [52], y se ha demostrado que pueden generar diferentes fases del ritmo [53]. Por otra parte, también se han documentado variaciones circadianas en células aisladas de diversas estirpes histológicas incluyendo el hígado [54,56] y el corazón [55,56], e incluso fibroblastos [57]. La significación de estos resultados para nuestra comprensión de la organización funcional del sistema circadiano se discutirá más adelante.

También se ha logrado establecer la existencia de conexiones entre las neuronas de los marcapasos circadianos; así, se ha documentado el acoplamiento eléctrico entre células del ojo de molusco [47], del pedúnculo ocular de crustáceos [58] y del núcleo supraquiasmático [59,60]. La arquitectura neuronal de los órganos que actúan como marcapasos difiere de modo importante de unos a otros; la uniformidad parece ser la regla en el ojo de molusco [31] y en la glándula pineal [61], mientras que en el pedúnculo ocular del crustáceo [62] y en el núcleo supraquiasmático hay gran diversidad de elementos y de conexiones [26, 40, 63-65]. En este órgano, además, se han descrito también posibles vías neuro humorales mediante sustancias difusibles aún no identificadas [66,67]. Un rasgo interesante es que en los órganos que actúan como marcapasos, en un momento dado, los diversos elementos celulares pueden encontrarse en distintas fases del ritmo circadiano, como ha sido demostrado en el núcleo supraquiasmático [53,68] y en el pedúnculo ocular [69]. Este hecho sugiere que, desde su origen, la generación de fases se asienta en diferentes marcapasos celulares. Desde luego, aún falta mucho por estudiar sobre la integración de la señal circadiana en los órganos con función marcapaso, particularmente en órganos complejos, como el núcleo supraquiasmático o los marcapasos circadianos de artrópodos, donde hay gran diversidad neuronal y aún no está claro qué elementos son los que generan la ritmicidad y cómo la transmiten a los vecinos.

### ***Mecanismos celulares y moleculares generadores de la ritmicidad***

La existencia de un ritmo circadiano de la frecuencia de descarga de potenciales de acción en las neuronas permite suponer que hay canales iónicos, transportadores y otras proteínas de membrana, cuya actividad varía de forma circadiana (Figura 2). De hecho, se han documentado cambios diurnos en el potencial de membrana y la resistencia eléctrica de membrana en células de órganos marcapasos [70-73], así como en conductancias específicas a sodio [74] y potasio [75]; también en un canal catiónico [76] y en una corriente de calcio. Esta última, tanto en el núcleo supraquiasmático [77-79] como en el ojo aislado de *Bulla* [47], parece ser el mecanismo eficiente para la generación de una corriente marcapaso que produce oscilaciones de potencial de membrana cuya frecuencia varía según la hora del día. A su vez,

estas oscilaciones dan lugar a la producción de potenciales de acción. Es necesario suponer que el sustrato electrofisiológico de la ritmicidad debe residir en una modulación de larga duración, capaz de mantenerse por varias horas. Además, se sabe que la ritmicidad persiste en el núcleo supraquiasmático aun después de eliminar la descarga de potenciales de acción por incubación del tejido en tetrodotoxina [80].



**Figura 2.** Representación esquemática de las etapas y agentes efectivos en la generación y la sincronización de la ritmicidad circadiana. El mecanismo molecular generador es una red de retroalimentación negativa, en la que los productos de algunos genes (ver texto) inhiben la transcripción de éstos. Sobre estos genes actúan influencias sincronizadoras mediadas por mensajeros intracelulares y genes, tanto inmediatos tempranos, como tardíos. De los genes que producen la ritmicidad se originan proteínas reguladoras que influyen sobre otros genes y, a través de éstos, dan origen a más proteínas que transmiten la señal rítmica a macromoléculas efectoras, algunas de ellas situadas en la membrana de la célula, que originan la ritmicidad fisiológica.

Como veremos más adelante, se han descrito mutantes carentes, de manera concomitante, de la modulación de un canal de potasio activado por el calcio y del ritmo locomotor, pero se desconoce el papel funcional de esa corriente iónica. En suma, falta aún por aclarar cómo se realiza la modulación diurna de la descarga de potenciales de acción. Además, la observación de que hay neuronas en el núcleo supraquiasmático que invierten su respuesta a

un neurotransmisor, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), según la hora del día en que se aplique, ha llevado a suponer que un sustrato de la ritmicidad circadiana puede ser una bomba de iones cloro [81] cuya actividad intracelular varía a lo largo del ciclo nictameral en neuronas del núcleo supraquiasmático [82].

Queda aún mucho camino por recorrer en la caracterización del sustrato celular de la ritmicidad circadiana. Desde luego, en el caso de los ritmos de biosíntesis de sustancias como la melatonina y otras neurosecreciones, los mensajeros intracelulares estarían actuando sobre enzimas en la cascada biosintética; así, se ha documentado la ritmicidad circadiana en la actividad de la catecol-orto-metil-transferasa, enzima clave en la biosíntesis de melatonina, en la de la hidroxilasa de triptófano, activa en la biosíntesis de serotonina, y en las de algunos neuropéptidos [7, 26,83]. En los ritmos de secreción, intervendrían moléculas reguladoras del recambio de membrana, es decir, la producción y liberación de vesículas. De hecho, los rasgos ultraestructurales de las neuronas secretoras durante la fase activa son notoriamente distintos a los dominantes en la fase de reposo, y este tránsito está bajo control circadiano [84]. Algo similar puede afirmarse sobre los movimientos de partículas intracelulares. Desde luego, todas estas manifestaciones celulares de la ritmicidad circadiana son consecuencia de la generación del ritmo y expresiones del mismo, cuyo origen ha sido necesario rastrear hasta el genoma celular, como veremos a continuación. Aún es muy escaso el conocimiento sobre estos sistemas celulares eficientes en la generación de ritmos circadianos.

### ***Genes que cifran la información generadora de la ritmicidad***

Durante los últimos diez años, los avances más notorios en el estudio de los mecanismos generadores de la ritmicidad circadiana se han logrado en la caracterización de genes relacionados con esta función, así como de sus interacciones. Buena parte del trabajo se ha hecho en la mosca *Drosophila melanogaster*, pero el modelo ahí iniciado se ha ampliado a otras especies biológicas, incluyendo al ser humano. El primero de los genes caracterizados en la producción de la ritmicidad es el conocido como *per* (por periodicidad). Es un protooncogén que cifra la producción de una proteína de 1.200 aminoácidos. Fue inicialmente descubierto en *Drosophila*, de modo casi simultáneo en los laboratorios de Michael Young [85] y Michael Rosbash [86]. Su ausencia suprime la expresión de ritmos circadianos como el de eclosión y el locomotor. La cantidad de RNA mensajero varía en forma circa-diana, en fase con el ritmo del comportamiento del individuo; es decir, en un mutante de período corto, el ritmo de RNAm es también corto, y la duración del período circadiano es inversamente proporcional al número de copias de *per* [87]; además, es sincronizable por la luz [88-93]. Su transfección en mutantes arrítmicos restituye la ritmicidad [85], lo cual también constituye un caso singular en neurobiología, que es la transferencia completa de un programa conductual por inserción de un gen. Inicialmente se localizó la expresión de *per* en células específicamente relacionadas con la generación de la ritmicidad; es decir, en aquellos órganos que, según los criterios mencionados anteriormente, contienen marcapasos circadianos. Tal fue el caso del cerebro de *Drosophila* [94,95] y otros insectos [96-98], el ojo de *Aplysia* y *Bulla* [99] y la retina y el pedúnculo ocular de crustáceo [39]; sin embargo, más recientemente se le ha identificado y se ha demostrado su ritmicidad en otros órganos de *Drosophila* y de otros organismos, incluyendo a los mamíferos [33,100].



233

Por otra parte, la inserción de la proteína Per bloquea la expresión del gen *per*, lo que ha llevado a proponer como mecanismo básico generador de la ritmicidad a un circuito de retroalimentación negativo, con una red de duración cercana a las 24 horas [101]. Luego se identificó, también en *Drosophila*, otro gen llamado *tim* (del inglés, *timeless* –carente de tiempo–), cuya proteína forma un dímero con Per y facilita la entrada de esta proteína al núcleo celular y, por tanto, su función como factor negativo de transcripción (Figura 3) [102-104]. Luego, se han identificado, tanto en insectos como en mamíferos, otros genes que contribuyen a regular con gran finura la red fundamental de retroalimentación. Una técnica que ha resultado de gran utilidad para identificar genes comprometidos con la ritmicidad es el acoplamiento a ‘genes reporteros’ que expresan proteínas fluorescentes, como la luciferasa [105]. A la vez, se han empleado diversas modalidades de análisis de actividad génica basadas en microarreglos de ADN [106] y otros procedimientos que, como veremos enseguida, han llevado a caracterizar con cierta precisión el sustrato molecular de la ritmicidad circadiana. Es digna de destacar la notable conservación filogenética, tanto en la estructura como en la función, de los genes que participan en la producción de ritmos. Veamos a continuación, de manera sucinta, cómo se viene explicando el mecanismo genómico en los insectos y en los mamíferos, que son los grupos zoológicos en los que mejor se ha estudiado el fenómeno.

Después del descubrimiento de *per* y *tim*, se ha caracterizado en años recientes un complejo conglomerado de genes, cuyas proteínas promueven o reprimen la expresión de *per*, tal como se sintetiza brevemente a continuación. Como se aprecia en la figura 3A, el elemento genómico central es una caja E, con estructura CACGTG, homóloga a la del gen *single minded*, de la misma especie, cuya proteína (SIM) es semejante a la proteína ARNT del mamífero (translocador nuclear aril-carbohidrato) [107-109]. Tanto en *SIM* como en *ARNT*, este dominio PAS (*PER-ARNT-SIM*) está acompañado de otro dominio con una región básica *bHLH*, que es una superficie de heterodimerización receptora de ADN. Las proteínas *bHLH* suelen funcionar como pares heterodiméricos y Per actúa como represor de la transcripción del par *bHLH-PAS*. La caja E es, entonces, un sitio *bHLH* que une proteínas con capacidad regulatoria y es el elemento sobre el que se asienta el ciclado transcripcional. Otros dos genes del sistema son *dClock* (*dclk*) (Circadian locomotor output cycle kaput) [110,111] y *cycle* (*cyc*) [112], que cifran proteínas que contienen tanto los dominios *bHLH*, con capacidad de unión a ADN, como PAS. Estas dos proteínas también se heterodimerizan y se unen directamente a los elementos de la caja E, propios de los promotores *per* y *tim*, y activan su expresión. Esta activación es inhibida luego por Per y Tim, con lo que se cierra la red [113]. En la inhibición, resultan hiperfosforiladas las proteínas Clock, bMal1 y mPer. Pero la red es todavía más compleja, y se han identificado otros tres componentes: *doubletime* (*dbt*) [114], *shaggy* (*sgg*) [115] y *vriille* (*vri*) [116], que cifran quinasas que se asocian con *per* y el complejo Per-Tim, y contribuyen a fosforilarlo y, con ello, hacerlo inestable y acelerar su degradación [117].

### **Genes en los insectos**

En este proceso interviene la acción de proteosomas [118]. Así, en el caso de *Drosophila*, durante el día, cuando Per se sintetiza en el cito-plasma, forma un complejo estable con DBT y Tim; entran al núcleo, al comienzo de la noche, y reprimen la transcripción de *per* y *tim*, con lo cual se reduce la síntesis del complejo Per-Tim-Dbt. Concomitantemente a la formación del complejo, Dbt pro-mueve la fosforilación de Per, lo que causa su inactivación, y

con ello se reactiva la expresión de *per* y *tim*. Por su parte, Sgg promueve la fosforilación de Tim. Finalmente, *Vri*, un factor de transcripción del *zipper* básico de leucina, cicla en la misma fase que Per y Tim y se le atribuye una función represora de *per* y *tim*. En *Drosophila*, *Cuc* no cicla; en cambio, dCLK sí lo hace, casi en antifase con Per y Tim; así, Per promueve la transcripción de *dclk* y da lugar a una segunda red [27]. Como ya se mencionó, otro gen importante en este modelo, es *cry* [88-93] (por cifrar una proteína parecida a los criptocromos de plantas), que es sensible a la luz, e influye sobre la fosforilación de Per y Tim acelerando su degradación. Participa, así, en la sincronización del ritmo circadiano. Así pues, se trata de dos redes con elementos, tanto represores como activadores, que le confieren gran capacidad de regulación al sistema.

### Genes en los mamíferos

El primer modelo experimental para el estudio del sustrato genómico de la ritmicidad en mamíferos fue el mutante *tau*, un hámster dorado de período circadiano locomotor de corta duración [119,120], descubierto en el laboratorio de Michael Menaker. Se han identificado los genes *per* (tres de ellos), *clock*, *bmal* y *1/MP03* [121-124] (Figura 3B), que son los ortólogos de *dClk* y *Cyc*, respectivamente. Clock, Bmal y 1/MP03 se dimerizan, se unen a la caja E (que tiene una delección en la superficie de transactivación) reducen la expresión de *mper* y alargan el período circadiano, mientras que la pérdida de *bmal* 1/MP03 suprime *mper* y elimina el ritmo circadiano.

La mutación de cualquiera de los ortólogos de *per*, como son *mper* 1 y *mper* 2, altera el ritmo, mientras que la doble mutación lo suprime; mPer 2 activa la transcripción de *bmal* 1 y, al contrario que en el insecto, Bmal 1 cicla en el ratón, mientras que Clock no lo hace. Así, Per regula positivamente la producción rítmica de los complejos Clock/Bmal 1 tanto en moscas como en ratones, aunque con distintos sustratos. Se ha demostrado que los productos de *per* reprimen débilmente la transcripción de *mper* 1, dependiente de Clock/Bmal 1, en células de mamífero en cultivo. Así, tanto en insectos como en mamíferos, Per, o el complejo Per/Tim en *Drosophila*, regulan negativamente su propia transcripción, mientras que regulan positivamente la transcripción del complejo dCLK/ Cyc [100, 124, 125]. La degradación de las proteínas reguladoras de la expresión de los genes del sistema circadiano se acelera por fosforilación, en la que intervienen algunas quinasas [126,127].

En mamíferos, las deficiencias de *mcry* 1, o *mcry* 2, que, como vimos, también están presentes en insectos, alteran la duración del período circadiano, y los dobles mutantes son arrítmicos en oscuridad continua [128]. En forma parecida a la acción de Tim en insectos, Mcry inhibe la transactivación de Clock/MDP 3 y los dobles mutantes acumulan Mper 2. Ello sugiere que Cry reprime la expresión de Mper; así, en el mamífero, *cry* parece haber tomado la función que tiene *tim* en el insecto; en cambio, no es foto-sensible [129].

Se han descrito ritmos circadianos incluso en proteínas cuyos RNAm no ciclan, lo cual sugiere alguna forma de control post-traducciona [130], aunado a un posible mecanismo post-transcripcional, como se ha descrito en insectos [131]. De particular interés resulta la búsqueda de proteínas reguladoras que transmitan la señal circadiana a las proteínas de membrana, sean canales, transportadores o receptores. Es poco lo que se sabe a este respecto, aun cuando ya vimos que se ha identificado un modulador intracelular de canales de potasio activados por



calcio, que podría participar en la inducción de la ritmicidad de actividad eléctrica; de hecho, los mutantes carentes de esta proteína no muestran ritmo circadiano locomotor [132]. En humanos, ya se han caracterizado genes similares en relación con la ritmicidad circadiana cuya alteración da lugar a trastornos en la fábrica temporal del organismo [133,134]. En suma, resulta sorprendente la homología genómica de las estructuras generadoras de la ritmicidad circadiana a lo largo de la filogenia [27, 100, 135-138].

### **Mecanismos de sincronización externa**

El estudio de los receptores y las vías neurales que transfieren a los marcapasos circadianos la información sobre las variaciones ambientales ha llevado a identificar estructuras previamente desconocidas; por ejemplo, la luz, el agente sincronizador más poderoso, es detectado en todas las especies estudiadas por fotorreceptores que no son los mismos que participan en la visión. Este fenómeno se ha caracterizado en insectos [139], aunque fue demostrado inicialmente en aves [140], en reptiles [141], en batracios [142] y en crustáceos [143], en los que los fotorreceptores se encuentran fuera del ojo, en distintos lugares del sistema nervioso central y aun en algunos órganos periféricos [144], y los fotopigmentos que participan en la transducción tienen una estructura química distinta a la rodopsina.

En los mamíferos, si bien estos fotorreceptores están en la retina, no son los conos ni los bastones, sino células ganglionares [145-147], que contienen una melanopsina, de estructura distinta a la rodopsina [148,149]. Todo esto parece estar relacionado con el requerimiento funcional de que los fotorreceptores que inicien la señal sincronizante sean capaces de detectar intensidades muy elevadas de luz, que saturarían a los receptores visuales. Así, las mismas células ganglionares que proyectan al núcleo supraquiasmático parecen ser también las iniciadoras del reflejo fotomor de la pupila, desencadenado por altas intensidades de luz.

También se han identificado vías neurales específicas de los fotorreceptores hacia los marcapasos circadianos. En los mamíferos, el haz retinohipotalámico transmite la información de la retina al NSQ [150,151]. La destrucción de este haz suprime la sincronización por la luz y los animales se mantienen como si estuvieran en oscuridad continua [152]. Los axones del haz retinohipotalámico proyectan a la región ventral del NSQ [150,153], cuya arquitectura neuronal es muy compleja, pues se reconoce una gran diversidad de tipos celulares y de conexiones sinápticas [64,65]; sin embargo, la proyección de los axones retinianos a las neuronas en las que se ha detectado ritmicidad circadiana en el NSQ parece ser monosináptica. El neurotransmisor parece ser el glutamato; de hecho, se ha reconocido su presencia en las terminales de los axones retinianos [154,155] y se ha demostrado su liberación en el NSQ, así como la de otros aminoácidos excitatorios [156]. La aplicación de glutamato modifica la actividad eléctrica de las neuronas en el NSQ [157,158], así como su actividad metabólica [159] y, algo muy importante, también modifica el ángulo de fase del ritmo circadiano en el NSQ; los bloqueadores de la transmisión glutamatérgica suprimen la sincronización por luz por neurotransmisores o por otros transmisores [160-164]. Desde luego, se ha logrado sincronizar la ritmicidad circadiana mediante glutamato y sus análogos. Se ha caracterizado la participación tanto de receptores AMPA como kainato y NMDA [159-167]. También se ha demostrado la colocalización de glutamato y neuropéptidos en los axones retino-hipotalámicos y no se descarta la participación de otros neurotransmisores en esta vía de sincronización fótica [156].

Además de los axones procedentes de la retina, el NSQ recibe fibras serotoninérgicas del rafe medial y axones de la hojuela intergenicular. Cada una de estas entradas tiene una proyección específica en regiones definidas del NSQ. Pero, además, éste recibe fibras de otras zonas del SNC, tales como el área preóptica medial, la zona subparaventricular, el tálamo paraventricular, los núcleos paraventricular, ventromedial y arcuato del hipotálamo, el núcleo septal lateral, la sustancia innominada, el subículo ventral, el área pretectal, la sustancia gris central, el núcleo pedúnculo pontino, el núcleo parabraquial, la zona *incerta*, la corteza infralímbica, el órgano subfornical, el núcleo hipotalámico dorsomedial y otros núcleos centrales [168-170].

Por otra parte, la luz no es el único agente sincronizador, pero aún no están suficientemente caracterizadas ni las vías ni, como ya revisamos, los propios marcapasos circadianos que responden a esas entradas. Sin embargo, sí se sabe que el NSQ recibe y envía fibras a la hojuela del núcleo geniculado lateral y forma un sistema intercomunicado éste y con la glándula pineal [171,172]; además, recibe entradas de tipo humoral, ya que se han encontrado receptores a hormonas esteroideas y a algunos neuropéptidos.

Además del glutamato, se ha demostrado la participación, como mediadores de la sincronización, de algunas sustancias presentes en el NSQ; entre ellas, la mejor estudiada es el GABA, que, por estudios inmunocitoquímicos, parece encontrarse en la población más numerosa de neuronas en el NSQ [173]. Es liberado por estimulación del nervio óptico [174] y su aplicación, así como la de sus agonistas y antagonistas, actuando sobre receptores A, B y benzodiazepínicos, sincroniza la ritmicidad [175-182] con efectos opuestos a los del glutamato. La aplicación de GABA modifica la actividad eléctrica en neuronas del NSQ [183], sobre todo con acción inhibitoria, aunque también se han descrito respuestas bifásicas [81]. La cantidad de GABA en el núcleo varía en forma circadiana [184-186]. Además, también parece colocarse con neuropéptidos [187]. También la 5-hidroxitriptamina (5-HT) actúa como mediador en el NSQ y su aplicación o la alteración de sus niveles modifican la fase de la ritmicidad circadiana [188-193]. Su presencia ha sido demostrada en fibras aferentes al NSQ [194] y se ha postulado su efecto regulador de la ritmicidad [195-197] actuando directamente sobre la actividad eléctrica de neuronas en esa región [196,198]. Es interesante que la 5HT también haya sido postulada como moduladora de la ritmicidad en moluscos [31].

Aunque menos estudiados, también se ha documentado la presencia y participación en la regulación de la ritmicidad circadiana en el NSQ de la acetilcolina [199-201], el monóxido de nitrógeno (NO) [161,202], la dopamina [203], la melatonina –que también participa en procesos de sincronización interna– [171,204-209] y varios neuropéptidos, tales como la angiotensina II [210], el péptido intestinal vasoactivo [211,212], el péptido activador de la adenilatociclasa hipofisaria (PACAP) [213], y otros neuropéptidos presentes en el NSQ, pero cuya función aún no está del todo clara [214-218]. Desde luego, aún no puede considerarse agotada la identificación de posibles neurotransmisores que medien la sincronización externa del sistema circadiano.

La acción de los neurotransmisores que medien la información sobre la luz o, para el caso, la de otros agentes sincronizantes, es, a su vez, transmitida a las células del NSQ mediante la activación de segundos mensajeros [219], como el AMP cíclico [220-222], y el GMP cíclico [223], que actúan en la sincronización de la ritmicidad; se ha caracterizado la participación de la vía transcripcional CREB/CRE [224] en la sincronización del ritmo circadiano en el NSQ; se ha documentado la facilitación de la transcripción de algunos genes por cambios en la

concentración intracelular de calcio [225]; también se ha descrito que la activación de receptores NMDA en el NSQ activa a *mper1* [226]. Ello, aunado a la demostración de la ritmicidad circadiana en los niveles intracelulares de calcio [77-79], sugiere un papel para este ion en la vía de expresión del reloj a los genes secundarios. También se ha descrito la participación de genes inmediatos tempranos –se ha caracterizado ya la activación de *cfos*, y *jun*– [160, 227-231] y algunos genes tardíos, como *vgf* [232], que, si bien se activan como res-puesta a la aplicación de luz, no ciclan espontáneamente.

Además de la luz, se ha caracterizado la influencia sincronizante sobre los ritmos circadianos de otros factores ambientales, como el sonido y otros agentes [233], la temperatura [234] y agentes homeostáticos, particularmente relacionados con los alimentos [235-238]. De hecho, la sincronización por los alimentos llega a ser más poderosa que la inducida por la luz y, como ya revisamos, puede ejercerse en ausencia del núcleo supraquiasmático [21, 23] y está sujeta a influencias moduladoras de tipo hormonal [239-242] o mediadas por sustancias difusibles locales. Hasta ahora, la información sobre la vía de sincronización se reduce a la mediada por la luz, y se ignora la correspondiente a otras influencias, tanto ambientales como homeostáticas.

### Mecanismos de sincronización interna

La señal de tiempo generada en los marcapasos circadianos debe ser capaz de sincronizar a las estructuras que manifiestan la ritmicidad, de tal manera que los diversos ritmos circadianos, según ya revisamos, se mantengan en fase. Este es el significado original del concepto de sincronización interna, pero también cabe la posibilidad de que haya diversas estructuras dotadas de la propiedad endógena de producir señales de tiempo circadianas, que también deben comunicarse y sincronizarse recíprocamente.

Aún no hay información suficiente sobre cuáles son estas estructuras ni cuáles las vías neurales o humorales que las comunican. En el mamífero, la vía de salida del NSQ es muy profusa, y se han identificado axones emergentes que llegan a estructuras tan variadas como la zona subparaventricular, el hipotálamo posterior y las regiones preópticas, los núcleos septal lateral, paratenial, paraventricular y, sobre todo, el ventral lateral (hojuela intergenicular) del tálamo. Algunas fibras de esas estructuras proyectan a las regiones homólogas del hemisferio contralateral y tienen proyecciones indirectas hasta la médula espinal [243] y la glándula pineal [61, 172, 244-249]. Mediante inmunocitoquímica, se han identificado varios posibles moduladores de la acción del NSQ, tales como el neuropéptido Y, que parece ser la principal salida de las neuronas que actúan como marcapasos [250-255], aunque también se ha identificado en éstas la liberación rítmica de vasopresina [51, 256]. Además, se conoce la presencia en los axones eferentes del NSQ de péptido intestinal vasoactivo [257], factor liberador de corticotropina, bombesina, substancia P, neurotensina, somatostatina, hormona liberadora de tirotrópina y angiotensina II [215-218]. Como ya revisamos, se ha logrado identificar ritmicidad endógena en órganos y aun en células aisladas, por ejemplo en la retina [35,36], el hígado [54, 56, 236], el corazón, el riñón, el pulmón y otros órganos [32, 35, 258, 259] así como en células de estirpe muscular y conectiva [57], según revisamos anteriormente; pero aún se debate si esa ritmicidad endógena es generada por un 'reloj maestro', que a su vez envía su señal a marcapasos secundarios, sincronizables pero carentes de la posibilidad de generar endógenamente el ritmo circadiano, o si se trata de una constelación de marcapasos dotados de

la propiedad endógena de producir ritmos circadianos, y comunicados entre sí mediante diversos mecanismos. Se han postulado modelos en defensa de uno u otro esquema de organización [33, 100, 260]. Ya hemos visto que algunos agentes humorales son capaces de sincronizar la ritmicidad. Por otra parte, se han identificado orexinas, aparentemente secretadas en el propio NSQ [261], que transmiten la señal circadiana generada en este órgano. Recientemente se ha propuesto la participación de la procinetina 2, en la vía de expresión de la señal circadiana del NSQ. Se trata de una proteína de 81 aminoácidos, secretada en forma circadiana en el NSQ que, sin afectar la fase del ritmo en el propio núcleo, influye sobre la actividad de efectores de la ritmicidad [262]. Algo similar se ha postulado para el factor transformador de crecimiento [263]. Desde luego, aún habrá que esperar la identificación de más agentes químicos mediadores de señales circadianas desde los marcapasos, ya sean destinadas a órganos efectores de la ritmicidad, o a otros marcapasos.

En resumen, si bien se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que generan y sincronizan la ritmicidad circadiana en el organismo, es mucho aún lo que falta por estudiar para lograr una comprensión cabal del sistema biocronométrico.

## Referencias

1. Toitou Y, Haus E, eds. Biological rhythms in clinical and laboratory medicine. Berlin: Springer Verlag; 1992. p. 730.
2. Lemmer B, Ed. From the biological clock to chronopharmacology. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1996. p. 206.
3. Portela A, Martín E, Aréchiga H, Cornelissen G, Sutherland D, Illera JC, et al. Cronobiología en medicina y cirugía. Gac Med Mex 1996; 132: 409-23.
4. Aréchiga H. Los ritmos biológicos en la salud y en la enfermedad. Gac Med Mex 2002; 138: 42-7.
5. Arendt J. Treatment of circadian rhythm disorders-melatonin. Chronobiol Int 1997; 14: 185-204.
6. Pittendrigh CS. Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. In Schmitt FO, ed. The neuro-sciences. Third study program. Cambridge, Mass: MIT Press; 1974. p. 437-58.
7. Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. The clocks that time us. Cambridge, Mass: Harvard University Press; 1982. p. 488.
8. Halberg F. Chronobiology. Ann Rev Physiol 1969; 31: 675-725.
9. Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. Proc Natl Acad Sci USA 1967; 58: 1762-7.
10. Hoffman K. Overt circadian frequencies and circadian rule. In Aschoff J, ed. Circadian clocks. Amsterdam: North Holland Publishing Co; 1965.
11. Bruce VG, Pittendrigh CS. Temperature independence in a unicellular 'clock'. Proc Natl Acad Sci USA 1956; 42: 676-82.
12. Bunning E. The physiological clock. 2 ed. New York: Springer-Verlag; 1967.
13. Sheeba V, Sharma VK, Chandrashekar MI, Joshi A. Persistence of eclosion rhythm in *Drosophila melanogaster* after 600 generations in an aperiodic environment. Naturwissenschaften 1999; 86: 448-9.
14. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68: 2112-6.
15. Aréchiga H. Circadian rhythms. Curr Opin Neurobiol 1993; 3: 1005-10.
16. Aréchiga H. Neuronal mechanisms of biological rhythms. In Pastor MA, Artieda J, eds. Time, internal clocks, and movement. Amsterdam: Elsevier; 1996. p. 95-114.
17. Nishitsutsuji Uwo J, Petropoulos SF, Pittendrigh CS. Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. I. Role of the pars intercerebralis. Biol Bull 1968; 133: 679-96.

18. Aréchiga H, Naylor E. Endogenous factors in the control of rhythmicity in decapod crustaceans. In De Coursey PJ, ed. Biological rhythms on the marine environment. Columbia, SC: University of South Carolina Press; 1976. p. 1-16.
19. Zimmerman NH, Menaker M. Neural connections of sparrow pineal: Role in circadian control activity. *Science* 1975; 190: 477-99.
20. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42: 201-6.
21. Krieger DT, Hauser H, Krey LC. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 1977; 197: 398-9.
22. Satinoff E, Prosser RA. Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of body temperature, in male rats. *J Biol Rhythms* 1988; 3: 1-22.
23. Stephan FK, Swann JM, Sisk CL. Anticipation of 24 h feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav Neurol Biol* 1979; 25: 346-63.
24. Wachulek M, Li H, Tanaka H, Peloso E, Satinoff E. Suprachiasmatic nuclei lesions do not eliminate homeostatic thermoregulatory responses in rats. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 226-34.
25. Truman J. Circadian rhythmicity in an insect brain. In Schmitt FO, ed. The neurosciences. 3rd study program. Cambridge, Mass: MIT Press; 1974. p. 525-9.
26. Klein DC, Moore RY, Reppert SM. Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. New York: Oxford University Press; 1991. p. 16-188.
27. Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 2002; 417: 329-35.
28. Handler AM, Konopka RJ. Transplantation of a circadian pacemaker in *Drosophila*. *Nature* 1979; 279: 236-8.
29. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 1990; 247: 975-8.
30. Jacklett JW. Circadian rhythm in the isolated eye of *Aplysia*. *Science* 1968; 164: 562-4.
31. Block GD, Khalsa SBS, McMahon DG, Michel S, Geusz M. Biological clocks in the retina: Cellular mechanisms of biological timekeeping. *Int Rev Cytol* 1993; 146: 83-143.
32. Giebultowicz JM, Hege DM. Circadian clock in malpighian tubules. *Nature* 1997; 386: 664
33. Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 1997; 278: 1632-5.
34. Deguchi T. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature* 1979; 282: 94-6
35. Dinitriev AV, Mangel SC. A circadian clock regulates the pH of the fish retina. *J Physiol (Lond)* 2000; 522: 77-82.
36. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996; 272: 419-21.
37. Sánchez JA, Fuentes-Pardo B. Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp Biochem Physiol* 1977; 56A: 601-6.
38. Aréchiga H, Rodríguez-Sosa L. Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. *J Mar Biol Ass UK* 1997; 77: 17-29.
39. Aréchiga H, Rodríguez Sosa L. Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc Roy Soc (Lond)* 1998; 265: 1819-23.
40. Ueyama T, Krout KE, Nguyen XV, Karpitskiy V, Kollert A, Mettenleiter TC, et al. Suprachiasmatic nucleus: A central autonomic clock. *Nat Neurosci* 1999; 12: 1051-3.
41. van Esseveldt LE, Lehman MN, Boer GJ. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Rev* 2000; 33: 34-77.
42. Earnest DJ, Sladek CD. Circadian rhythms of vasopressin release from individual rat suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Research* 1986; 382: 129-33.
43. Gillette MU, Reppert SM. The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res Bull* 1987; 19: 135-9.
44. Glass JD, Hauser UE, Blank JL, Selim M, Rea MA. Differential timing of amino acid and 5-HiAA rhythms in the suprachiasmatic hypothalamus. *Am J Physiol* 1993; 265: R504-11.
45. Inouye SIT, Kawamura G. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic «island» containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5962-6.
46. Dowse HB, Ringo JM. Do ultradian oscillators underlie the circadian clock in *Drosophila*? In Lloyd D, Rossi E, eds. Ultradian rhythms in life processes. Berlin: Springer Verlag; 1992. p. 105-17.
47. Michel S, Geusz ME, Zaritsky JJ, Block GD. Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* 1993; 259: 239-41.
48. Earnest DJ, Liang, FQ, Ratcliff M, Cassone V. Immortal time: Circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science* 1999; 283: 693-5.

49. Green DJ, Gillette R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 1982; 245: 198-200.
50. Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M, Honma K. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci Lett* 1999; 250: 157-60.
51. Murakami N. Long-term cultured neurons from rat SCN retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res* 1991; 545: 347-50.
52. Silver R, Lehman MN, Gibson M, Gladstone WR, Bittman EL. Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Res* 1990; 525: 45-58.
53. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; 14: 697-706.
54. Hardeland R. Circadian rhythmicity of tyrosine: 2-oxoglutarate-ami-notransferase activity in suspensions of liver cells. The transition from a non oscillatory to an oscillatory state induced by light-dark changes. *J Interdisc Cycle Res* 1973; 4: 307-11.
55. Sakamoto K, Ishida N. Light-induced phase shifts in the circadian expression rhythm of mammalian period genes in the mouse heart. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 4003-6.
56. Storch KF, Lipan O, Lefkin Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 2002; 417: 78-83.
57. Grundschober C, Delaunay F, Puhlhofer A, Triqueneaux G, Laudet V, Bartfai T, et al. Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276: 46751-8.
58. Alvarado-Álvarez R, García U, Aréchiga H. Electrotonic coupling between neurosecretory cells in the crayfish eyestalk. *Brain Res* 1993; 613: 43-8.
59. Michel S, Colwell CS. Cellular communication and coupling within the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int* 2001; 18: 579-600.
60. Shinohara K, Hiruma H, Funabashi R, Kimura F. GABAergic modulation of gap junction communication in slice cultures of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 2000; 96: 591-6.
61. Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 1996; 73: 125-30.
62. García U, Aréchiga H. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 81-99.
63. Roig JA, Granados-Fuentes D, Aguilar-Roblero R. Neuronal subpopulations in the suprachiasmatic nuclei based on their response to retinal and intergeniculate leaflet stimulation. *Neuroreport* 1997; 8: 885-9.
64. Leak RK, Moore RY. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 2001; 433: 312-34.
65. Pennartz CMA, Geurtse AMS, De Jeu MTG, Sluiter AA, Hermes MHLJ. Electrophysiological and morphological heterogeneity of neurons in slices of rat suprachiasmatic. *J Physiol (Lond)* 1998; 506: 775-93.
66. Allen G, Rappe J, Earnest DJ, Cassone VM. Oscillating on borrowed time: Diffusible signals from immortalized suprachiasmatic nucleus cells regulate circadian rhythmicity in cultured fibroblasts. *J Neurosci* 2001; 21: 7937-43.
67. Silver R, Le Sauter J, Tresco PA, Lehman MN. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 1996; 382: 810-3.
68. Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H, Honma K. Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7396-400.
69. Uribe I, Rodríguez-Sosa L, Aréchiga H. Diurnal patterns of electrical activity in crayfish neurosecretory cells. *Biol Rhythms Res* 1998; 29: 453-63.
70. De Jeu MTG, Hermes MHLJ, Pennartz CMA. Circadian modulation of membrane properties in slices of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 1998; 9: 3725-9.
71. Jiang ZG, Yang YQ, Liu ZP, Allen CP. Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J Physiol* 1997; 499: 141-59.
72. McMahon DG, Block GD. The Bulla ocular circadian pacemaker. II. Chronic changes in membrane potential lengthen free running period. *J Comp Physiol* 1987; 161: 347-54.
73. Tasker JG, Dudek FE. Electrophysiological properties of neurons in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus. *J Physiol* 1991; 434: 271-93.
74. Pennartz CMA, Bierlaagh MA, Geurtsen AMS. Cellular mechanisms underlying spontaneous firing in rat suprachiasmatic nucleus: involvement of a slowly inactivating component of sodium current. *J Neurophysiol* 1997; 78: 1811-25.

75. De Jeu MTG, Pennartz CMA. Functional characterization of the H-current (IH) in SCN neurons in subjective day and night: a whole-cell patch-clamp study in acutely prepared brain slices. *Brain Res* 1997; 767: 72-80.
76. D'Souza T, Dryer SE. A cationic channel regulated by a vertebrate intrinsic circadian oscillator. *Nature* 1996; 382: 165-7.
77. Colwell CS. Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 571: 6.
78. Murphy TH, Worley PF, Baraban JM. L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 1991; 7: 625-35.
79. Pennartz CMA, de Jeu MTG, Bos NPA, Schaap J, Geurtsen AMS. Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* 2002; 416: 286-90.
80. Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT. The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1987; 84: 1694-8.
81. Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 1997; 387: 598-603.
82. Shimura M, Akaike N, Harata N. Circadian rhythm in intracellular Cl-activity of acutely dissociated neurons of suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: c366-73.
83. Barassin S, Raison S, Saboureau M, Bienvenu C, Maitre M, Malan A, et al. Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 833-40.
84. Preciado M, Tsutsumi V, Aréchiga H. Ultrastructural features of neurosecretory cells in the medulla externa of the crayfish eyestalk. *Gen Comp Endocrinol* 1994; 95: 432-42.
85. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 1984; 312: 752-4.
86. Reddy P, Zehring WA, Wheller DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster*, and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 1984; 38: 701-10.
87. Baylies MK, Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Changes in abundance or structure of the *Per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature* 1987; 326: 390-2.
88. Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, et al. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTO-CHROME. *Science* 1999; 285: 553-6.
89. Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 1998; 95: 669-79.
90. Emery P, Stanewsky R, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* cryptochromes: A unique circadian rhythm photoreceptor. *Nature* 2000; 404: 456-7.
91. Hunter-Ensor M, Ousley A, Sehgal A. Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 1996; 84: 677-85.
92. Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 1996; 271: 1736-40.
93. Stanewsky R., Kaneko M, Emory P, Beretta B, Wager-Smith K, et al. The *cry b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 1998; 95: 681-92.
94. Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC. Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J Neurosci* 1992; 12: 3321-49.
95. Vosshall LB, Young MW. Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron* 1995; 15: 345-60.
96. Sauman I, Reppert SM. Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of Period protein regulation. *Neuron* 1996; 17: 889-900.
97. Regier JC, Fang QQ, Mitter C, Peigler RS, Friedlander TP, Solis MA. Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. *Mol Biol Evol* 1998; 15: 1172-82.
98. Reppert SM, Tsai T, Roca AL, Sauman I. Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 1994; 13: 1167-76.
99. Siwicki KK, Strack S, Rosbash M, May JC, Jacklet JW. An antibody to the *Drosophila* period protein recognizes circadian pacemaker neurons in *Aplysia* and *Bulla*. *Neuron* 1989; 3: 51-8.
100. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418: 935-41.
101. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 1990; 343: 536-40.

102. Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioural rhythms and *Per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 1994; 263: 1603-6.
103. Vosshal LB, Price JL, Sehgal A, Saez L, Young MW. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation *timeless*. *Science* 1994; 263: 1606-9.
104. Sehgal A, Rotherfluh-Hilficker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers MA, Young MW. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science* 1995; 270: 808-10.
105. Brandes C, Plautz JD, Stanewsky R, Jamison CF, Straume M, Wood KV, et al. Novel features of *Drosophila period* transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* 1996; 16: 687-92.
106. McDonald MJ, Rosbash M. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* 2001; 107: 567-78.
107. Crews ST, Thomas JB, Goodman CS. The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *Per* gene product. *Cell* 1988; 52: 143-51.
108. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991; 252: 954-8.
109. Huang ZJ, Edery I, Rosbach M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila period* and several transcription factors. *Nature* 1993; 364: 259-62.
110. Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TDL, et al. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 1998; 280: 1599-603.
111. Bae K, Lee C, Sidote D, Chuang KY, Edery I. Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian *Clock* gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6142-51.
112. Rutla JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbach M, Hall JC. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell* 1998; 93: 805-14.
113. Glossop NR, Lyons LC, Hardin PE. Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 1999; 286: 766-8.
114. Price JL et al. *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 1998; 94: 83-95.
115. Martinek S, Inonog S, Monoukian AS, Young MW. A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 2001; 105: 769-79.
116. Blau J, Young MW. Cycling *vriille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 1999; 99: 661-71.
117. Kloss B, Rothenfluh A, Young MW, Saez L. Phosphorylation of PERIOD is influenced by cycling physical associations of DOUBLE-TIME, PERIOD, and TIMELESS in the *Drosophila* clock. *Neuron* 2001; 30: 699-706.
118. Naidoo N, Seng W, Hunter-Ensor M, Sehgal A. A role for the proteasome in the light response of the *timeless* clock protein. *Science* 1999; 285: 1737-41.
119. Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 1988; 241: 1225-7.
120. Lowrey PL, Shinomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science* 2000; 288: 483-92.
121. Bae K, Jin XW, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 2001; 30: 525-36.
122. Bunger MK et al. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000; 103: 1009-17.
123. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin XW et al. MCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 1999; 98: 193-205.
124. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wibacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280: 1564-9.
125. Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, et al. Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer 2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 2001; 105: 683-94.
126. Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM. Nuclear entry of the circadian regulator *mPER1* is controlled by mammalian casein kinase . . *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4888-99.
127. Keesler GA, Camacho F, GuoY, Virshup D, Mondadori C, Yao ZB. Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase . . *NeuroReport* 2000;11: 951-5.



128. Van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, et al. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999; 398: 627-30.
129. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109: 307-20.
130. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Post-translational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 2001; 107: 855-67.
131. Venus SW, Rosback M. Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *EMBO J* 1997; 16: 7146-55.
132. Ceriani MF, Hogenesh JB, Yanovsky M, Panda S, Straume M, Kay SA, et al. Genome-wide expression analysis reveals genes controlling circadian behavior. *J. Neurosci* 2002; 22: 9305-19.
133. Bunney WE, Bunney BG. Molecular clock genes in man and lower animals: Possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22: 335-45.
134. Toh KL et al. An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 2001; 291: 1040-3.
135. Hurst WJ, Earnest D, Gillette, MV. Immortalized suprachiasmatic nucleus cells express components of multiple circadian regulatory path-ways. *Biochem Biophys Res Comm* 2002; 292: 20-30.
136. Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*. 1997; 91: 855-60.
137. Siwicki KK, Schwartz WJ, Hall JC. An antibody to the *Drosophila* period protein labels antigens in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J. Neurogenet* 1992; 8: 33-42.
138. Zhuang M, Wang Y, Steinhard BM, Besharse JC. Differential regulation of two period genes in the *Xenopus* eye. *Mol Brain Res* 2000; 82: 52-64.
139. Zimmerman WF, Goldsmith TH. Photosensitivity of the circadian rhythm and of visual receptors in carotenoid-depleted *Drosophila*. *Science* 1971; 171: 1167-9.
140. Menaker M. Extraretinal light reception in the sparrow. I. Entrainment of the biological clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59: 414-20.
141. Adler K. Extraoptic phase shifting of circadian locomotor rhythm in salamanders. *Science* 1969; 164: 1290-2.
142. Cahill GM, Besharse JC. Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 1991; 11: 2959-71.
143. Page TL, Larimer J. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J Comp Physiol* 1972; 78: 107-16.
144. Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 2000; 404: 87-91.
145. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295: 1070-3.
146. Lucas RJ et al. Identifying the photoreceptive inputs to the mammalian circadian system using transgenic and retinally degenerate mice. *Behav Brain Res* 2001; 125: 97-102.
147. Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Anatomy: Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* 2002; 415: 93.
148. Gooley JJ, Lu J, Ghou TC, Scammell TE, Saper, CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature Neurosci* 2001; 4: 1165.
149. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yav KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295: 1065-70.
150. Johnson RF, Morin LP, Moore RY. Retino-hypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 1988; 462: 301-12.
151. Moore RY. Entrainment pathways and functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res* 1996; 111: 103-19.
152. Johnson RF, Moore RY, Morin LP. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retino-hypothalamic tract. *Brain Res* 1988; 460: 297-313.
153. Card JP, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience* 1984; 13: 415-31.
154. Castel M, Belenki M, Cohen S, Ottersen DP, Storm-Mathisen J, et al. Glutamate-like, immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 368-81.
155. Gannon RL, Rea MA. Glutamate receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1993; 622: 337-42.
156. Kalsbeek A, Buijs RM. Rhythms of inhibitory and excitatory output from the circadian timing system as revealed by in vivo microdialysis. In Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA,

- Mirmiran M, Eds. Hypothalamic integration of circadian rhythms: Progress in brain research, Vol. III. Amsterdam: Elsevier; 1996.
157. Bos NPA, Mirmiran M. Effects of excitatory amino acids on neuronal discharges in the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 1993; 31: 67-72.
  158. Meijer TH, Albus H, Weidema F, Ravesloot JH. The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Res* 1993; 603: 284-8.
  159. Shibata S, Tominaga K, Hamada T, Watanabe S. Excitatory effect of N-methyl-D-aspartate and kainate receptor on the 2-deoxyglucose up-take in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 1992; 139: 83-6.
  160. Abe H, Rusak B, Robertston HA. NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of Fos protein in the hamster supra-chiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 1992; 28: 831-5.
  161. Amir S. Blocking NMDA receptors or nitric oxide production disrupts light transmission to the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1992; 586: 336-9.
  162. Colwell CS, Foster RG, Menaker M. NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Res* 1991; 554: 105-10.
  163. Colwell CS, Menaker M. NMDA as well as non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. *J Biol Rhythms* 1992; 7: 125-36.
  164. Vindlacheruvu RR, Ebling FJP, Maywood ES, Hastings MH. Blockade of glutamatergic neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus pre-vents cellular and behavioral responses of the circadian system to light. *Eur J Neurosci* 1992; 4: 673-9.
  165. Prosser RA. Glutamate blocks serotonergic phase advances of the mammalian circadian pacemaker through AMPA and NMDA receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 7815-22.
  166. Hartgraves MD, Fuchs JL. NMDA receptor binding in rodent suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1994; 640: 113-8.
  167. Mikkelsen JD, Larsen PJ, Ebling FJP. Distribution of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1993; 632: 329-33.
  168. Harrington ME, Rusak B. Lesions of the thalamic intergeniculate leaf-let alters hamster circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 1986; 1: 309-25.
  169. Janik D, Mrosovsky N. Intergeniculate leaflet lesions and behaviourally induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res* 1994; 651: 174-82.
  170. Johnson R, Moore RY, Morin LP. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythm in the hamster. *Brain Res Bull* 1989; 22: 411-22.
  171. Rusak B, Yu GD. Regulation of melatonin-sensitivity and firing-rate rhythms of hamster suprachiasmatic nucleus neurons: pinealectomy effects. *Brain Res* 1993; 602: 200-4.
  172. Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 1999; 406: 171-82.
  173. Moore RY, Speh JC. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 1993; 150: 112-6.
  174. Liou SY, Shibata S, Iwasaki K, Ueki S. Optic nerve stimulation-induced increase of release of [ 3 H] GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res* 1986; 16: 527-31.
  175. Meyer EL, Harrington ME, Rahmani T. A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and the effect of geniculo-hypothalamic tract ablation. *Physiol Behav* 1993; 53: 237-43.
  176. Liu CH, Reppert SM. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 2000; 25: 123-8.
  177. Mintz E, Jasnow AM, Gillespie CF, Huhman KL, Abers HE. GABA interacts with photic signaling in the suprachiasmatic nucleus to regulate circadian phase. *Neuroscience* 2002; 109: 773-8.
  178. Ralph MR, Menaker M. Bicuculline blocks circadian phase delays but not advances. *Neurochem Int* 1987; 11: 55-62.
  179. Ralph MR, Menaker M. GABA regulation of circadian responses to light. I. Involvement of GABAA-benzodiazepine and GABAB receptors. *J Neurosci* 1989; 9: 2858-65.
  180. Smith RD, Inouye SIT, Turek FW. Central administration of muscimol phase-shifts the mammalian circadian clock. *J Comp Physiol* 1989; 164: 805-14.
  181. Smith RD, Turek FW, Traverse Slater N. Bicuculline and picrotoxin block phase advances induced by GABA agonists in the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster by a phaclofen-insensitive mechanism. *Brain Res* 1990; 530: 275-82.

182. Turek FW, Losee-Olson S. A benzodiazepine used in the treatment of insomnia phase-shifts the mammalian circadian clock. *Nature* 1986; 321: 167-8.
183. Van den Pol AN. Glutamate and GABA presence and action in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 1993; 8: 511-5.
184. Cardinali DP, Golombek DA. The rhythmic GABAergic system. *Neurochem Res* 1998; 23: 607-4.
185. Jalliffa CO, Saenz D, Resnik E, Sarmiento MIK, Rosenstein RE. Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Res* 2001; 912: 195-202.
186. Felino Ramon A, Cagampang CA, Rattray M, Powell JF, Campbell IC, Coen CW et al. Circadian changes of glutamate decarboxylase GS and G7 mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuro Report* 1996; 7: 1925-8.
187. Buijs RM, Wortel J, Hou YX. Colocalization of  $\gamma$ -aminobutyric acid with vasopressin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 1995; 358: 343-52.
188. Edgar DM, Miller JD, Prosser RA, Dean RR, Dement WC. Serotonin and the mammalian circadian system. II. Phase-shifting rat behavioural rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms* 1993; 8: 17-31.
189. Penev PD, Turek FW, Zee PC. Monoamine depletion alters the entrainment and the response to light of the circadian activity rhythm in hamsters. *Brain Res* 1993; 612: 156-64.
190. Prosser RA, Dean RR, Edgar DM, Heller HC, Miller JD. Serotonin and the mammalian system. I. In vitro phase shifts by serotonergic and antagonists. *J Biol Rhythms* 1993; 8: 1-16.
191. Prosser RA, Heller HC, Miller JD. Serotonergic phase shifts of the mammalian circadian clock: Effects of tetrodotoxin and high magnesium. *Brain Res* 1992; 573: 336-40.
192. Rea MA, Glass JD, Colwell CS. Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 1994; 14: 3635-42.
193. Shibata S, Tsuneyoshi A, Hamada TKT, Watanabe S. Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin 1A receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res* 1992; 582: 353-6.
194. Meyer-Bernstein EL, Morin LP. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* 1996; 16: 2097-111.
195. Mason R. Circadian variation in sensitivity of suprachiasmatic and lateral geniculate neurones to 5-hydroxytryptamine in the rat. *J Physiol (London)* 1986; 377: 1-13.
196. Medanic M, Gillette MU. Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J. Physiol (London)* 1992; 450: 629-42.
197. Morin LP, Michels KM, Smale L, Moore RY. Serotonin regulation of circadian rhythmicity. *Ann NY Acad Sci* 1990; 600: 418-26.
198. Ying SW, Rusak B. Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1994; 651: 37-46.
199. Bina KG, Rusak B, Semba K. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurol* 1993; 335: 295-307.
200. Colwell CS, Kaufman CM, Menaker M. Phase-shifting mechanisms in the mammalian circadian system: New light on the carbachol paradox. *J Neurosci* 1993; 13: 1454-9.
201. Keefe DL, Earnest DJ, Nelson D, Takahashi JS, Turek FW. A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster. *Brain Res* 1987; 403: 308-12.
202. Caseis D, Hurst WJ, Ding JM, Faiman LE, Mayer B, Gillette M. Localization and characterization of nitric oxide synthase in the rat. *J Neurochem* 1997; 68: 855-861.
203. Rivkees SA, Lachowicz JE. Functional D1 and D5 dopamine receptors are expressed in the suprachiasmatic, supraoptic, and paraventricular nuclei of primates. *Synapse* 1997; 26: 1-10.
204. Ying SE, Zhang DX, Rusak B. Effects of serotonin agonists and melatonin on photic responses of hamster intergeniculate leaflet neurons. *Brain Res* 1993; 628: 8-16.
205. Cassone VM, Roberts MH, Moore RY. Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-14C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol* 1988; 255: R332-7.
206. McArthur AJ, Gillette MV, Prosser RA. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res* 1991; 565: 158-61.
207. Neu JM, Niles LP. A marked diurnal rhythm of melatonin ML1A receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res* 1997; 49: 303-6.
208. Weaver DR, Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *NeuroReport* 1996; 8: 109-12.

209. Margraff RR, Lynch GR. Melatonin injections affect circadian behaviour and SCN neurophysiology in source. *Am J Physiol* 1993; 264: R615-21.
210. Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fuyuka H, Rohman MS, Raharjo SB et al. Angiotensin II Induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2001; 104: 1746-8.
211. Card JP, Brecha N, Karten HJ, Moore RY. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J. Neurosci* 1981; 1: 1289-303.
212. Okamoto S, Okamura H, Miyake M, Takahashi Y, Takagi S, Akagi Y, et al. A diurnal variation of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the rat suprachiasmatic nucleus. *Histochemistry* 1991; 95: 525-8.
213. Hannibal J, Ding JM, ChonD, Fahrenkrug J, Larson Ph, Gillette M, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: A potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 1997; 17: 2637-44.
214. Kalsbeek A, Buijs RM. Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. In Joosse J, Buijs RM, Tilders FJH. eds. *The peptidergic neuron. Progress in Brain Research*. Amsterdam: Elsevier; 1992; 92: 321-33.
215. Rusak B, Bina KG. Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 387-401.
216. Shinohara K, Tominaga K, Isobe Y, Inouye SIT. Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: Daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide and neuropeptide Y. *J Neurosci* 1993; 13: 793-800.
217. Inouye SIT. Circadian rhythms of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. In Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran M, eds. *Hypothalamic integration of circadian rhythms: Progress in brain research*, Vol. III Amsterdam: Elsevier; 1996.
218. Larsen PJ. Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 1992; 316: 287-313.
219. Gillette MU. Regulation of entrainment pathways by the suprachiasmatic circadian clock: sensitivities to second messengers. In Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran M, eds. *Hypothalamic integration of circadian rhythms: Progress in brain research*, Vol. III Amsterdam: Elsevier;
220. Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J, Storm DR. Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Chem* 1999; 274: 17748-56.
221. Prosser RA, Gillette MU. The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by AMP. *J Neurosci* 1989; 9: 1073-81.
222. Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, et al. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 1993; 11: 449-58.
223. Prosser RA, McArthur AJ, Gillette M. cGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to AMP effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6812-5.
224. Ding JM, Hurst WS, Faiman LE, Kuriashkina LR, Gillette M. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation through light, glutamate and nitric oxide. *J Neurosci* 1997; 17: 667-75.
225. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998; 392: 933-6.
226. Asai M, Yamaguchi S, Isejima H, Jonouchi M, Moriya T, Shibata S, Kobayashi M, Okamura H. Visualization of mPer1 transcription in vitro: NMDA induces a rapid phase shift of mPer1 gene in cultured SCN. *Curr Biol* 2001; 11: 1524-7.
227. Bennet MR, Aronin N, Schwartz WJ. In vitro stimulation of c-Fos protein expression in the suprachiasmatic nucleus of hypothalamic slices. *Mol Brain Res* 1996; 42: 140-4.
228. Geusz ME, Fletcher C, Block GD, Straume M, Copeland NG, Jenkins NA et al. Long-term monitoring of circadian rhythms in c-Fos gene expression from suprachiasmatic nucleus cultures. *Current Biol* 1997; 7: 758-66.
229. Glass JD, Selim M, Rea MA. Modulation of light-induced c-fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT1A receptor agonists. *Brain Res* 1994; 638: 235-42.
230. Park HT, Baek SY, Kym BS, Kim JB, Kim JJ. Profile of Fos-like immunoreactivity induction by light stimuli in the intergeniculate leaflet is different from that of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1993; 610: 334-9.

231. Prosser RA, MacDonald ES, Heller HC. c-fos mRNA in the suprachiasmatic nuclei in vitro shows a circadian rhythm and responds to a serotonergic agonist. *Mol Brain Res* 1994; 25: 151-6.
232. Wisor JP, Takahashi JS. Regulation of the *vgf* gene in the golden hamster suprachiasmatic nucleus by light and by the circadian clock. *J Comp Neurol* 1997; 378: 229-38.
233. Aschoff J. Circadian rhythms in man. *Science* 1965; 148: 1427-32.
234. Ruby NF, Burns DE, Heller HC. Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro. *J Neurosci* 1999; 19: 8630-6.
235. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 2000; 14: 2950-61.
236. Stokan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 2001; 291: 490-3.
237. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Takahashi R, Menaker M, et al. Re-setting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000; 288: 682-5.
238. Fernández de Miguel F, Aréchiga H. Circadian locomotor activity and its entrainment by food in the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Biol.* 1994; 190: 9-21.
239. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000; 289: 2344-7.
240. Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 2001; 20: 7128-36.
241. Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N. Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (*rPer2*) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci Lett* 1998; 256: 117-9.
242. San Martín M, Toitou Y. Progesterone inhibits, on a circadian basis the release of melatonin by rat pineal perfusion. *Steroids* 2000; 65: 206-9.
243. Vrang N, Mikkelsen JD, Larsen PJ. Direct link from the suprachiasmatic nucleus to hypothalamic neurons projecting to the spinal cord: A combined study using cholera toxin subunit B and Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Brain Res Bull* 1997; 44: 671-80.
244. Kalsbeek A, Teclemariam-Mesbah R, Pevet P. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol* 1993; 332: 293-314.
245. Swanson LW, Cowan WM. The efferent connection of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 1975; 160: 1-12.
246. Taghert PH. How does the circadian clock send timing information to the brain? *Cell Develop Biol* 2001; 12: 329-42.
247. van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, van den Hurk R, Buijs RM. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 1997; 384: 569-79.
248. Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1987; 258: 204-29.
249. Stephan FK, Berkley KJ, Moss RL. Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 1981; 6: 2625-41.
250. Albers HE, Ferris GF. Neuropeptide Y: role in light-dark entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett* 1984; 50: 163-8.
251. Harrington ME, Nance DM, Rusak B. Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculohypothalamic tract. *Brain Res Bull* 1985; 15: 465-72.
252. Biello SM, Janik D, Mrosovsky N. Neuropeptide Y and behaviourally induced phase shifts. *Neuroscience* 1994; 62: 273-9.
253. Calza L, Giardino L, Zanni M, Velardo A, Parchi P, Marrama P. Daily changes of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Regul Peptides* 1990; 27: 127-37.
254. Mason R, Harrington ME, Rusak B. Electrophysiological responses of hamster suprachiasmatic neurons to neuropeptide Y in the hypothalamic slice preparation. *Neurosci Lett* 1987; 80: 173-9.
255. Shibata S, Moore RY. Neuropeptide Y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. *Brain Res* 1993; 615: 95-100.
256. Hoorneman EM, Buijs RM. Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 1982; 243: 235-41.
257. Van der Beek EM, Wiegant VM, Van der Donk HA, Van den Hurk R, Buijs RM. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-

- containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* 1993; 5: 137-44.
258. Kita Y, Shiozawa N, Jin WH, Majewski RR, Besharse JC, Greene AS, et al. Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 55-65.
  259. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as re-vealed by cDNA microarray is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 2001; 12: 540-50.
  260. Aréchiga H, Rodríguez Sosa L. Distributed circadian rhythmicity in the crustacean nervous system. In Wise K, ed. *Frontiers in crustacean neurobiology*. Berlin: Springer-Verlag; 2001. p. 113-23.
  261. Mignot M. A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25 (Suppl. 5): S5-13.
  262. Cheng MY, Bullock CM, Li CH, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, et al. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the supra-chiasmatic nucleus. *Nature* 2002; 417: 405-10.
  263. Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li XD, Scammell TE, Davis FC, et al. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 2001; 294: 2511-5.

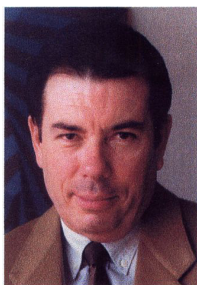
## SUSTRATO NEURAL DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

### Resumen.

Introducción y desarrollo. Las diversas funciones corporales varían rítmicamente a lo largo del ciclo de 24 horas. Estos ritmos circadianos tienen rasgos fenomenológicos comunes y se generan mediante mecanismos celulares y moleculares también comunes. El ritmo fundamental se produce de manera endógena en marcapasos celulares situados en diversas regiones del organismo; las estructuras más conspicuas se encuentran en el sistema nervioso central y están dotadas de células individualmente capaces de generar la ritmicidad circadiana, de comunicarse entre sí y de enviar la señal rítmica de tiempo a otros elementos del sistema, que la transmiten hasta los órganos efectores de las funciones que acusan la modulación circadiana. La ritmicidad en las células marcapaso es producida por la acción de genes específicos, integrados en una doble red de retroalimentación negativa. La estructura de estos genes revela gran conservación filogenética. Los marcapasos circadianos, a su vez, son sincronizados por estímulos ambientales de naturaleza rítmica, de los cuales es la luz el mejor estudiado; pero también actúan otros, como los alimentos, e incluso algunos factores internos, productos de la actividad metabólica. Estas señales sincronizadoras llegan a los marcapasos circadianos mediante receptores y vías específicas. Se ha demostrado ya la función de algunos neurotransmisores en la acción sincronizadora. Conclusión. Es necesaria la integridad funcional de este complejo sistema biocronométrico para el mantenimiento de la salud. Su alteración induce trastornos y aumenta la vulnerabilidad a ciertas enfermedades.

**Palabras clave:** Cronobiología. Relojes biológicos. Ritmos biológicos. Ritmos circadianos.

## Semblanza del Dr. Hugo Aréchiga. (in memoriam)<sup>2</sup>.



El pasado 15 de septiembre, en la Ciudad de Esmirna, Turquía, falleció víctima de un infarto el prominente neurobiólogo Hugo Aréchiga Urtuzuástegui, mientras participaba con el grupo de profesores del *Visiting Lecture Team Program* en un Curso auspiciado por la International Brain Research Organization (IBRO).

Nació el 11 de marzo de 1940 en la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Realizó sus estudios profesionales en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y obtuvo su Doctorado en Fisiología y Biofísica en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), México. En 1978, fue designado como Jefe del Departamento de Fisiología y Biofísica del CINVESTAV, una posición que mantuvo ininterrumpidamente durante los siguientes 14 años. Posteriormente tomó la posición de Jefe de la División de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM. Desde entonces y hasta su sensible deceso, permaneció como jefe de la División de Estudios de Posgrado.

Durante su vida académica, el Dr. Aréchiga fue un autor muy prolífico y cultivó varias líneas de investigación alrededor de problemas relacionados con ritmos circadianos. Es autor o editor de una veintena de libros y publicó cerca de 250 artículos, e impartió cerca de 300 conferencias sobre los más diversos temas, 80 de ellas por invitación fuera de México. El Dr. Aréchiga dirigió cerca de treinta trabajos de tesis, 14 a nivel de maestría y 7 de doctorado, y presentó poco más de 200 trabajos en Congresos junto con sus estudiantes.

En el área docente, impartió diversos cursos tanto a nivel licenciatura como en posgrado y especialidad. Fuera de México se desempeñó como profesor visitante y conferencista invitado en más de 50 instituciones en 30 países, entre ellas, las Universidades de Rice, Stanford y Harvard en Estados Unidos; Liverpool y Oxford, en Inglaterra; Complutense de Madrid, Internacional de Andalucía y Pablo de Olavide, en España; Basilea, en Suiza; Beijing, en China; Benin, en Nigeria; la Universidad Hebrea de Jerusalem; el Centro de Estudios Avanzados de Trieste, en Italia; el Instituto Tata, en India; el Instituto Clemente Estable, en Uruguay; la Universidad de la Habana, en Cuba; la Science University of Hanoi, en Vietnam, y; la Universidad Tarbiat Modarres, en Teherán.

El Dr. Aréchiga fue miembro de varios comités editoriales de revistas científicas internacionales, además de ser revisor para más de una docena de revistas internacionales. Recibió diversos reconocimientos: el Premio de la Academia Mexicana de las Ciencias en el campo de Ciencias Naturales (1979), la Beca Guggenheim (1981), el Premio por "Liderazgo Internacional" de la Association for Policy, Research and Development in the Third World (1990), el Premio Nacional de Ciencias Naturales y Exactas 1992 y la Cátedra Patrimonial de Excelencia, así como la designación de investigador nacional emérito (2003) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Sin embargo, sin restar ningún mérito a los logros académicos y administrativos del Dr. Aréchiga, sus numerosas publicaciones, conferencias, cursos, etc., su mayor triunfo fue la amistad que supo inspirar entre sus colegas. Su trato siempre fue sencillo y cálido, y a pesar de las múltiples actividades y tareas en las que cotidianamente participó, siempre encontró tiempo para atender a todos sus colegas y estudiantes, que no eran pocos. Sus amigos recordaremos con placer el corto tiempo que pasó con nosotros.

<sup>2</sup> Semblanza elaborada en base a la nota publicada in memoriam al Dr. Hugo Aréchiga Urtuzuástegui por *Viguera Editores, S.L.*: Famón F, Julián-Sánchez A, Delgado-García JM y Riveros-Rosas H. (2004). *In memoriam: Hugo Aréchiga Urtuzuástegui (1940-2003)*. Rev. Neurol. 38: 398-399. (<http://www.revneurol.com/>).