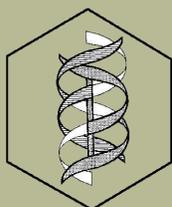


Revista de Educación Bioquímica

REB 2018



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



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, A.C.

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM

Facultad de Medicina



EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

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

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Pediatría

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

VÍCTOR M. VALDES LÓPEZ

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

MARÍA MALDONADO VEGA

Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., Mexico

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie, Redalyc, Latindex y Scielo.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), Volumen 37, Número 1, marzo de 2018, publicación trimestral, editada por Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., Avenida Universidad No. 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad de México, México. Correspondencia: Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Correo E: reb@bq.unam.mx
<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/Reb/HomePage>
http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=101
Editor responsable Dr. José Víctor Calderón Salinas. ISSN: 1870-3690. Reserva de derechos al Uso Exclusivo No. 04-2015-113014523300-203, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en marzo del 2018.
El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente las del Comité Editorial. Se autoriza la reproducción parcial o total de los textos aquí publicados siempre y cuando se cite la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

LA CHARLATANERÍA DISFRAZADA DE CIENCIA
José Victor Calderón Salinas1

ARTÍCULOS

LA CINASA DE RESIDUOS DE SERINA Y
TREONINA BLANCO DE LA RAPAMICINA
(TORC1) ES ESENCIAL EN EL METABOLISMO
CELULAR DE LOS EUKARIONTES
Lucero Romero Aguilar,
Guadalupe Guerra Sánchez,
Oscar I. Luqueño Bocado,
Juan Pablo Pardo.....4

ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRE-
SIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN
Escherichia coli
Andrés González y
María F. Fillat.....14

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL
METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS
Yolanda Saldaña Balmori.....28

XXVI CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN
MEXICANA DE PROFESORES DE
BIOQUÍMICA, A. C.32

OBITUARIO
Ricardo Miledi y Dau (1927-2017)
Rocío Salceda Sacanelles.....34

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL
METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS
Yolanda Saldaña Balmori.....35

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....36

EDITORIAL

LA CHARLATANERÍA DISFRAZADA DE CIENCIA

Hace unos días me pidieron ver un video de un noticiero local de Torreón Coahuila, sobre una supuesta egresada del Tecnológico de la Laguna en Torreón, resaltando sus "investigaciones", "empresas", "patentes" y "asombrosos resultados" al regenerar diferentes partes del organismo con productos que contienen grafeno y un diseño nanotecnológico, debido a lo cual sería invitada a la ceremonia de entrega del premio Nobel (sin especificar a cuál de las ceremonias). El conductor con absoluta ligereza indicaba los atributos y calificativos para la autonombraada investigadora científica, empresaria y emprendedora.

Apenas dejé pasar unas cuantas escenas, cerré el video y le comenté a la persona que me pidió verlo, seguramente por ser un egresado de la Facultad de Medicina en Torreón y por mi trabajo de Bioquímica Médica en el Cinvestav. -En mi opinión se trata, sin lugar a dudas, de charlatanería disfrazada de ciencia, no vale la pena verlo completo, es un descarado fraude- lo sentencie contundentemente.

Al siguiente día tuve que ver el video completo y algunas ligas relacionadas con la empresa que se menciona, debido a una serie de mensajes y llamadas que pedían mi opinión sobre la conveniencia de comprar dichos productos para pacientes con cáncer, con diabetes y enfermedades hereditarias. Procedí a verlo con atención y la decepción fue en aumento, no solo por lo que decía una egresada del Tecnológico de la Laguna, sino por el manejo tan pobre y maniqueo de la información, la desinformación del entrevistador, pero tal vez lo más triste, fue constatar el impacto social que pueden tener unas palabras estructuradas con la seguridad, simpleza y contundencia que da el descaro, la falta de autocrítica, la mentira dolosa y la falta del mínimo pensamiento y rigor científico. Charlatanería pura que hace recordar a los merolicos de las ferias o los mercados que ofrecen elixires que curan desde callosidades en los pies hasta cáncer y que no tienen necesidad de ofrecer antecedentes, sino su palabra de que lo que ofrecen funciona.

La supuesta investigadora, empresaria, emprendedora y expendedora de salud mencionó -si

el grafeno ya se usa para hacer celulares que se autorreparan en caso de romperse-, la brillante deducción era clara ¿porqué no usarse para que el organismo se repare? ofreciendo un gel para ser ingerido y "reparar" órganos particulares y enfermedades específicas de acuerdo al color del gel, conteniendo supuestas nanopartículas de grafeno. Las ideas anteriores son más que suficientes para poner en evidencia la terrible ignorancia y el manejo conceptual totalmente deficiente de la ingeniería de materiales, la nanotecnología, la biología, la bioquímica y que decir de la parte médica, del conocimiento de las enfermedades y menos aún de la farmacología. Y qué decir de la supuesta investigación que contienen sus aseveraciones, fuera de dos o tres términos que se pueden consultar en internet y memorizar. Todo el discurso que se escucha y el que aparece escrito en las páginas de la empresa es contrario a la ciencia, el método científico y un mínimo análisis crítico del conocimiento.

Recordé entrevistas de personas en las estaciones de radio de la Ciudad de México, donde dicen curar la diabetes con gelatinas de nopal, la artritis con ozono, el cáncer con extractos de frijol y una lista interminable de mentiras, mala información y tendenciosa, todas referidas a que se realizaron por "investigadores" o "egresados" de la UNAM, del Politécnico Nacional, la UAM o las universidades y tecnológicos de todo tipo; pronunciando frases que hacen pensar que son avaladas por dichas instituciones y por tanto respaldadas por su prestigio académico científico. Frases ricamente aderezadas por algunos términos técnicos, que no entienden, pero que los hacen aparecer como de un nivel elevado y que suena a que es importante. Todo esto, apostando por supuesto al bajo nivel crítico del análisis del conocimiento, a la baja cultura médica, científica y técnica de la población en general y en lo que participan algunos medios de comunicación, ávidos de noticias espectaculares, que les permite generar noticias y por supuesto explotando inserciones pagadas que deberían de ser sancionadas por las autoridades, sobre todo cuando se trata de elementos que tienen afecciones a la salud, más allá del fraude al mentir sobre los efectos benéficos

de algún compuesto, supuesto medicamento o los ahora tan socorridos suplementos alimenticios.

Es necesario estar conscientes y evaluar todos los efectos que las mentiras sobre productos milagros tienen; éstos generan en el paciente y en los familiares una esperanza que puede llevar incluso a dejar sus tratamientos médicos, con consecuencias trágicas. En mi caso conozco pacientes que por desesperación, necesidad de esperanza y credulidad en la propaganda engañosa han dejado su tratamiento médico contra la diabetes, la hipertensión arterial o la insuficiencia renal, por gelatinas, tabletas de hongos desecados, polvos de víbora de cascabel o por temazcales curativos desintoxicantes de la sangre, con consecuencias muy negativas en la evolución de sus padecimientos.

Por supuesto que la mentira, la exageración y las promesas falsas son contundentes y atractivas y más aún si se disfraza de ciencia y se transmite por la televisión o el radio en cualquier horario y es presentada y repetida por conductores de programas a los que se les ve diariamente y que han tomado de una u de otra forma un liderazgo de opinión convirtiéndose en los "expertos", médicos, psicólogos, sociólogos, politólogos y que saben que es más "interesante", "impactante" y "comercial", entrevistar a alguien que diga: "el grafeno cura cualquier tipo de cáncer,... este líquido color rojo es para el pulmón y el azul es para el riñón" a un experto que diga: "tenemos tres años en un estudio de campo y pensamos que el tratamiento con antioxidantes puede ofrecer una mejora relativa pero estadísticamente confiable del daño que causa la intoxicación por plomo en la población estudiada". El público que prefiere oír "una gelatina diaria es suficiente para tratar la diabetes" o a quien dice "el tratamiento con este fármaco por seis meses ha demostrado reducir la glucosa en la sangre de manera efectiva si el paciente ha seguido sus indicaciones dietéticas y ha hecho ejercicio, en tal forma podemos observar un adecuado control de la diabetes a mediano y largo plazo". La realidad, basada en información científica puede ser dolorosa, pero las falsas esperanzas son abismalmente nocivas para el paciente en particular y para el desarrollo de la cultura medica-científica de la sociedad en general y sólo sirven para enriquecer a charlatanes, sin que exista una respuesta de las autoridades.

Hace algunos años mi Mamá padeció un linfoma no Hopkins, con trágicas consecuencias, por supuesto, aseguré el mejor tratamiento y aun así la agresividad del cáncer la llevó a la muerte, no fueron suficientes los tratamientos y cuidados. No

pocas personas me sugirieron intentar tratamientos no convencionales y por supuesto tratamientos milagro, varios de ellos disfrazados de ciencia. Solo permití lo que no podrían ser nocivos y nunca como sustitutos de los protocolos médicos internacionalmente aceptados. -Deja que se trate con otros métodos- me dijo alguien -no hay milagros médicos, pero sí de otros-. Le contesté -claro que existen los milagros científicos y médicos, solo que estamos tan acostumbrados a ellos y ahora son tan conocidos y tan poco promocionados, pero existen y nos impactan diariamente-.

Recordé a mi sobrino con una alteración cardíaca donde, después de 16 cirugías complejas a sus 20 meses, médicos del Hospital de Cardiología del IMSS en Monterrey le salvaron la vida y ahora a sus 19 años es un joven fuerte, estudioso y trabajador. Recordé como sobrevivió mi Abuelito más de 5 años, con mejor calidad de vida, gracias a la inmunoterapia instalada por el Grupo del Dr. Carbajal en Ciencias Biológicas del IPN, cuando ese tratamiento apenas era una promesa. Pero no tenemos que buscar elementos críticos y apantallantes, diariamente se realizan miles de milagros diagnósticos y de tratamiento, gracias al esfuerzo científico académico en todo el mundo y no solo en descubrimientos y avances, sino en la propia consulta, a pesar de las críticas a nuestros sistemas de salud, en las que coincido y alzo la voz, hay en el interior miles, millones de historias que hacen la diferencia entre la vida y la muerte y entre la mejor calidad de vida y la desatención a la salud. Hay gente en los lugares más recónditos e impensables, como lo he constatado con trabajo de campo, de médicos, enfermeras, trabajadoras sociales, en la nada, con recursos más que limitados, que dan atención y ofrecen una verdadera esperanza de vida y de bienestar a miles de personas que de otra forma estarían en la absoluta desesperanza. Millones de personas en todo el mundo beneficiadas por los resultados discretos, ininteligibles a veces, parciales otras, pero constantes siempre, lo que permite avanzar, fortaleciendo la ciencia, la medicina, la academia, sin mentiras, sin interés económicos malsanos y sin un rector utilitario como única meta, sino con la convicción de aportar al conocimiento para ofrecer beneficios tangibles y probados.

Por supuesto que el avance de la ciencia es lento y difícil; investigaciones controladas, con técnicas validadas e internacionalmente aceptadas, con observaciones estadísticamente analizadas, dando cuenta de mecanismos de acción y la inserción lógica en el conocimiento universal, con premisas

correctas y atadas a paradigmas de las diferentes áreas del conocimiento, resultados que pueden ser útiles y aplicados a un sistema que derivó de la investigación a un fenómeno estudiado, a un tipo de enfermedad particular. Exigiendo el conocimiento de la enfermedad, la farmacodinamia y la farmacocinética. Por supuesto ni un mínimo criterio se cumple en mencionado caso del grafeno curando todo, reparando todas las células del organismo y ofreciendo geles de colores para la eterna juventud.

Ojalá que los medios de difusión y la potencia de divulgación pudieran ser aprovechados en la ciencia, la medicina, la tecnología, que como en la Región Lagunera es importante y avanza firmemente, las investigaciones en la Facultad de Medicina son sobresalientes en diferentes ámbitos, pero no se quedan atrás las de agricultura, odontología, veterinaria y muchas otras, sin dejar de resaltar al Tecnológico de la Laguna con sus aportes en física, ingeniería, mecatrónica, robótica, solo por mencionar los que conozco. Sin duda debo de mencionar directamente este fenómeno, aunque parezca lo-

calista por mi formación de licenciatura en Torreón Coahuila, con la indignación del daño que esas noticias provocan a quienes hacen un esfuerzo, para conseguir recursos, trabajar seriamente y publicar en revistas nacionales e internacionales, con hallazgos discretos, pero científicamente validados, como todos hacemos y cuyo trabajo genera las bases de descubrimientos y avances que cambian lenta e inexorablemente, con la confianza que están basados en el método científico y que podrán ser puestos a prueba en el mundo académico científico, aunque no sean cambios cuánticos, pero pasos firmes a mejorar nuestro mundo y generar los milagros científicos que se deslizan diariamente en nuestra vida sin darnos cuenta.

Dr. José Víctor Calderón Salinas
Laboratorio de Bioquímica Médica
Departamento de Bioquímica
CINVESTAV-IPN
Editor en Jefe REB

LA CINASA DE RESIDUOS DE SERINA Y TREONINA BLANCO DE LA RAPAMICINA (TORC1) ES ESENCIAL EN EL METABOLISMO CELULAR DE LOS EUCARIONTES*

Lucero Romero Aguilar^{1,2**}, Guadalupe Guerra Sánchez¹, Oscar I. Luqueño Bocardo², Juan Pablo Pardo²

¹Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional;
²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**Autor de correspondencia correo E: lusromaguila@hotmail.com

RESUMEN

El complejo proteico blanco de la rapamicina (TORC) participa en la regulación del crecimiento y de varios aspectos del metabolismo celular, tales como: síntesis de fosfolípidos, biogénesis de los ribosomas, incremento de la síntesis de RNAm y de proteínas e inhibición de la autofagia. Su actividad se regula por diversas señales generadas por nutrientes, factores de crecimiento y oxígeno, entre otras. Al entrar estas moléculas a la célula modifican la actividad de TORC, quien se encarga de amplificar la señal. La importancia del complejo radica en que es el núcleo integrador de una amplia gama de señales necesarias para un adecuado metabolismo celular. Se revisará brevemente las funciones de TORC en la regulación del metabolismo celular y su conservación desde levaduras a mamíferos.

PALABRAS

CLAVE:

TORC, regulación del metabolismo, aminoácidos, rapamicina.

ABSTRACT

Target of Rapamycin Complex is a key regulator of growth and several aspects of the cell metabolism like the biogenesis of ribosomes, the inhibition of autophagy, and the increase in the synthesis of mRNA and proteins. Its activity is regulated by several signals given by nutrients, oxygen and growth factors. The inputs of these molecules are funneled through TORC, which amplifies the signals. TORC is the center of many metabolic networks. The implications of this complex in cellular metabolism regulation, as well as its conservation from yeast to mammals will be discussed.

KEY WORDS:

TORC, metabolism regulation, amino acids, rapamycin.

La rapamicina y TOR

La rapamicina es un macrólido con actividad antifúngica, anticancerígena e inmunosupresora. Fue descubierta en 1975 como metabolito de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, aislada de una muestra de suelo de la isla Easter, también conocida como Rapa Nui. En la década de los 90, se sabía que la ciclosporina y la rapamicina tenían efectos inmunosupresores y que eran importantes para evitar el rechazo de órganos trasplantados, pero se desconocían sus blancos moleculares. Experimentos realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, demostraron que el blanco de la rapamicina (TOR)

era una cinasa de serina/treonina que pertenece a la superfamilia de las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K); también se identificó a la prolina isomerasa FKBP12 como receptor de la rapamicina, necesaria para que este compuesto inhiba a la cinasa. Posteriormente se encontró que TOR está muy conservada en los eucariontes (1, 2).

Generalidades de los complejos TORC1 y TORC2

Las proteínas cinasas Tor1 actúan a través de dos complejos multiproteicos llamados TORC1 y TORC2, los cuales detectan y responden a señales desenca-

denadas por fuentes de nitrógeno, glucosa, oxígeno, diversos mitógenos y factores de crecimiento en levaduras y en mamíferos (3). TORC1 participa en la regulación del crecimiento y de varios procesos del metabolismo celular tales como la síntesis de fosfolípidos, la biogénesis de los ribosomas, el incremento de la síntesis del RNAm y de proteínas y la inhibición de la autofagia, entre otras, mientras que TORC2 está relacionado con la regulación de la polarización de la actina, los procesos de endocitosis, la actividad de la calcineurina, la síntesis de esfingolípidos y la organización del citoesqueleto. Para diferenciar entre los complejos TORC de mamíferos con los de levaduras, se coloca una "m" antes de TORC (mTORC) para la proteína de los mamíferos, mientras que para el de las levaduras sólo se usa TORC.

En los mamíferos mTor participa en la formación de dos complejos, mTORC1 y mTORC2, debido a que en el genoma sólo hay un gen para mTor. El complejo mTORC1 tiene un peso molecular de 1.2 MDa y consta de 5 subunidades: mTor, que es la su-

bunidad catalítica; la proteína reguladora asociada a Tor1 (RAPTOR, por sus siglas en inglés); mLST8 (mammalian lethal SEC13 protein 8); DEPTOR (Dishevelled/EGL-10/Pleckstrin) domain-containing mTOR-interacting protein) y PRAS40 (proline rich AKT substrate 40 KDa) (Fig. 1A). La subunidad mTor1 tiene un peso molecular de 282 kDa y un dominio C-terminal con actividad de cinasa (Fig. 1B). En el extremo N-terminal hay 40 repeticiones en tándem de 37-43 aminoácidos llamados HEAT (Huntington, elongation factor 3, la subunidad de PP2A y Tor), le sigue el dominio FAT (Focal Adhesion Target) de aproximadamente 500 aminoácidos, y flanqueando al dominio de cinasa, se encuentran los dominios FRB (~100 aminoácidos) y FATC (~600 aminoácidos) (Fig. 1B) (4-7). El dominio de cinasa es el dominio catalítico y es similar al dominio de cinasa de las fosfatidilinositol cinasas PI3K y PI4K (8). Los dominios HEAT ocupan casi la mitad de la región N-terminal y son el sitio de unión para algunas de las subunidades de los complejos TOR (Figuras 1A y 1B). La rapamicina, al asociarse con la prolin isomerasa FKBP12, favorece la interacción

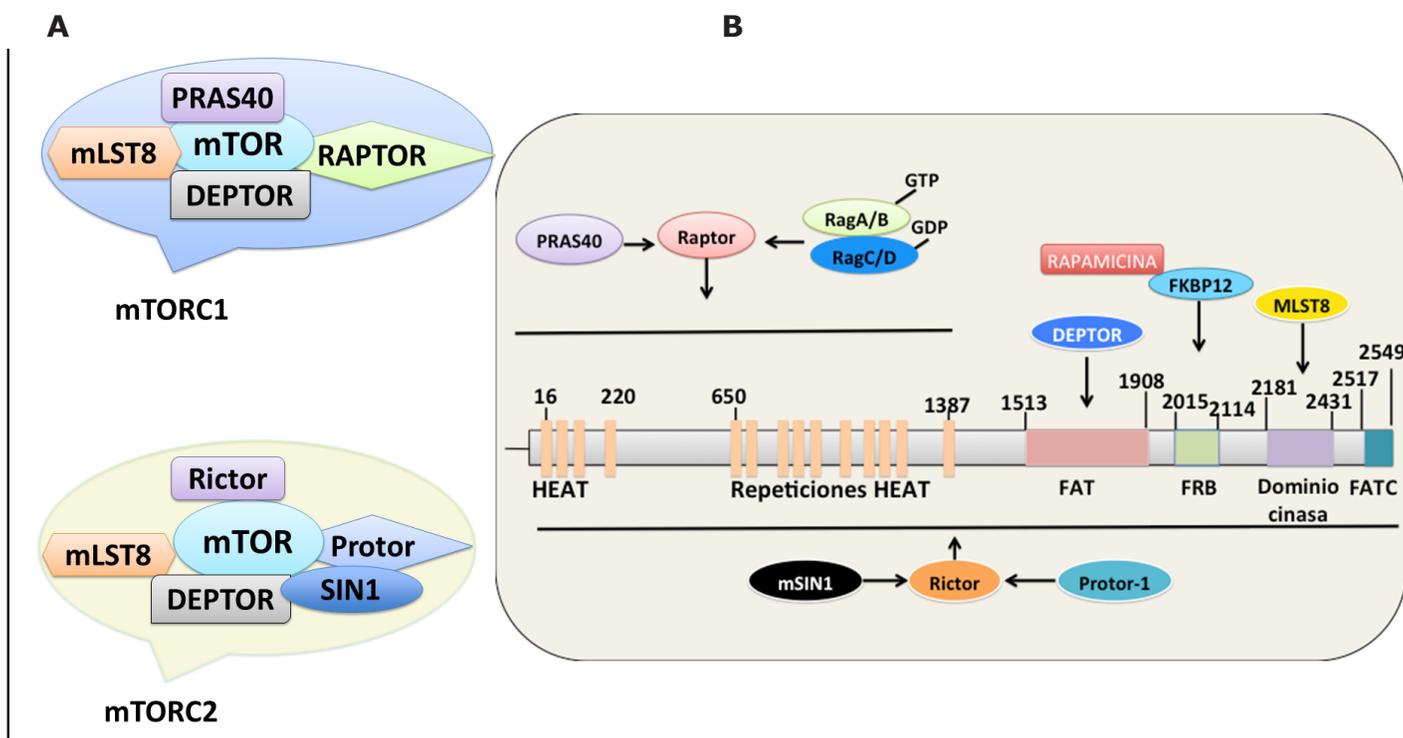


Figura 1. Dominios de la proteína mTor y los componentes de mTORC1 y mTORC2. A) mTORC1 está compuesto de 5 subunidades, mientras que mTORC2 tiene 6. Los complejos tienen en común la proteína cinasa, mLST8 y DEPTOR. RAPTOR y PRAS40 son exclusivas del complejo 1, mientras que RICTOR y Protor1,2 y mSIN1 del complejo 2. Además mTORC2 es insensible a rapamicina. **B)** Estructura de la proteína cinasa de Ser/Thr mTOR. El extremo amino terminal de mTOR contiene un tándem repetido de unidades HEAT (α -hélices antiparalelas que se encuentran en la huntingtina, factor de elongación 3, PP2A y TOR), importantes para las interacciones proteína-proteína. Los dominios FAT y FATC (35 aminoácidos aproximadamente) modulan la actividad del dominio cinasa. La rapamicina se une a la FKBP12 y este complejo interactúa con FRB, inhibiendo a TORC1. Modificada de referencia 5 y 10.

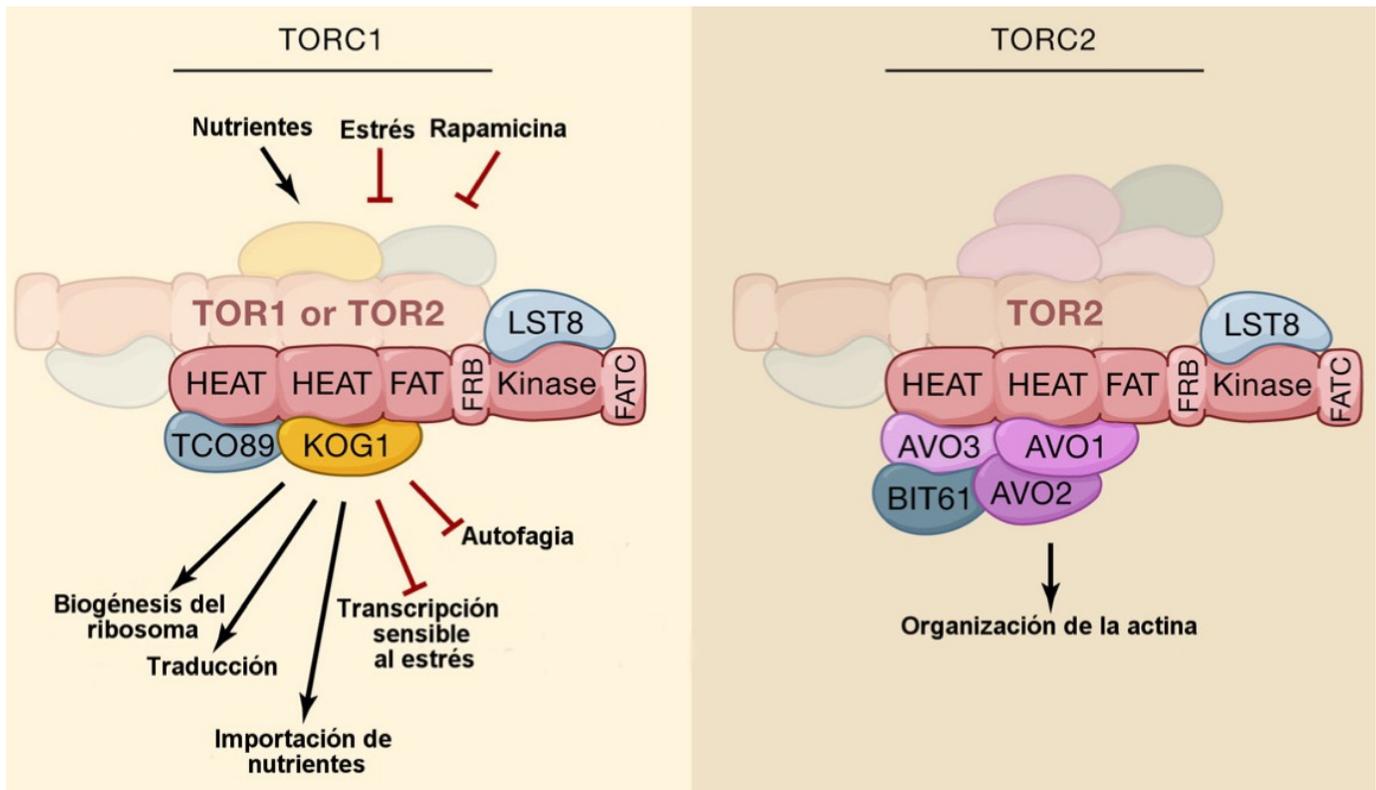


Figura 2. Complejos TOR1 y 2 de *S. cerevisiae* y los eventos que regulan. La proteína *tor1* sólo puede ensamblar el complejo 1 mientras que *tor2* puede ensamblar los dos complejos. Modificada de referencia 11.

de ésta con el dominio FRB de mTOR e inhibe su actividad (8-12). Además de que mTORC1/TORC1 es blanco de la rapamicina, también se inhibe cuando hay inanición de nutrientes, específicamente fuentes de nitrógeno.

Por otro lado, mTORC2 es insensible a la rapamicina y está integrado por seis proteínas: mTOR, RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interactin protein), Protor1 (protein observed with Rictor-1), mLST8 y DEPTOR (Fig. 1A y 1B). Ambos complejos se regulan negativamente por la proteína DEPTOR. Sólo mLST8 parece ser esencial para la actividad de mTORC2 (2, 13, 14).

En contraste con los mamíferos, *S. cerevisiae* tiene dos proteínas, Tor1 y Tor2, codificadas por genes diferentes. Tor1 puede formar parte de TORC1 o TORC2, mientras que Tor2 sólo puede integrar a TORC2 (Fig. 2) (2, 4, 14). En las levaduras los componentes de TORC1 son Tor, Lst8, kog1 y Tco89. Por otro lado, los componentes de TORC2 son Tor2, Lst8, Avo1, Avo2, Avo3 y Bit61 o su parálogo Bit2. A diferencia de lo que ocurre mTORC1 en mamíferos y TORC1 en *S. cerevisiae*, el complejo FKBP12-rapamicina no interactúa con

el dominio FRB de las subunidades mTor o Tor1/Tor2 en los complejos mTORC2/TORC2, debido a un impedimento estérico causado por la subunidad RICTOR o Avo3, respectivamente (Fig. 2) (15, 16). La tabla 1 resume las diferencias en los componentes de los complejos TOR de mamíferos y levaduras.

Regulación y funciones de los complejos de TOR

En mamíferos, Raptor se pega a mTor en mTORC1 y su función es unir a varios sustratos, como el factor de traducción 4E-BP1 (inhibidor del factor de iniciación de la traducción eIF4E) y la cinasa S6K1, al dominio catalítico de mTOR, que cataliza la fosforilación de estas proteínas (17, 18) (Fig. 3). El activador de TORC1 es la GTPasa pequeña Rheb, que cuando tiene unido al GTP se une a mTOR y la activa. La proteína cinasa B (Akt), al inhibir a TSC1/TSC2 (complejo heterodimérico de la esclerosis tuberosa), mantiene activa a Rheb (Rheb-GTP). TSC1/TSC2 inhibe la actividad de mTORC1 (19) debido a que la subunidad TSC2 contiene un dominio GAP (GTPasa Activating Protein) que estimula la actividad de GTPasa de Rheb y con esto se produce la forma inactiva de Rheb (Rheb-GDP) (Fig. 3).

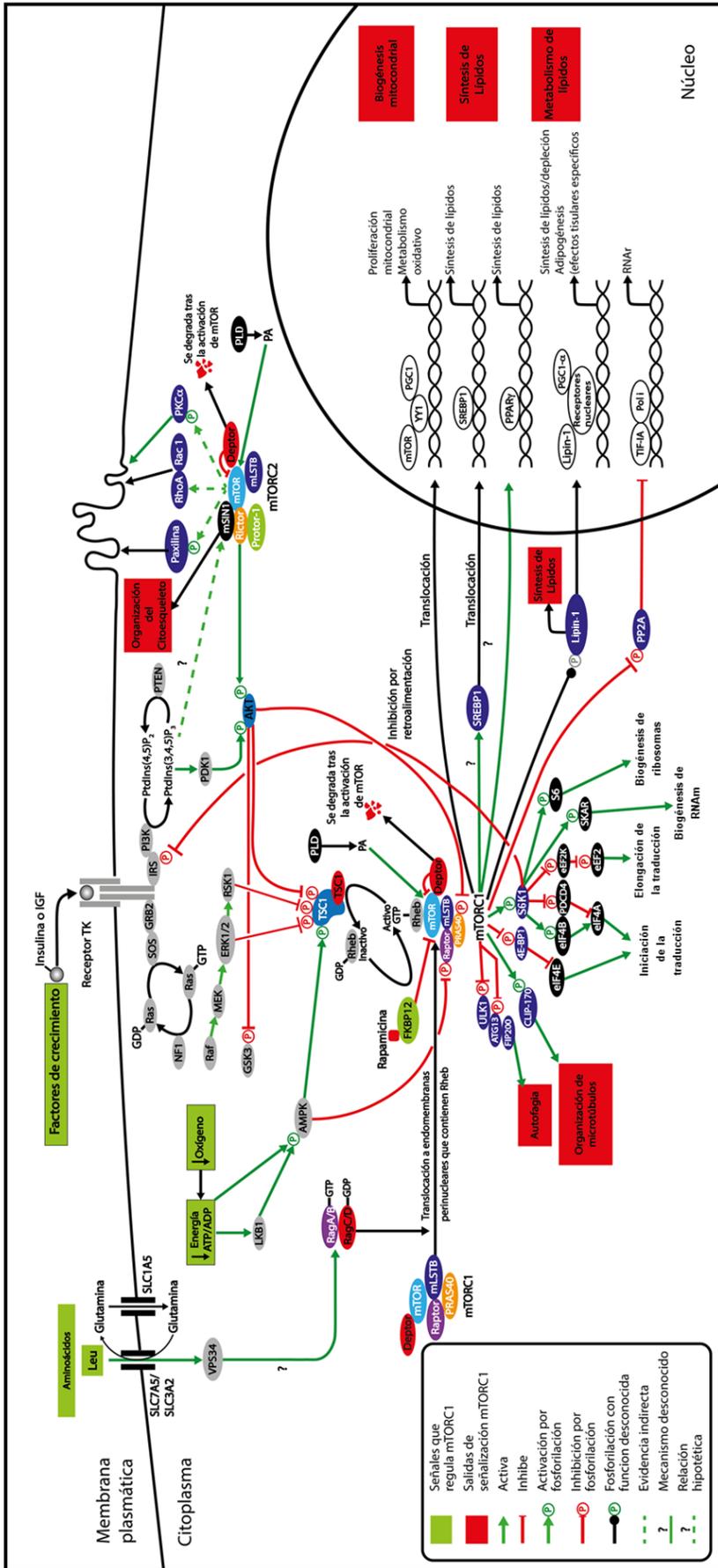


Figura 3. Señalización de TORC1/2 en mamíferos. mTORC1 regula la síntesis de proteínas, la síntesis de lípidos, el metabolismo, la biogénesis mitocondrial y la autofagia. La proteína cinasa B (AKT) es uno de los principales blancos de mTORC2; este último está involucrado en la organización del citoesqueleto. AMPK, proteína cinasa activada por AMP. ATG13, proteína-13 relacionada a la autofagia. CLIP-170, regula la dinámica del microtúbulo. mTOR proteína blanco de la rapamicina. Deptor, Raptor, PRAS40, mLST8 y Rheb, subunidades de mTORC1. Deptor, mSIN1, Rictor, Protor-1, mLST8, subunidades de mTORC2. eEF2, factor de elongación 2 eucariótico y eEF2K, cinasa del factor de elongación 2. eIF4E, eIF4B, eIF4A, factores de iniciación de la traducción eucariótica. PDCD4, proteína de muerte celular programada 4. PPAR γ , receptor nuclear activado por el proliferador de peroxisomas, que tiene la capacidad de acoplarse con una gran variedad de moléculas, como las tiazolidinedionas. Pol I, RNA polimerasa 1. PP2A, proteína fosfatasa 2A. Rag, Rheb, Rho, Rac1, proteínas de unión a GTP, homólogos de Ras. S6K1, cinasa de la proteína ribosomal S6. SKAR, proteína blanco de S6K1. SLC, acarreadores de aminoácidos. SREBP1, proteína 1 de unión a los elementos reguladores de esterol. TIF-IA, factor 1A de la iniciación de la transcripción del RNA ribosomal. TSC 1 y 2, complejo de la esclerosis tuberosa. ULK1, cinasa de serina/ treonina; VPS34, fosfatidilinositol 3 cinasa necesaria para el transporte de la vacuola y en la autofagia; YY1, ying-yang 1, proteína represora de la transcripción del receptor activado por el proliferador de peroxisomas. AMPK; Lipin-1, proteína con actividad de fosfatidato-fosfatasa. PGC1- α , proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas. PKC- α , proteína cinasa C α . FIP200, proteína que interactúa con ULK1 para la formación del autofagosoma. GSK3, Glucógeno sintasa 3. FKBP12, peptidil-prolil cis-trans isomerasa que une a la rapamicina. Modificada de referencia 35.

Tabla 1. Componentes de mTORC1/2 en mamíferos y sus ortólogos en *Saccharomyces cerevisiae*

Complejo	Ortólogo en mamífero	Ortólogo en levaduras	Tamaño de la proteína (kDa)	Tamaño del complejo (MDa)
TORC1	?	Tco89	89	1.2
	Raptor	Kog1/Las24	178	
		Tor1	281	
TORC1 y 2	mTOR	Tor2	282	
	mLST8	Lst8	34	
Sólo, TORC2	Rictor	Avo3/Tsc11	164	1.4
	?	Avo2	47	
	hSin1	Avo1	131	
	Protor-1,2	Bit61, Bit2	61	

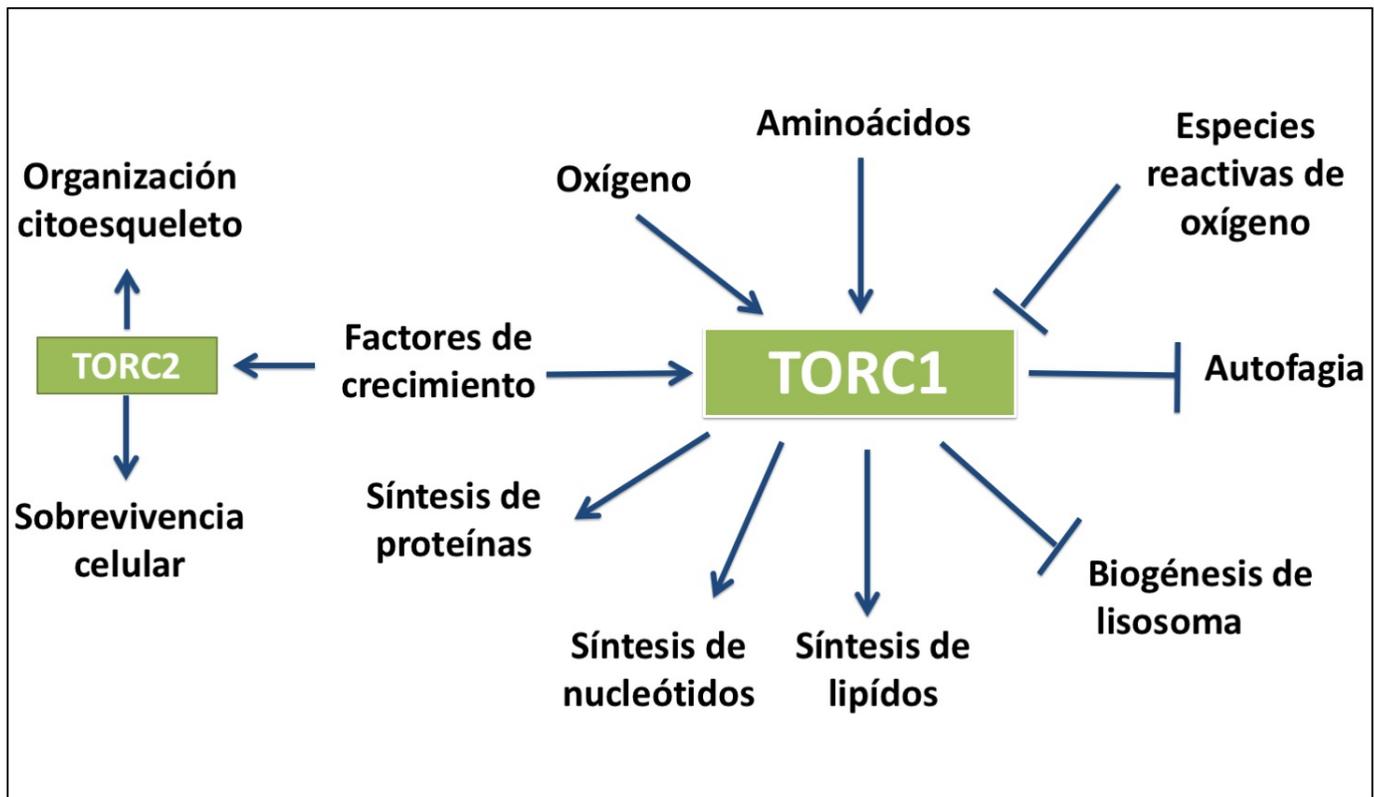


Figura 4. Señales que activan a los complejos Tor y sus efectos celulares. TORC1 de levaduras y mamíferos detecta señales del medio como la disponibilidad de aminoácidos, oxígeno, factores de crecimiento o especies reactivas de oxígeno. Cada una de estas señales es traducida a una respuesta celular a través de diversas cascadas de señalización. Modificada de referencia 31.

TSC1 no tiene un dominio GAP y no es activadora de mTORC1, pero estabiliza a TSC2 (19).

Cada uno de estos complejos regula diferentes procesos metabólicos en la célula a través de las

vías de señalización activadas por los nutrientes disponibles. Debido a que TORC1 es blanco de la rapamicina, las respuestas celulares más estudiadas son aquellas en las que participa mTORC1/TORC1,

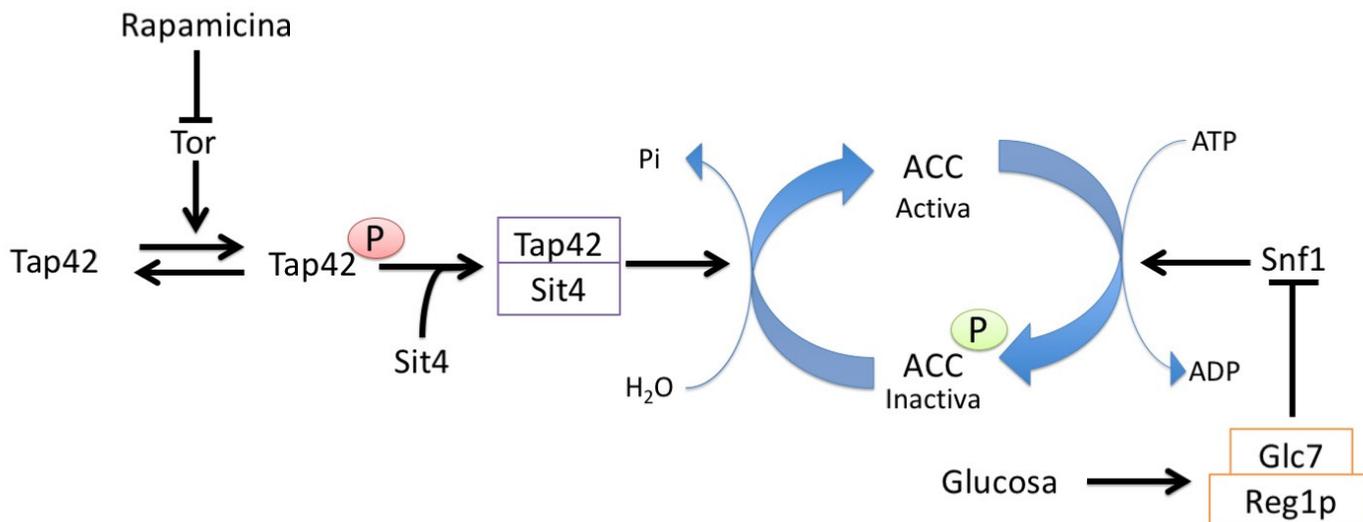


Figura 5. TORC1 participa en la regulación del metabolismo lipídico. Tor1 fosforila a Tap42, la cual se asocia con la fosfatasa Sit4, que desfosforila y activa a la acetil-CoA carboxilasa (ACC). En presencia de glucosa, la proteína fosfatasa 1 formada por las subunidades Reg1p y Glc7, desfosforila e inhibe a la AMP cinasa Snf1 lo que conduce a un aumento de la desfosforilación de la ACC y su posterior activación. Cuando Snf1 fosforila a la ACC, ésta se inhibe.

por lo que se sabe que en mamíferos el complejo inhibe la autofagia, estimula la síntesis de lípidos, la biogénesis ribosomal y la traducción del RNAm a través de la fosforilación de S6K1 y 4E-BP1 (sus sustratos mejor conocidos), permite la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, y participa en la respuesta inmuno-adaptativa (Fig. 4) (20, 21).

Respecto a mTORC2, al no ser blanco de la rapamicina, los eventos celulares en los que participa se han explorado menos. Sin embargo, se sabe que responde a señales causadas por factores de crecimiento y que su principal efector es la proteína cinasa B (PKB/Akt) y la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) (Fig. 3) (21). La actividad de TORC2 se ha relacionado con la regulación de la polarización de la actina, la endocitosis a través de la PKC y del complejo RhoA-Rac1, la actividad de la calcineurina, la síntesis de esfingolípidos y la integridad del genoma en levaduras (Fig. 4). Sin embargo, se desconocen los mecanismos precisos por los cuales actúa (14, 16, 22). Utilizando técnicas de co-precipitación de TORC2 en *Dictyostelium*, una especie amiboidea del filo *Mycetozoa*, que vive en el suelo, se encontró que las GTPasas pequeñas RasC y Rap1 controlan la actividad de TORC2 a través de su unión al dominio catalítico de Tor y RIP3/SIN1, respectivamente (16).

TORC1 en la regulación del metabolismo lipídico

Los principales efectores de la respuesta río abajo de TORC1 son la cinasa Sch9 y la proteína fos-

fatasa tipo 2A (PP2A), que junto con la proteína TAP42p, dirigen la respuesta celular al ambiente nutricional a través de TORC1 (23). Cuando se activa, TORC1 fosforila a Tap42, la cual se asocia con Sit4, la subunidad catalítica de una fosfatasa de serina-treonina tipo 2, que desfosforila y activa a la acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima clave en la biosíntesis de los ácidos grasos (Fig. 3). La eliminación de Sit4 en *S. cerevisiae* disminuye la producción de los ácidos grasos y aumenta la sensibilidad a sorafen A, que inhibe a la ACC y, por lo tanto, la síntesis de lípidos (24, 25). Sorafen A es un policétido macrocíclico aislado de la mixobacteria *Sorangium cellulosum*, que se une a la ACC de eucariontes con una constante de disociación de 1.1 ± 0.3 nM (26). Por otra parte, la proteína fosfatasa 1, formada por una subunidad reguladora (Reg1p) y otra catalítica (Glc7), inhibe a la AMP cinasa Snf1 (Sucrose non fermenting), encargada de fosforilar a la ACC. La actividad de la ACC depende de su estado de fosforilación: cuando está desfosforilada se encuentra en su forma activa, pero pierde la actividad cuando se fosforila (Fig. 5).

En la misma levadura, se pueden suprimir al azar genes que codifican para fosfatasas que no participan directamente en la síntesis de lípidos, pero que resulta en una mayor acumulación de éstos. Cuando se elimina el gen que codifica para la diacilglicerol acil transferasa (DGAT), los niveles de triacilgliceroles (TAG) disminuyeron, mientras que con la supresión de una triacilglicerol lipasa, incrementan los niveles de TAG. El tratamiento de la

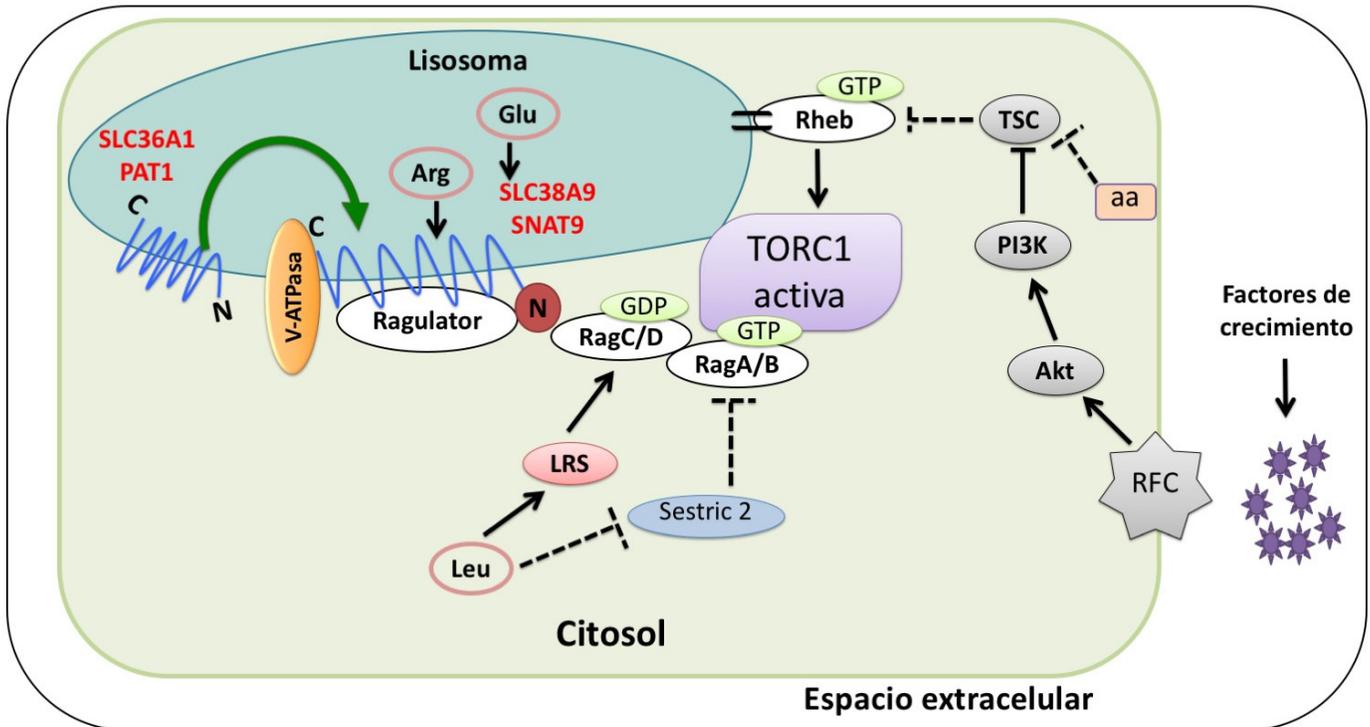


Figura 6. Modelo de la regulación de TORC1 por aminoácidos. La activación de TORC (morado) depende de la concentración de los aminoácidos (aa), la cual es detectada por los transportadores de aminoácidos (línea zigzag azul). La disponibilidad de aa en la célula promueve la activación de TORC1 por Rag-GDP/GTP y Rheb-GTP. Los factores de crecimiento también promueven la activación de TORC1. En el esquema las inhibiciones debidas a la ausencia de aminoácidos o factores de crecimiento se muestran con líneas punteadas, los sensores en rojo y también se muestra a la leucil-tRNA sintetasa (LRS), que es un sensor citosólico. Estos sensores responden a los insumos de aminoácidos y reclutan y activan a mTORC1 en la superficie del lisosoma. La flecha verde indica la interacción entre PAT1 (SLC36A1) y un supercomplejo de mTORC1, que es menos estable que el que se obtiene con SLC38A9. TSC1/2 inhibe a mTORC1. Modificada de referencia 32.

levadura con rapamicina resulta en un incremento en la acumulación de lípidos vía la formación de triacilglicérols y no de esteróles, que se almacenan en los cuerpos lipídicos (CLs) (Fig. 5) (27).

TORC se regula por aminoácidos

Las células responden a estímulos como la glucosa, el nitrógeno y los aminoácidos, a través de numerosas señales celulares (22). Tanto las células de levaduras como de mamíferos responden al estrés por inanición de aminoácidos a través de la inducción y supresión de diversas vías como la síntesis de proteínas, la duplicación celular y la producción de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En todas estas vías, mTORC1/TORC1 tiene una participación y la falta de aminoácidos causa la inactivación del complejo; además, la eliminación de mTORC1/TORC1 desencadena el proceso de autofagia. En la larva de mosca, la delección de Tor o la falta de aminoácidos estimula la acumulación de CLs (28), semejante a lo que ocurre en *S. cerevisiae*

(27). Los aminoácidos que tienen un efecto activador sobre mTORC1/TORC1 son leucina, arginina y glutamina, y la eliminación o variación en la relación de estos aminoácidos provoca la inactivación de mTORC1/TORC1 (29). Los transportadores de leucina son importantes para activar mTORC1, pero requieren el flujo de la glutamina vía el transportador bidireccional SLC7A5 (Solute Carrier Family 7 Member 5) (Fig. 3) (28). Sin embargo, la vía de señalización desencadenada por los aminoácidos no ha sido completamente elucidada. En las células de mamíferos, el lisosoma está involucrado en la vía de respuesta a los aminoácidos, en donde la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) interactúa con la proteína ragulator en respuesta a la acumulación de aminoácidos en el lumen del lisosoma (Fig. 6). Ragulator se encuentra anclado al lisosoma y funciona como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina que activa a las Rag-GTPasas, lo que resulta en la unión de los complejos Rag y el posterior reclutamiento de mTORC (Fig. 3 y 6). Para la activación de ragulator, la hidrólisis de ATP y la rotación asociada de la V-

ATPasa es esencial (29). La familia Rag-GTPasa se compone de cuatro miembros (RagA, B, C y D) y presentan actividad sólo como heterodímeros (28). El complejo regulador-Rag no activa directamente a mTORC, sólo media la translocación de éste al lisosoma en respuesta al estímulo de los aminoácidos. Una vez en el lisosoma, mTORC1 puede interactuar con su activador, la proteína Rheb (6, 30). La regulación de mTORC1 por aminoácidos es independiente de la vía de PI3K/Akt y del complejo heterodimérico TSC (Fig. 3). Estudios recientes han identificado a SLC38A9 (Solute Carrier Family 38 number 9) como un componente funcional de la maquinaria lisosomal que controla la actividad de mTORC1 en respuesta a los aminoácidos. Éste es un transportador exclusivo de glutamina y arginina, con varios cruces transmembranales que se une al complejo regulador-Rag GTPases en respuesta a los aminoácidos y que estimula la actividad de mTORC1. En la respuesta a la leucina participa una leucil-tRNA sintetasa (LRS), que cataliza la unión de la leucina a su tRNA, el cual se une y regula directamente a RagD, estimulando a mTORC1, mientras que Sestrin 2 inhibe la actividad de mTORC1, figura 6 (29, 31-33).

mTOR como blanco terapéutico

El complejo mTORC1 está involucrado en algunas de las alteraciones metabólicas que favorecen la proliferación celular en células cancerosas, por lo que se ha propuesto como blanco celular para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, como el carcinoma renal. El uso de la rapamicina y de sus análogos, llamados rapálogos, como el temsirolimus, el everolimus y el AP23573, han mostrado ser eficientes contra varios tipos de células tumorales. Sin embargo, tienen efectos secundarios como astenia, náusea, diarrea, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, transaminasas elevadas y trombocitopenia, por lo que su uso debe de estar bajo estricta observación del especialista (34).

En levaduras, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en ratones, la sobre-expresión de mTOR está asociada con un envejecimiento prematuro.

Por otro lado, en un modelo de Alzheimer en ratones, el tratamiento con rapamicina mejoró el déficit cognitivo, debido a un efecto neuroprotector. Puesto que esta enfermedad en humanos es una patología relacionada con la neurodegeneración, y debido a que el envejecimiento es un factor de riesgo en su aparición, se ha propuesto que la inhibición de mTOR podría disminuir el desarrollo de la enfermedad, aunque estos experimentos no se han realizado en humanos. Las implicaciones de los complejos de Tor en el metabolismo celular son amplias y un panorama de los procesos en los que participan se muestra en las figuras 3 y 4 (35).

Conclusión

mTor/Tor es una cinasa que fosforila residuos de serina y treonina, y que está implicada en varios aspectos del metabolismo celular de eucariontes. Funciona como un complejo multiproteico que trabaja a través de numerosas cascadas de señalización, reguladas por nutrientes como los aminoácidos, la glucosa y el oxígeno en las levaduras, y adicionalmente, por factores de crecimiento y hormonas en mamíferos, que se liberan en respuesta al estado nutricional-energético del organismo. Si bien se conocen algunos eventos celulares en los que el complejo participa, el uso de otros modelos celulares permitirá elucidar las otras cascadas de señalización que están conectadas con los complejos de Tor.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para estudios de posgrado (237219) que recibió Lucero Romero Aguilar. Instituto Politécnico Nacional; IPN-SIP- 20170864, 20160999 y CONACyT 256520-GGS. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN222117), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y (CONACyT 254904-JPP).



REFERENCIAS

1. Betz C, Hall MN (2013) Where is mTOR and what is it doing there? *Journal of Cell Biology* 203: 563-574.
2. Weisman R, Cohen A, Gasser SM (2014) TORC2-a new player in genome stability. *Embo Molecular Medicine* 6: 995-1002.
3. Cornu M, Albert V, Hall MN (2013) mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 23: 53-62.
4. Maegawa K, Takii R, Ushimaru T, Kozaki A (2015) Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. *Molecular Genetics and Genomics* 290: 2019-2030.
5. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN (2011) Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 10: 868-880.
6. Groenewoud MJ, Zwartkruis FJT (2013) Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1. *Biochemical Society Transactions* 41: 951-955.
7. Adami A, Garcia-Alvarez B, Arias-Palomo E, Barford D, Llorca O (2007) Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol Cell* 27: 509-516.
8. Loewith R, Hall MN (2011) Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189: 1177-1201.
9. Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolin A (2004) mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res* 50: 545-549.
10. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, et al. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell* 10: 457-468.
11. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 127: 5-19.
12. Laxman S, Tu BP (2011) Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-dependent cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 6: e26081.
13. Gaubitz C, Oliveira TM, Prouteau M, Leitner A, Karuppasamy M, et al. (2015) Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Mol Cell* 58: 977-988.
14. Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, Loewith R (2016) Torc2 Structure and Function. *Trends in Biochemical Sciences* 41: 532-545.
15. Gaubitz C, Oliveira TM, Prouteau M, Leitner A, Karuppasamy M, et al. (2015) Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Molecular Cell* 58: 977-988.
16. Khanna A, Lotfi P, Chavan AJ, Montano NM, Bolourani P, et al. (2016) The small GTPases Ras and Rap1 bind to and control TORC2 activity. *Scientific Reports* 6.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
18. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL (2005) Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 79-+.
19. Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, et al. (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25: 6361-6372.
20. Xiong Y, Sheen J (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol* 164: 499-512.
21. Janes MR, Limon JJ, So LM, Chen J, Lim RJ, et al. (2010) Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nature Medicine* 16: 205-U115.
22. Ikai N, Nakazawa N, Hayashi T, Yanagida M (2011) The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Open Biology* 1.
23. Schneper L, Duvel K, Broach JR (2004) Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7: 624-630.
24. Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771: 255-270.
25. Bozaquel-Morais BL, Madeira JB, Maya-Monteiro CM, Masuda CA, Montero-Lomeli M (2010) A new fluorescence-based method identifies protein phosphatases regulating lipid droplet metabolism. *PLoS One* 5: e13692.
26. Shen Y, Volrath SL, Weatherly SC, Elich TD, Tong L (2004) A mechanism for the potent inhibition of eukaryotic acetyl-coenzyme a carboxylase by soraphen A, a macrocyclic polyketide natural product. *Molecular Cell* 16: 881-891.

27. Madeira JB, Masuda CA, Maya-Monteiro CM, Matos GS, Montero-Lomeli M, et al. (2015) TORC1 Inhibition Induces Lipid Droplet Replenishment in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 35: 737-746.
28. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010) Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Molecular Cell* 40: 310-322.
29. Tan VP, Miyamoto S (2016) Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 95: 31-41.
30. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, et al. (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141: 290-303.
31. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, et al. (2016) METABOLISM Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 351: 43-48.
32. Goberdhan DCI, Wilson C, Harris AL (2016) Amino Acid Sensing by mTORC1: Intracellular Transporters Mark the Spot. *Cell Metabolism* 23: 580-589.
33. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, et al. (2016) The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell* 165: 153-164.
34. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27: 2278-2287.
35. Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 3589-3594.

ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *Escherichia coli**

Andrés González^{1,2,3**} y María F. Fillat^{2,3}

¹Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón). San Juan Bosco 13, 50009 Zaragoza, España.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza.

Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, España.

³Instituto Universitario de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos. Mariano Esquillor, Edificio I + D. Campus Río Ebro, Universidad de Zaragoza. 50018 Zaragoza, España.

**Autor de correspondencia correo E: andresglezrod@gmail.com

RESUMEN

Cantidades significativas de proteínas puras, solubles y biológicamente activas son requeridas de modo creciente tanto en proyectos de investigación como para su empleo con fines terapéuticos, diagnósticos o industriales. La purificación de proteínas a partir de sus fuentes naturales no logra suplir en la mayoría de los casos los requerimientos de cantidad, calidad, facilidad de aislamiento o factibilidad económica del proceso. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante desde mediados de la década de los 70 del pasado siglo marcó el comienzo de la era moderna de la biotecnología. Con los conocimientos actuales en genómica, proteómica y bioinformática, el número de proteínas producidas por vía recombinante se ha incrementado exponencialmente. Dado su rápido crecimiento y altos rendimientos de biomasa en medios relativamente económicos, el amplio conocimiento sobre su fisiología y genética, así como su elevada capacidad de producción de proteínas heterólogas, la enterobacteria *Escherichia coli* continúa siendo el sistema de elección para la expresión recombinante, tanto a escala de laboratorio como en la industria. En el presente trabajo revisamos los aspectos metodológicos más importantes a tener en cuenta para garantizar adecuados niveles de expresión de proteínas recombinantes biológicamente activas, empleando a *E. coli* como organismo hospedero.

ABSTRACT

Large amounts of pure, soluble and biologically active proteins are increasingly required in research projects, diagnosis, therapies and industry. Purification of proteins from natural sources usually fails in guarantee the appropriate amount and quality of these biomolecules, and sometimes diminishes the economic feasibility of the process. The advent of recombinant DNA technology in the mid-1970s marked the beginning of modern biotechnology. Current knowledges in genomic, proteomic and bioinformatics have led to an exponentially increase in recombinant protein production. Due to its fast growth and high cell yields in inexpensive media, its well-characterized genetics and physiology, as well as its high capability for production of heterologous proteins, the enterobacterium *Escherichia coli* remains as the system of choice for the production of recombinant proteins in both on a lab scale and in industry. Here, we review the most relevant methodological aspects to be considered in order to ensure successful expression of biologically active recombinant proteins using *E. coli* as host.

PALABRAS CLAVE:

Escherichia coli, expresión recombinante, optimización, biotecnología, proteínas, bacteria.

KEY WORDS:

Escherichia coli, recombinant expression, optimization, biotechnology, proteins, bacteria.

1. *Escherichia coli*: una biofábrica unicelular de producción de proteínas

El primer aspecto a tener en cuenta para la obtención de una proteína por vía recombinante es la correcta selección del sistema de expresión. Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión que contiene los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción del gen de interés en dicho organismo hospedero. La elección del sistema óptimo de expresión dependerá de diversos factores incluyendo el origen biológico y las propiedades de la proteína de interés, las características de crecimiento del hospedero, los niveles de expresión y la localización celular de la proteína, la existencia de modificaciones postraduccionales y su implicación en la actividad biológica de la proteína, los aspectos regulatorios derivados de su posterior aplicación, así como el costo económico de todo el proceso.

En la actualidad existe una amplia variedad de sistemas de expresión disponibles para la producción a gran escala de proteínas recombinantes (1-12), los cuales se dividen en dos categorías generales: sistemas procarióticos y sistemas eucarióticos. Dentro de los sistemas procarióticos, *Escherichia coli* constituye sin lugar a dudas el hospedero más ampliamente utilizado a nivel de laboratorio y uno de los más importantes a escala industrial, dado el vasto conocimiento que se tiene de su fisiología y genética, lo cual facilita enormemente los trabajos de clonaje y cultivo (1, 13-15). Su alta velocidad de crecimiento y rendimiento celular en medios de cultivo poco costosos, unido a la capacidad de expresar elevados niveles de proteínas heterólogas, en ocasiones hasta un 30% del contenido proteico total, hacen de esta enterobacteria una auténtica biofábrica. Las cepas de *E. coli* utilizadas para la producción recombinante han sido genéticamente manipuladas delecionando los genes implicados en los mecanismos de patogenicidad, por lo cual son consideradas hospederos seguros para la fermentación a gran escala (1). Además de *E. coli*, han sido empleadas con éxito otros hospederos bacterianos para la producción de proteínas recombinantes, incluidos *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces sp*, entre otros (4, 16, 17).

Los vectores de expresión en los sistemas procarióticos comúnmente son vectores plasmídicos obtenidos por manipulación genética y configurados cuidadosamente a fin de asegurar los niveles óptimos de síntesis de la proteína de interés. Todos los vectores de expresión tendrán una arquitectura

esencial con elementos necesarios para su replicación en el hospedero y para la transcripción y traducción del gen clonado. Entre estos elementos se encuentran el origen de replicación, el promotor, el sitio de unión al ribosoma, la secuencia codificadora, terminadores de la transcripción, así como marcadores de resistencia a antibióticos que facilitan la selección de los recombinantes y garantizan la estabilidad del plásmido en el hospedero mediante el cultivo en un medio selectivo (Fig. 1). Adicionalmente, como parte de la estructura del vector podrá encontrarse un gen regulador que actúe directa (unión a operador) o indirectamente sobre el promotor, modulando su actividad y permitiendo condicionar los niveles de expresión según los intereses de síntesis de la proteína en cuestión (4, 15). De la misma forma, el vector de expresión podrá incorporar secuencias específicas de codones en el mismo marco de lectura del gen a expresar, que codifican pequeños péptidos o proteínas de fusión, que como veremos en detalle más adelante podrán cumplir diferentes propósitos.

Los sistemas procarióticos, si resultan satisfactorios, por lo general son los de elección para la mayoría de los propósitos dada su fácil manipulación y relativo bajo costo, aunque en ocasiones presentan serias limitaciones para la producción de proteínas eucarióticas (1, 16, 18-20). Muchas proteínas eucarióticas sufren una gran variedad de eventos postraduccionales tales como formación de puentes disulfuro, glicosilaciones, fosforilaciones, entre otras, las cuales son necesarias para su correcto plegamiento, estabilidad y actividad biológica. En hospederos procariotas no se expresan muchas de estas modificaciones postraduccionales; los puentes disulfuro no se forman debido a que el ambiente intracelular es muy reductor, durante la síntesis no enlazan oligosacáridos a las proteínas ni modifican las tirosinas mediante sulfatación (21, 22).

Por otro lado, en bacterias resulta difícil la secreción al medio extracelular de grandes cantidades de la proteína expresada por vía recombinante, por tal motivo en presencia de altos niveles de expresión resulta frecuente la formación de agregados insolubles en el citoplasma denominados cuerpos de inclusión (21, 23). Para la purificación a partir de estos cuerpos de inclusión es necesario el uso de agente caotrópicos que tienden a desnaturalizar la proteína, siendo necesaria la posterior implementación de técnicas de renaturalización, todo lo cual muchas veces resulta en una considerable pérdida de los rendimientos y un incremento sustancial de los costos de producción (23-25). Aunque muchas proteínas eucarióticas biológicamente activas han sido producidas con éxito en sistemas de expresión procarióticos (18, 20, 26, 27), en ocasiones serán

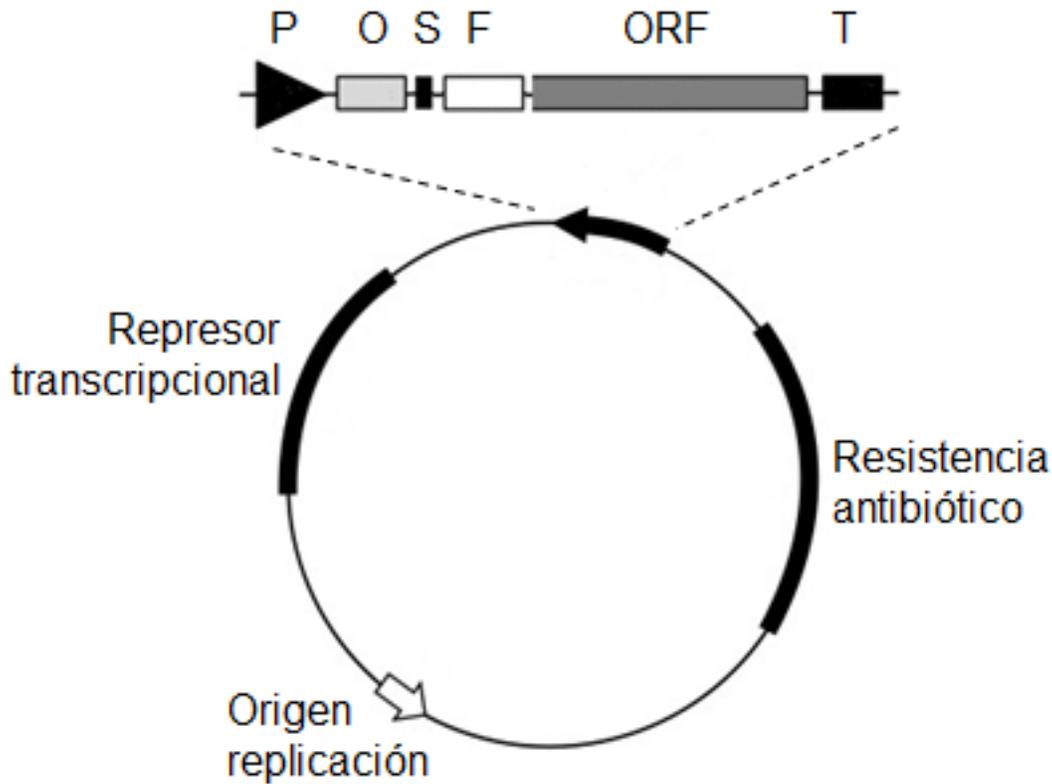


Figura 1. Elementos básicos en la arquitectura de un vector plasmídico empleado para la expresión recombinante en *E. coli*. P: promotor, O: operador, S: sitio de unión al ribosoma, F: secuencia de fusión, ORF: secuencia codificadora del gen de interés, T: terminador.

necesarios sistemas de expresión eucarióticos con vistas a obtener elevados rendimientos de este tipo de proteínas, en especial aquellas que requieren modificaciones postraduccionales para su actividad biológica. Entre los sistemas de expresión eucarióticos más frecuentemente usados en la industria destacan las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* y *Kluyveromyces lactis* (3, 5, 9, 28), pero también son empleados baculovirus/células de insecto (8, 29, 30), células de mamíferos (3, 10, 29), protozoos (31, 32), hongos filamentosos (12) y células de plantas (6, 7, 33). Para la producción recombinante de proteínas integrales de membrana, cuya expresión usualmente resulta altamente tóxica para los hospederos, se han desarrollado sistemas de expresión libres de células (*cell-free expression*), los cuales emplean la maquinaria metabólica de organismos procariotas o eucariotas (2, 11, 34).

2. Factores de interés en el diseño o selección de un sistema de expresión

Como ya hemos comentado, un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un

vector de expresión. La elección de un sistema de expresión recombinante determinado en función de la naturaleza de la proteína de interés no asegurará necesariamente la obtención de proteínas heterólogas funcionales, correctamente plegadas y en cantidades significativas. Muchas veces el hospedero es correcto, pero otros muchos factores atentan contra los niveles de expresión, el plegamiento y la estabilidad de la proteína recombinante.

A pesar del gran número de hospederos y sistemas de expresión desarrollados y utilizados con éxito en los últimos años, *E. coli* continúa siendo la principal herramienta en los laboratorios de genómica y biología molecular, tanto a nivel educacional en nuestras universidades como a nivel investigativo en universidades e instituciones científicas, constituyendo el sistema de expresión más utilizado para la producción de proteínas heterólogas (1, 3, 13). Casi el 80% de las proteínas de estructura tridimensional resuelta, remitidas al PDB (*Protein Data Bank*), han sido obtenidas por vía recombinante utilizando a *E. coli* como hospedero (1, 14). Por tal motivo, dada su gran versatilidad, uso generalizado e importancia como herramienta de trabajo en los estudios de genómica y proteómica a nivel de laboratorio,

centraremos esta revisión en discutir algunos de los aspectos metodológicos más relevantes a tener en cuenta durante la expresión recombinante de proteínas empleando este sistema de expresión.

2.1 Selección de la cepa hospedera

Una correcta selección de la cepa a utilizar para la expresión recombinante repercutirá marcadamente en los rendimientos de proteína obtenidos. Las cepas de expresión deberán carecer de las principales proteasas naturales, mantener la estabilidad del vector de expresión y conferir los elementos genéticos necesarios para una expresión eficiente y regulable. Algunas cepas de *E. coli* empleadas como hospederos para la expresión de proteínas recombinantes pueden contener mutaciones en los genes de determinadas enzimas con actividad disulfuro reductasa para favorecer la formación de puentes disulfuro necesarios para la conformación nativa de la proteína de interés. En otros casos, las cepas hospederas pueden co-expresar chaperonas para favorecer la expresión de proteínas recombinantes solubles y disminuir la formación de cuerpos de inclusión. En la actualidad se dispone de una gran variedad de cepas de *E. coli* comerciales que han sido manipuladas genéticamente para aplicaciones individuales (Tabla 1) (1, 13, 15, 24, 35).

2.2 Diseño óptimo de los vectores de expresión

Los elementos que forman parte del vector de expresión incidirán directamente en la eficiencia de la expresión del gen clonado. Aunque existe una gran variedad de vectores de expresión comerciales (Tabla 2), en muchas ocasiones resulta de interés la creación de un nuevo vector o la modificación de vectores disponibles en el laboratorio, a fin de alcanzar un determinado resultado; en tal caso, un óptimo diseño del vector resultará de vital importancia y se deberá tener en cuenta la no omisión de elementos indispensables para su funcionamiento.

2.2.1 Promotores

La expresión génica está fuertemente regulada a nivel transcripcional por lo que la síntesis del ARN mensajero (ARNm) pudiera considerarse el determinante primario del rendimiento final de la proteína de interés (36). Los niveles de ARNm sintetizado estarán primariamente determinados por las propiedades del promotor utilizado en el vector de expresión. Usualmente se requerirá el uso de promotores fuertes, capaces de conseguir niveles de síntesis proteica entre un 10 y un 30% del contenido proteico total de la célula (1, 37).

El promotor deberá producir un nivel mínimo de transcripción basal y su actividad estará regulada según los intereses de síntesis proteica. La expresión a gran escala de una proteína preferiblemente se buscará con una alta densidad de crecimiento celular y mínima actividad del promotor, seguido por la inducción o desrepresión del promotor. Una fina regulación del promotor resultará esencial para la síntesis de proteínas tóxicas para el hospedero (35). Una inadecuada regulación del promotor podrá causar además inestabilidad del plásmido, disminución de la velocidad de crecimiento del hospedero, formación de cuerpos de inclusión y pérdidas en los rendimientos de la proteína recombinante. Algunos promotores muy fuertes como aquellos de los ARN de transferencia de *E. coli* no son extensivamente utilizados dada su difícil regulación (38).

La inducción del promotor deberá producirse por un mecanismo simple y económicamente práctico. Los promotores más ampliamente utilizados para la expresión recombinante a gran escala en *E. coli* emplean inducción térmica o activadores químicos (4, 14, 37). Los promotores inducibles por isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG) son fuertes, eficientes y ampliamente utilizados a escala de laboratorio, pero su empleo a escala productiva en la síntesis de proteínas terapéuticas para uso humano resulta inadecuado dada su toxicidad (3, 38).

Aunque los promotores procarióticos presentan una región esencial para su funcionamiento, conformada por las secuencias hexaméricas -10 y -35 separadas por 15-19 pb, ha sido demostrado que otros elementos ubicados *upstream* a la secuencia -35 actúan como activadores transcripcionales e influyen decisivamente en la actividad del promotor (39). La exclusión de estos elementos durante el diseño y construcción de un vector de expresión pudiera repercutir desfavorablemente en la transcripción y por ende en los niveles de ARNm y proteína recombinante.

2.2.2 Terminadores de la transcripción

Aunque a menudo son pasados por alto durante el diseño y construcción de un vector de expresión, los terminadores de la transcripción son elementos indispensables dado que cumplen importantes funciones. La transcripción sobre la secuencia de un promotor puede inhibir su función, en un fenómeno conocido como oclusión del promotor (38). Esta interferencia puede ser prevenida con la apropiada ubicación de un terminador de la transcripción al finalizar la secuencia codificadora. De forma similar, la ubicación de un terminador de la transcripción en posición *upstream* al promotor será de utilidad para minimizar transcripciones no deseadas. Las

Tabla 1. Algunas cepas de *E. coli* empleadas comúnmente para la expresión de proteínas recombinantes.

Cepa	Características	Uso recomendado
BL21	<ul style="list-style-type: none"> Deficiente en las proteasas Ion y OmpT. Carece de T7 RNA polimerasa. 	Expresión recombinante de genes bajo control de promotores reconocidos por la RNA polimerasa de <i>E. coli</i> : <i>lac</i> , <i>tac</i> , <i>trc</i> , <i>T5</i> .
BL21(DE3)	Derivada de BL21. Contiene el profago λ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i> , inducible por IPTG.	Expresión recombinante de genes bajo control de promotores T7, T7- <i>lac</i> y promotores reconocidos por la RNA polimerasa de <i>E. coli</i> .
BL21(DE3)pLysS	<ul style="list-style-type: none"> Derivada de BL21. Contiene el profago λDE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i>. Contiene el plásmido pLysS que transporta el gen de la T7 lisozima (LysS), un inhibidor de la T7 RNA polimerasa que previene expresión basal en cultivos no inducidos con IPTG. 	Expresión recombinante con vectores basados en promotores T7, donde se requiera un mayor control de la expresión basal.
BL21(DE3)pLysE	<ul style="list-style-type: none"> Derivada de BL21. Contiene el profago λDE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i>. Contiene el plásmido pLysE, que expresa mayores niveles de T7 lisozima que pLysS. 	Expresión recombinante con vectores basados en promotores T7, donde se requiera un elevado control de la expresión basal. Especialmente recomendada para la expresión de proteínas tóxicas para <i>E. coli</i> .
BL21-SI y BL21-AI	<ul style="list-style-type: none"> BL21-SI deriva de la cepa "salt-inducible" GJ1158. Contiene el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor proU, inducible por la concentración salina del medio. BL21-AI contiene el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor araBAD, inducible por arabinosa. 	Ambas cepas logran un control estricto de la expresión basal de las proteínas recombinantes. Especialmente recomendadas para la expresión de proteínas tóxicas para <i>E. coli</i> .
CD41(DE3) y CD43(DE3)	<ul style="list-style-type: none"> Derivadas de la cepa BL21(DE3). Contiene el profago λDE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i>. Contienen mutaciones no caracterizadas que previenen la muerte celular asociada a la expresión de muchas proteínas recombinantes tóxicas. 	Expresión de proteínas tóxicas y proteínas de membrana de diversos organismos, tanto procariotas como eucariotas, incluyendo insectos, plantas y mamíferos
Rosetta (DE3) y Rosetta 2 (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> Derivadas de BL21. Contienen el profago λDE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i>. Contienen el plásmido pRARE o pRARE2, que transportan los genes para los tRNA de los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA (pRARE) y AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG (pRARE2). 	Expresión recombinante de genes eucarióticos que contienen codones raros para <i>E. coli</i> . Se emplean además para la expresión recombinante de genes de especies procariotas alejadas filogenéticamente de <i>E. coli</i> , que también presenten codones raros.
BL21 CodonPlus y BL21 CodonPlus (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> Derivadas de BL21-Gold Contienen los genes para los tRNA de los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC. 	Expresión recombinante de genes que contienen codones raros para <i>E. coli</i> , tanto procariotas como eucariotas
Origami (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> Derivada de K12. Contiene el profago λDE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i>. Contiene mutaciones en los genes <i>trxB</i> (tioredoxina reductasa) y <i>gor</i> (glutación reductasa), incrementando la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. 	Expresión recombinante de proteínas que requieran la formación de puentes disulfuro para alcanzar su conformación nativa.
ArcticExpress (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> Derivada de BL21-Gold. Contiene el profago λDE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor <i>lacUV5</i>. Contiene los genes de las chaperoninas Cpn10 y Cpn60 de <i>Oleispira antarctica</i>, las cuales comparten gran homología con GroEL y GroES de <i>E. coli</i>, pero son altamente funcionales a bajas temperaturas de cultivo. 	Expresión recombinante de proteínas que tiendan a formar cuerpos de inclusión. La co-expresión de las chaperoninas Cpn10 y Cpn60 unido al cultivo a bajas temperaturas (15-25°C) pueden incrementar significativamente los rendimientos de proteína soluble y biológicamente activa.

Tabla 2. Ejemplos de vectores plasmídicos empleados para la expresión recombinante en *E. coli*.

Vector	Promotor/ repressor	Resistencia	Fusión	Cepa hospedera	Aplicación
pET-28a(+)	T7/LacI	Kanamicina	N-His C-His	BL21(DE3)	Sobreexpresión en citoplasma inducible por IPTG, purificación por IMAC.
pET-20b(+)	T7	Ampicilina	C-His Péptido señal	BL21(DE3)	Sobreexpresión en periplasma inducible por IPTG, purificación por IMAC.
pET-32a(+)	T7/LacI	Ampicilina	N-Trx N-His C-His	Origami(DE3)	Sobreexpresión de proteínas con puentes disulfuro, purificación por IMAC.
pGEX-4T-3	tac	Ampicilina	N-GST	BL21	Purificación por afinidad a glutatión.
pETDuet-1	2×(T7/LacI)	Ampicilina	N-His C-S	BL21(DE3)	Co-expresión de dos proteínas, purificación independiente por IMAC y afinidad a proteína S.

secuencias terminadoras de la transcripción formarán además una estructura secundaria por complementariedad de bases en el ARNm que lo protegerá de la acción de exonucleasas, extendiendo su vida media e incrementando sustancialmente los niveles de proteína producida (14, 38).

2.2.3 Secuencias reguladoras de la traducción

Ubicada en posición *downstream* al promotor se ubica una región denominada sitio de unión al ribosoma (RBS), dentro de la cual se haya una secuencia altamente conservada denominada Shine-Dalgarno (SD) que interactúa por complementariedad con el extremo 3' del ARN ribosomal 16S durante el inicio de la traducción. La distancia entre la secuencia SD y el codón de inicio de la traducción varía entre 5 y 13 nucleótidos e influye en la eficiencia del inicio de la traducción (38). Varios estudios se han llevado a cabo en *E. coli* para determinar la secuencia óptima de nucleótidos de la región SD, así como la distancia más efectiva entre esta región y el condón de inicio. Los resultados demuestran que una región SD con secuencia UAAGGAGG produce de 3-6 veces más proteína que otras secuencias típicas como AAGGA. Por otro lado, cada secuencia SD tendrá un rango de espaciamiento óptimo en relación al codón de inicio, siendo de 4-8 nucleótidos para UAAGGAGG y 5-7 nucleótidos para AAGGA (13). La estructura secundaria del RBS juega un papel crucial en la eficiencia del inicio de la traducción, pudiendo dificultar el acceso del ARNm a la subunidad ribosomal 30S y llegar a inhibir la traducción. El enriquecimiento de esta región con residuos de A/T ha demostrado

incrementar considerablemente la expresión de ciertos genes (38).

El diseño de un vector de expresión frecuentemente incluye la inserción consecutiva de los tres codones de parada (UAA, UGA, UAG) al final de la región de clonaje, a fin de asegurar la terminación de la traducción en cualquiera de los marcos de lectura posibles y prevenir posibles "saltos" del ribosoma. La eficiencia en la terminación varía significativamente con la identidad del nucleótido que precede inmediatamente al codón de parada. La secuencia UAAU es la señal de terminación traduccional más eficiente en *E. coli* (14, 38).

2.2.4 Uso de codones

Aunque el código genético es universal, tanto hospederos procarióticos como eucarióticos harán un uso preferencial de determinados codones sinónimos, lo cual está determinado por la abundancia relativa de los ARN de transferencia (ARNt) complementarios a cada codón. Los codones raros para un determinado hospedero usualmente se encuentran en genes homólogos con un bajo nivel de expresión o genes heterólogos introducidos durante el clonaje. Para *E. coli* pueden constituir fuentes de codones raros algunos genes provenientes de eucariotas, arqueas o incluso eubacterias alejadas filogenéticamente. La expresión de genes con codones raros puede conllevar a errores traduccionales por sustituciones de aminoácidos, disminución de la velocidad de traducción, cambio del marco de lectura e interrupción de la traducción, lo cual resulta frecuente en sistemas de expresión recombinante con genes heterólogos

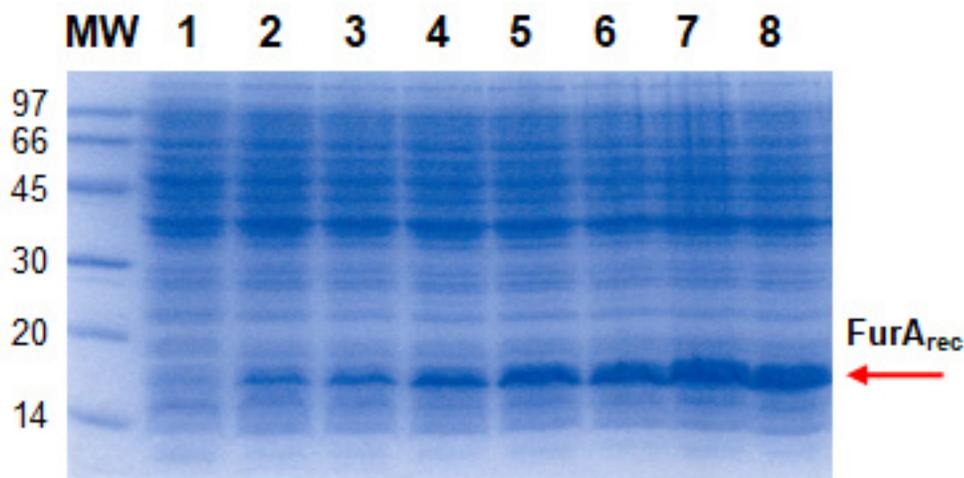


Figura 2. Cambio en el nivel de expresión de la proteína FurA de *Anabaena sp.* PCC 7120 tras 30 min (3), 1 hora (4), 2 horas (5), 4 horas (6), 6 horas (7) y toda la noche (8) de inducción con 1 mM de IPTG. La proteína FurA fue expresada por vía recombinante en *E. coli* BL21(DE3), empleando el vector de expresión pET-28a(+). Los resultados de expresión fueron evidenciados mediante SDS-PAGE (15% acrilamida) y tinción con azul de Coomassie de un extracto soluble de células completas. Como controles se incorporaron en la electroforesis la cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET-28a(+) vacío (1) y la cepa BL21(DE3) con el vector pET-28a-furA sin inducir con IPTG (2). Los pesos moleculares en kDa de un patrón de peso comercial (MW) se indican a la izquierda del gel. La migración electroforética de la proteína FurA recombinante (~17 kDa) se indica a la derecha.

presentando dobletes o tripletes de codones raros (14, 20, 38, 40).

Existen dos estrategias alternativas para remediar la presencia de codones raros en los genes de interés. La primera consiste en mutagénesis dirigida de la secuencia con cambio hacia codones homólogos preferenciales para el hospedero de expresión. La segunda estrategia consiste en la co-transformación del hospedero con un plásmido que porte los genes para los ARNt deficitarios. En la actualidad existen cepas de expresión comerciales (Ej: cepas *Rosetta* de Novagen o *CodonPlus* de Stratagene) que llevan incorporados estos plásmidos con un origen de replicación distinto a los usados en la mayoría de los vectores de expresión, a fin de garantizar la compatibilidad y estabilidad de ambos vectores (Tabla 1).

3. Estrategias de optimización de la expresión recombinante

Una vez elegido el sistema de expresión adecuado resultará de vital importancia la optimización de las condiciones de expresión. Para definir las condiciones óptimas de expresión se realizarán ensayos o "screenings" de expresión, evaluando el grado de expresión de la proteína recombinante, su solubilidad y estabilidad intracelular mediante ensayos rápidos y sencillos, como la electroforesis desna-

turalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (41). Previo a la producción de cultivos de la cepa recombinante a gran escala resultará necesario evaluar diferentes condiciones de expresión empleando varias réplicas de cultivos a pequeños volúmenes, tomando muestras del microorganismo crecido bajo estas condiciones y definiendo el valor óptimo de expresión de la proteína de interés para cada condición en estudio mediante SDS-PAGE (Fig. 2). La optimización de la expresión recombinante incluirá la definición de una estrategia de expresión que garantice el máximo rendimiento y estabilidad de la proteína y facilite en lo posible el posterior proceso de purificación. Algunas de las estrategias a tener en cuenta para optimizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se detallan a continuación.

3.1 Variación de la condiciones de cultivo

El medio de cultivo, las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, aireación) o el sistema de fermentación influirán sensiblemente en la expresión recombinante. Los cultivos discontinuos o *batch* constituyen la forma más simple y generalizada de producción de proteínas recombinantes a escala de laboratorio, en ellos los nutrientes son suministrados solo al inicio del cultivo y existe un limitado control de las condiciones de crecimiento durante el proceso. A medida que se incrementa la densidad

celular los nutrientes disminuyen, disminuye la concentración de oxígeno disuelto, se incrementa la concentración de residuos metabólicos secretados al medio y se pueden producir variaciones apreciables de pH. Las densidades celulares y los niveles de producción recombinante bajo estas condiciones de cultivo son moderadas, aunque suficientes para la mayoría de los trabajos de investigación (24).

Bajo estas condiciones de fermentación se deberá prestar especial atención a la composición del medio de cultivo, la temperatura o el pH, todo lo cual influirá apreciablemente no solo en los niveles de biomasa sino también en los rendimientos de proteína recombinante (38). Aunque el medio Luria-Bertani (LB) pudiera considerarse el más utilizado para el cultivo de *E. coli* a escala de laboratorio y con él se logran obtener altos niveles de expresión, en ocasiones el empleo de un medio más rico en nutrientes como el *Terrific broth* permite obtener los mismos niveles de proteína recombinante con menor volumen de medio (21). La temperatura de cultivo influirá en la actividad de toda la maquinaria metabólica de la célula, incluyendo los mecanismos de transcripción, traducción, proteólisis, expresión y actividad de chaperonas, etc. (24, 38). En muchas ocasiones será recomendable cultivar hasta fase logarítmica a 37°C y luego realizar la inducción de la expresión a 25-30°C, con lo cual se disminuirá la actividad de proteasas, disminuirá la velocidad de síntesis proteica y aumentará la expresión de chaperonas, todo lo cual favorecerá el correcto plegamiento y estabilidad de la proteína recombinante, evitando en muchos casos la formación de cuerpos de inclusión (1).

En la actualidad están siendo introducidas novedosas tecnologías para aumentar la eficiencia de los cultivos e incrementar los rendimientos celulares y los niveles de expresión recombinante sin excesivo costo económico (15).

3.2 Definición de las condiciones óptimas de inducción

Con el fin de garantizar un mayor control de la expresión recombinante, numerosos vectores de expresión incluyen promotores regulables que dirigen la expresión del gen de interés, los cuales contienen secuencias operadoras reconocidas por reguladores transcripcionales muchas veces codificado en el mismo vector de expresión. De esta forma, los reguladores transcripcionales, mayormente represores, bloquean la transcripción del gen clonado en ausencia de una señal inductora. La señal de inducción puede ser un cambio de temperatura, pH o fuerza iónica en el medio de cultivo, aunque en la mayoría de los casos el inductor es un metabolito que se agrega al medio cuando queremos inducir

la expresión recombinante (42). Por ejemplo, en vectores de expresión con promotores reprimidos por el represor LacI del operón lactosa, la adición de un análogo no metabolizable de la lactosa, el IPTG, libera al represor del sitio operador y promueve la transcripción del gen clonado.

En muchos sistemas de expresión basados en el promotor T7, tanto la expresión de la T7 RNA polimerasa como la expresión del gen clonado serán inducidas tras la adición del inductor IPTG (13). En tal sentido, tanto la concentración del inductor como el tiempo de inducción influirán sensiblemente en los niveles de expresión recombinante. Con el uso de promotores fuertes (aquellos con una alta afinidad y estabilidad de unión de la RNA polimerasa, siendo los más empleados para alcanzar altos niveles de expresión recombinante), la adición del inductor supone un incremento sustancial del gasto metabólico de las células hacia la producción de la proteína heteróloga, lo cual ralentizará apreciablemente el crecimiento del microorganismo hospedero. Por tal motivo, la adición del inductor se realizará preferiblemente una vez las células hayan alcanzado la fase exponencial media-tardía del crecimiento (43), momento en el cual los cultivos aún son jóvenes y presentan una alta densidad celular. La adición del inductor en un estadio muy temprano o demasiado tarde en la fase de crecimiento del cultivo repercutirá negativamente en los rendimientos de proteína recombinante.

3.3 Prevención de cuerpos de inclusión

El principal objetivo de la expresión recombinante es usualmente la obtención de grandes cantidades de la proteína de interés en estado nativo y biológicamente activa. Esta estrategia no siempre es aceptada por la maquinaria metabólica de la célula hospedera y puede desencadenar una respuesta de estrés celular caracterizada por la formación de agregados insolubles en el citosol conocidos como cuerpos de inclusión, en los cuales la proteína sintetizada se encuentra solo parcialmente plegada y por tanto biológicamente inactiva (14, 24). Bajo condiciones de biosíntesis normales las proteínas citoplasmáticas pueden adquirir espontáneamente su estructura tridimensional; en otros casos las cadenas polipeptídicas nacientes interactúan reversiblemente con proteínas chaperonas celulares que previenen la agregación y favorecen un correcto plegamiento. La formación de cuerpos de inclusión durante la sobre-expresión de las proteínas recombinantes pudiera ser resultado de la acumulación de altas concentraciones de intermediarios de plegamiento o de un ineficiente procesamiento por las chaperonas celulares (24).

Maximizar la obtención de la proteína recombinante en forma soluble resulta en la mayoría de los casos la solución más atractiva y recomendable. Diversas estrategias han sido desarrolladas para este fin y en la mayoría de los casos buscan evitar, minimizar o resolver la situación de estrés metabólico que ocurre en la célula. El cultivo o inducción a bajas temperaturas, el empleo de cepas mejoradas (Ej: ArcticExpress (DE3), Tabla 1), la modificación de los medios y/o condiciones de cultivo, la co-expresión de chaperonas, el uso de proteínas de fusión (Ej: proteína de unión a maltosa (MBP), *N-utilizing substance A* (NusA) o la disminución del tamaño e hidrofobicidad del fragmento a expresar son algunas de las estrategias más utilizadas para incrementar la solubilidad en la expresión recombinante (24, 43, 44).

Sin embargo, dada la posibilidad de purificación y renaturalización exitosa de algunas proteínas a partir de cuerpos de inclusión, los mismos pueden ofrecer ciertas ventajas en cuanto a facilidad de aislamiento de la proteína, su alta concentración y el alto grado de pureza (1). En ocasiones la formación de cuerpos de inclusión resulta de elección cuando la proteína recombinante activa en el citosol es letal para la célula huésped (38). A pesar de obvias desventajas como la disminución de los rendimientos, la necesidad de optimización de las condiciones de replegamiento, el riesgo de afectación irreversible de la conformación nativa o el encarecimiento del proceso de purificación, varios métodos de aislamiento y renaturalización de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión han sido desarrollados con éxito (23, 25). Adicionalmente, algunos estudios han demostrado actividad catalítica significativa en cuerpos de inclusión de enzimas recombinantes como la β -galactosidasa de *E. coli* y la dihidrofolato reductasa humana (45). En tal sentido, la purificación de cuerpos de inclusión como nanopartículas naturales de enzimas puras biológicamente activas, con una arquitectura porosa y altamente hidratada que permiten una eficiente difusión del sustrato a través de su estructura, tendría una gran aplicabilidad en la industria alimentaria y farmacéutica (45-47).

3.4 Definición de la localización celular

Las proteínas expresadas por vía recombinante en principio pueden ser dirigidas a tres diferentes localizaciones celulares: citoplasma, periplasma y medio extracelular (medio de cultivo). Cada una de estas localizaciones tendrá ventajas y desventajas (4, 14). La expresión y mantenimiento en el citosol es normalmente preferible dados los mayores rendimientos de proteína usualmente obtenidos,

la mayor simplicidad de los vectores de expresión o en algunos casos la ventaja que ofrecen los cuerpos de inclusión formados; sin embargo, en ocasiones resulta de mejor elección la exportación de la proteína hacia el espacio periplasmático o el medio extracelular.

Algunas proteínas no logran recuperar su plegamiento nativo y actividad biológica tras un procedimiento de purificación desnaturante a partir de cuerpos de inclusión. En otros casos el ambiente fuertemente reductor del citoplasma bacteriano impide el correcto plegamiento de proteínas heterólogas cuya estructura terciaria depende apreciablemente de la formación de puentes disulfuro. Por otro lado, la obligada incorporación del codón de inicio de la traducción bacteriana (AUG) y con ello una metionina en el extremo N-terminal de proteínas recombinantes eucarióticas, muchas veces afecta de manera apreciable su conformación, actividad biológica y antigenicidad, obstaculizando en muchos casos la aprobación del uso de estas proteínas no nativas en humanos.

El espacio periplasmático ofrece un ambiente oxidante que favorece la formación de puentes disulfuro, disminuye la posibilidad de degradación proteolítica dado el menor número de proteasas celulares presentes y simplifica la purificación al concentrar el producto deseado en un compartimiento mucho menos rico en proteínas celulares que el citosol. El clivaje *in vivo* del péptido señal durante la translocación al periplasma hace más probable la eliminación de la metionina añadida en proteínas eucarióticas rindiendo un extremo N-terminal nativo (38). La exportación de una proteína heteróloga al periplasma requiere la incorporación de una secuencia señal en el extremo N-terminal del gen clonado. Una gran variedad de péptidos señales procariotas han sido utilizados con éxito (4, 38), sin embargo el proceso de translocación es complejo y la presencia del péptido señal no siempre asegura un transporte eficiente al periplasma, lo cual puede repercutir apreciablemente en los rendimientos obtenidos. Varias estrategias para mejorar la translocación al periplasma han sido descritas (14, 38, 48).

La secreción de la proteína de interés al medio extracelular comparte muchas de las ventajas logradas con la translocación al periplasma y favorece sustancialmente el proceso de purificación para algunas proteínas (49). Por lo general la secreción de la proteína recombinante se logra empleando los sistemas de secreción extracelular existentes en el hospedero para otras proteínas celulares (38, 50, 51). *E. coli* normalmente secreta muy pocas proteínas y sus sistemas de secreción pueden ser ineficientes, los rendimientos de proteína recombi-

nante obtenidos usualmente son modestos, aún con la construcción de proteínas híbridas secretables (13). Otros sistemas de expresión bacterianos como *S. carnosus* o *B. subtilis* son capaces de secretar grandes cantidades de proteína al medio de cultivo favoreciendo su purificación en estado soluble y nativo (4, 51). Sistemas de expresión eucarióticos como levaduras o cultivos de células de mamíferos rinden niveles marcadamente superiores de proteínas recombinantes secretadas al medio, en comparación con los hospederos bacterianos (3).

3.5 Generación de proteínas de fusión

Una proteína de fusión o proteína quimérica consiste en la unión de una corta secuencia de aminoácidos, polipéptido o proteína a la proteína que se quiere expresar por vía recombinante a través de un sitio de reconocimiento a proteasas específicas que posteriormente facilitan la separación de nuestra proteína. Usualmente esta fusión se construye a nivel de ADN y la quimera se transcribe y expresa como una sola entidad dentro de la célula. Esta estrategia se utiliza con frecuencia para facilitar el proceso de purificación, favorecer el plegamiento, incrementar la solubilidad y prevenir cuerpos de inclusión, disminuir la degradación proteolítica, dirigir la translocación a periplasma y en algunos casos ha logrado incrementar los rendimientos de proteína recombinante desde niveles no detectables hasta casi el 20% del contenido proteico celular (14, 19, 48, 52-54).

Han sido desarrollados una amplia variedad de patrones de proteínas de fusión. La fusión de una cola de poli-histidinas o de la glutatión S-transferasa permite la purificación por afinidad de la proteína recombinante mediante protocolos rápidos y altamente eficientes, para lo cual existen vectores de clonaje específicos y resinas cromatográficas comerciales (55). La fusión con las proteínas MBP o NusA de *E. coli* incrementan considerablemente la solubilidad y son especialmente recomendadas para evitar o disminuir la formación de cuerpos de inclusión (14). La fusión a SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), una pequeña proteína de unos 100 residuos altamente conservada en eucariotas, ha logrado incrementar considerablemente los niveles de expresión y la solubilidad en hospederos procariotas (54). La incorporación del péptido señal de numerosas proteínas procarióticas permite dirigir la translocación hacia periplasma (19, 49, 51). Varios estudios han demostrado que los altos niveles de expresión de una proteína homóloga dada pueden ser transferidos a una proteína heteróloga

pobremente expresada con la fusión del extremo N-terminal de aquella, quizás como resultado de una estabilización del ARNm (14).

3.6 Prevención de la proteólisis

La proteólisis es un proceso selectivo y altamente regulado que juega un importante papel en la fisiología celular. *E. coli* contiene un gran número de proteasas localizadas en el citoplasma, periplasma y membranas interna y externa, que participan en actividades metabólicas y en la selectiva eliminación de proteínas anormales. La maquinaria proteolítica actúa como consecuencia de una gran variedad de condiciones tales como síntesis incompleta, mutaciones por sustitución de aminoácidos, síntesis excesiva de subunidades de complejos multiméricos, daño postraducciona por oxidación o ataque de radicales libres, etc. (38). En principio, una proteína heteróloga podría fácilmente ser reconocida como anormal y ser degradada por la célula, de hecho en muchos casos la degradación proteolítica disminuye apreciablemente los rendimientos de proteína recombinante.

Varias estrategias han sido aplicadas a fin de minimizar la degradación proteolítica durante la expresión recombinante tales como el empleo de cepas deficientes de proteasas (*E. coli* BL21 es deficiente de las proteasas Ion y OmpT) (Tabla 1), construcción de proteínas de fusión, translocación fuera del citosol, crecimiento o inducción a bajas temperaturas (la mayoría de las proteasas tienen su actividad óptima a 37°C), co-expresión con chaperonas, sustitución de aminoácidos específicos en el sitio de clivaje de la proteasa, optimización de las condiciones de fermentación, entre otras (14, 38, 56).

3.7 Co-expresión de proteínas

Ha sido comentado con anterioridad las ventajas de la co-expresión de chaperonas para incrementar la estabilidad conformacional y solubilidad de la proteína de interés o prevenir su degradación proteolítica. En otros casos resulta igualmente conveniente la expresión simultánea de dos o más proteínas clonadas en el mismo vector de expresión o en vectores compatibles diferentes. Tal es el caso de la síntesis recombinante de complejos proteicos con varios componentes o subunidades. La co-expresión de varios componentes a menudo resulta en un incremento de la estabilidad conformacional de cada componente, protegiéndose en ocasiones mutuamente de la degradación proteolítica del hospedero (21, 57, 58). El empleo de vectores policistronicos ha permitido expresar con

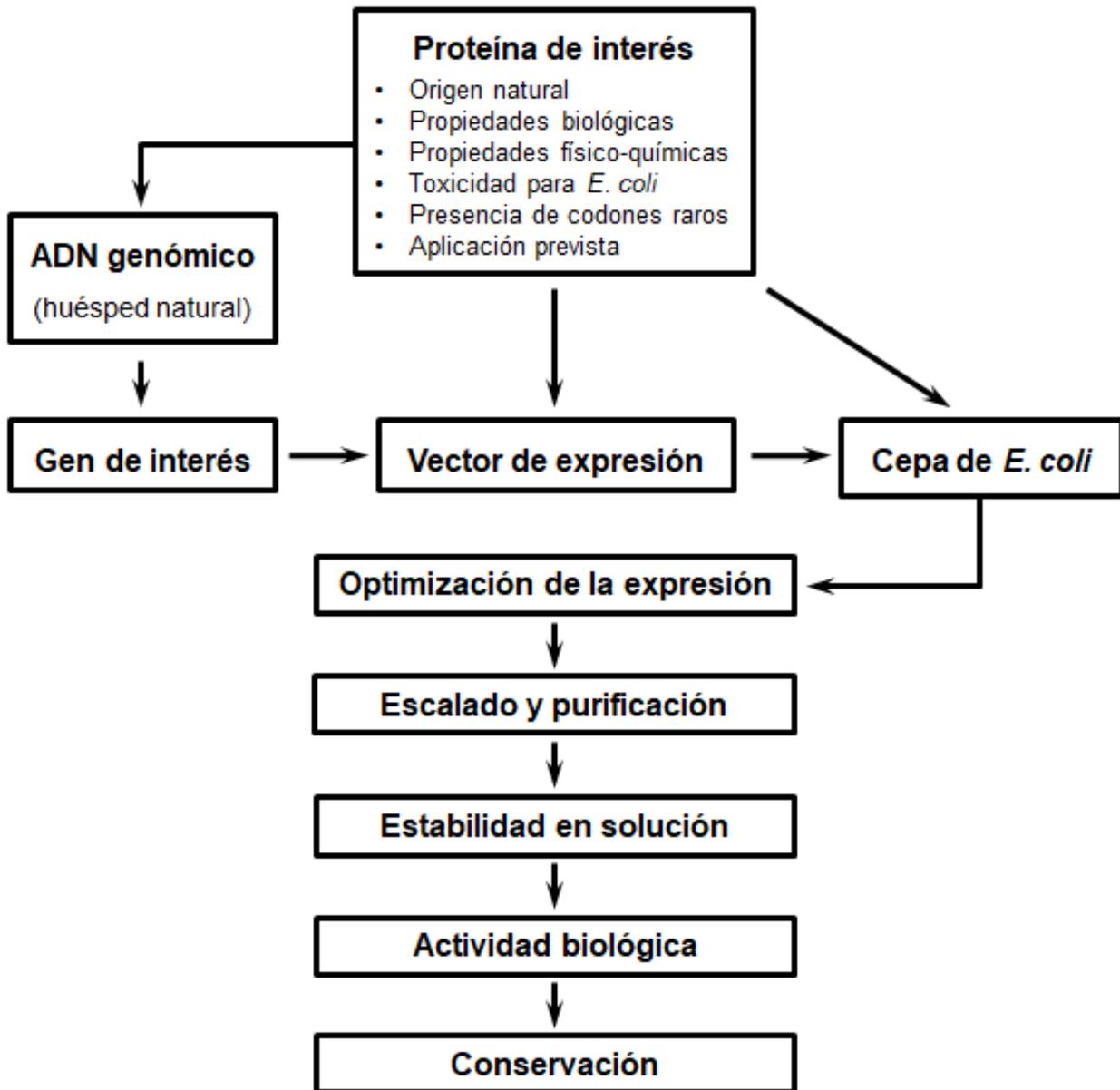


Figura 3. Flujograma de los aspectos metodológicos a tener en cuenta para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

éxito más de dos genes clonados en un mismo vector y complejos binarios y ternarios. El empleo de vectores compatibles diferentes requerirá no solo orígenes de replicación diferentes sino también marcadores de selección diferentes a fin de garantizar la adecuada estabilidad de cada vector (14, 59). Sistemas comerciales de co-expresión consistentes en 4 vectores bicistrónicos diferentes, todos con orígenes de replicación y marcadores de selección diferentes, permiten la expresión simultánea en un mismo hospedero de hasta 8 proteínas diferentes (58).

3.8 Tolerancia o disminución de la toxicidad al hospedero

La expresión recombinante de algunos genes heterólogos puede resultar extremadamente tóxica para el hospedero, interfiriendo con su fisiología y originando una afectación significativa del crecimiento e incluso la muerte del cultivo. La toxicidad de estos genes puede variar desde moderada hasta muy elevada, dependiendo del nivel de expresión y por consiguiente, la cantidad de proteína recombinante que es capaz de interferir con la fisiología

del hospedero y causar afectación del crecimiento o la muerte. Varias estrategias son empleadas para lograr expresar y producir estas proteínas tóxicas, entre ellas el empleo de promotores altamente regulados, la selección de cepas hospederas más resistentes al producto potencialmente tóxico, el empleo de promotores antisentido, la generación de proteínas de fusión que neutralicen la toxicidad, utilización de vectores de bajo número de copias, empleo de sistemas de expresión libres de células, entre otras (2, 35, 60).

4. Conclusiones

La producción de proteínas por vía recombinante ofrece una vía simple, rápida, económicamente rentable y altamente eficiente para suplir los actuales requerimientos de proteínas puras y biológicamente activas, tanto para fines de investigación como para usos terapéuticos o industriales. La selección del sistema de expresión apropiado dependerá del origen y propiedades biológicas de la proteína, las características del hospedero, la futura aplicación de la proteína, entre otros factores (Fig. 3). En los últimos años ha sido desarrollada una gran variedad de sistemas de expresión recombinante basados en hospederos procarióticos, levaduras, hongos filamentosos, protozoos, baculovirus/células de insectos, células de plantas o células de mamíferos.

Sin embargo, *E. coli* continúa siendo el hospedero de elección para la producción de proteínas recombinantes dadas sus reconocidas ventajas. Esta bacteria es empleada con éxito en la actualidad para la producción de proteínas humanas con fines terapéuticos (61).

A pesar del desarrollo de diversos sistemas de expresión y del considerable avance en las tecnologías de expresión y purificación, en muchas ocasiones resulta imprescindible la aplicación de estrategias de optimización de la expresión recombinante, a fin de garantizar un adecuado rendimiento y estabilidad de las propiedades biológicas de la proteína. El empleo de las cepas hospederas adecuadas, el diseño óptimo de los vectores de expresión, la variación de las condiciones de crecimiento o la generación de proteínas de fusión son algunas de las estrategias más utilizadas para lograr alcanzar los estándares de rendimiento y calidad esperados. Una vez optimizada la expresión recombinante empleando el sistema de expresión apropiado, se procederá al escalado del cultivo a grandes volúmenes y la purificación de la proteína de interés. Estudios adicionales podrán ser necesarios con vistas a optimizar las condiciones *in vitro* (pH, fuerza iónica, composición del solvente, crioprotectores) que garanticen la estabilidad físico-química y actividad biológica de la proteína una vez purificada. 

REFERENCIAS

- Jia B, Jeon CO (2016) High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol* 6: 160196.
- Klammt C, Schwarz D, Lohr F, Schneider B, Dotsch V, Bernhard F (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J* 273: 4141-4153.
- Schmidt FR (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 363-372.
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 211-222.
- Martinez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J (2012) Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Curr Opin Biotechnol* 23: 965-971.
- Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* 5: 2-15.
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv* 27: 449-467.
- Jarvis DL (2009) Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol* 463: 191-222.
- Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* 463: 169-189.
- Lalonde ME, Durocher Y (2017) Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* 251: 128-140.
- Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S (2015) Cell-free protein synthesis: pros and

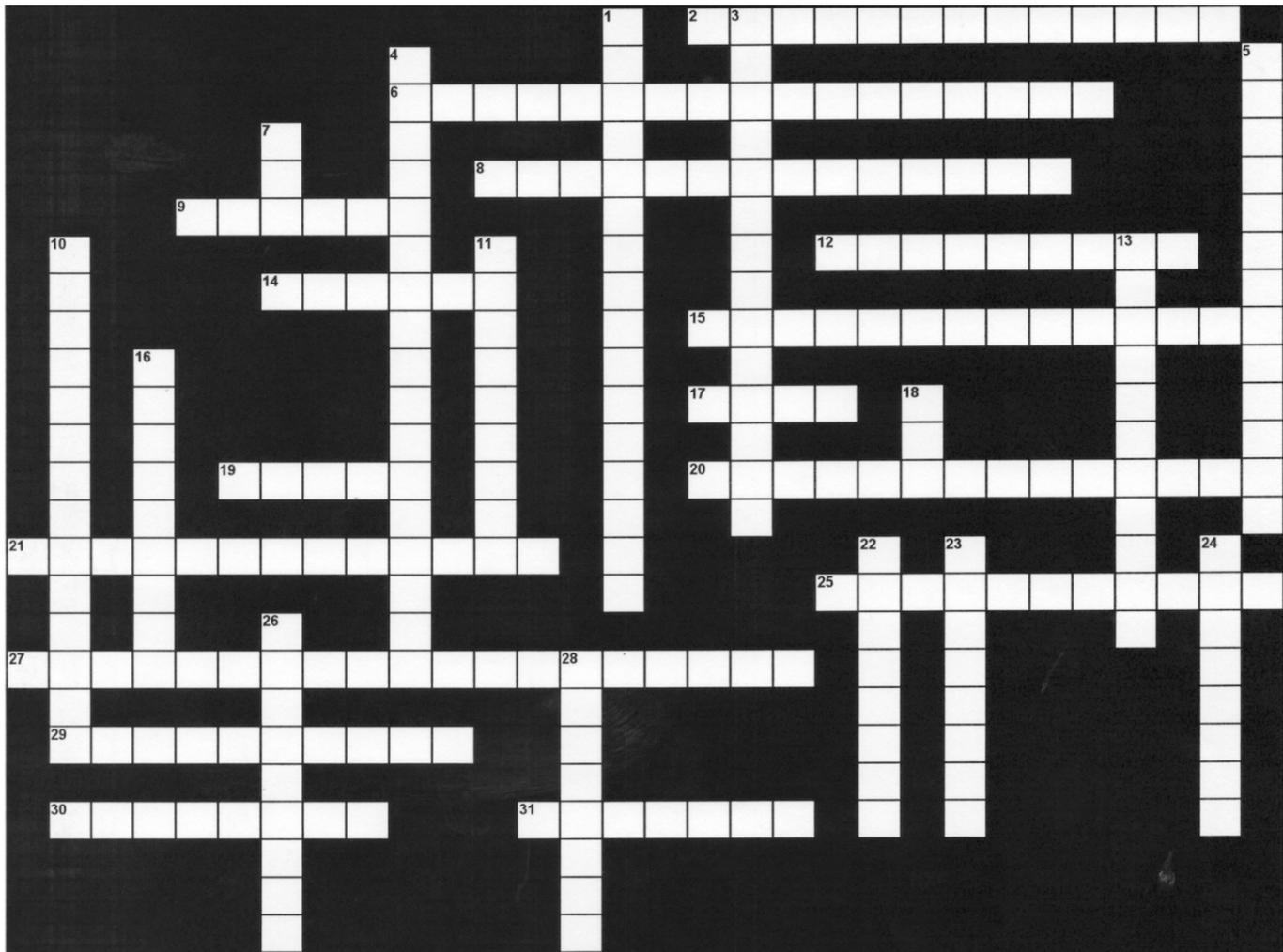
- cons of prokaryotic and eukaryotic systems. *Chembiochem* 16: 2420-2431.
12. Gomez S, Lopez-Estepa M, Fernandez FJ, Suarez T, Vega MC (2016) Alternative eukaryotic expression systems for the production of proteins and protein complexes. *Adv Exp Med Biol* 896: 167-184.
 13. Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5: 172.
 14. Sorensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115: 113-128.
 15. Peti W, Page R (2007) Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr Purif* 51: 1-10.
 16. Zerbs S, Frank AM, Collart FR (2009) Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods Enzymol* 463: 149-168.
 17. Chen R (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv* 30: 1102-1107.
 18. Fedulova N, Hanrieder J, Bergquist J, Emren LO (2007) Expression and purification of catalytically active human PHD3 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 54: 1-10.
 19. Jeiranikhameneh M, Moshiri F, Keyhan Falasafi S, Zomorodipour A (2017) Designing signal peptides for efficient periplasmic expression of human growth hormone in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 27: 1999-2009.
 20. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307: 249-264.
 21. Hunt I (2005) From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr Purif* 40: 1-22.
 22. Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27: 297-306.
 23. Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99: 303-310.
 24. Sorensen HP, Mortensen KK (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4: 1.
 25. Burgess RR (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol* 463: 259-282.
 26. Krishnan B, Hedstrom L, Hebert DN, Gierasch LM, Gershenson A (2017) Expression and purification of active recombinant human alpha-1 antitrypsin (AAT) from *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 1639: 195-209.
 27. Ma Y, Yu J, Lin J, Wu S, Li S, Wang J (2016) High efficient expression, purification, and functional characterization of native human epidermal growth factor in *Escherichia coli*. *Biomed Res Int* 2016: 3758941.
 28. Wang M, Jiang S, Wang Y (2016) Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered* 7: 155-165.
 29. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23: 567-575.
 30. Kost TA, Kemp CW (2016) Fundamentals of baculovirus expression and applications. *Adv Exp Med Biol* 896: 187-197.
 31. Niimi T (2012) Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. *Methods Mol Biol* 824: 307-315.
 32. Niimi T (2016) *Leishmania tarentolae* for the production of multi-subunit complexes. *Adv Exp Med Biol* 896: 155-165.
 33. Ahmad A, Pereira EO, Conley AJ, Richman AS, Menassa R (2010) Green biofactories: recombinant protein production in plants. *Recent Pat Biotechnol* 4: 242-259.
 34. Thoring L, Dondapati SK, Stech M, Wustenhagen DA, Kubick S (2017) High-yield production of "difficult-to-express" proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. *Sci Rep* 7: 11710.
 35. Saida F, Uzan M, Odaert B, Bontems F (2006) Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr Protein Pept Sci* 7: 47-56.
 36. Browning DF, Busby SJ (2016) Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14: 638-650.
 37. Tegel H, Ottosson J, Hober S (2011) Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *FEBS J* 278: 729-739.
 38. Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60: 512-538.
 39. Estrem ST, Ross W, Gaal T, Chen ZW, Niu W, Ebright RH, Gourse RL (1999) Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev* 13: 2134-2147.

40. Kane JF (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6: 494-500.
41. Brunelle JL, Green R (2014) One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol* 541: 151-159.
42. Balbas P (2001) Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* 19: 251-267.
43. Galloway CA, Sowden MP, Smith HC (2003) Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques* 34: 524-526, 528, 530.
44. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L (2014) Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol* 5: 63.
45. Garcia-Fruitos E, Gonzalez-Montalban N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Aris A, Ventura S, Villaverde A (2005) Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact* 4: 27.
46. Nahalka J (2008) Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus* and its application in a process of batch starch degradation to alpha-D-glucose-1-phosphate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 219-223.
47. Villaverde A, Corchero JL, Seras-Franzoso J, Garcia-Fruitos E (2015) Functional protein aggregates: just the tip of the iceberg. *Nanomedicine (Lond)* 10: 2881-2891.
48. Malik A (2016) Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*. *3 Biotech* 6: 44.
49. Choi JH, Lee SY (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 625-635.
50. Zhou Y, Lu Z, Wang X, Selvaraj JN, Zhang G (2018) Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 1545-1556.
51. Albinia AM, Matos CF, Branston SD, Freedman RB, Keshavarz-Moore E, Robinson C (2013) High-level secretion of a recombinant protein to the culture medium with a *Bacillus subtilis* twin-arginine translocation system in *Escherichia coli*. *FEBS J* 280: 3810-3821.
52. Ryan DP, Tremethick DJ (2016) A dual affinity-tag strategy for the expression and purification of human linker histone H1.4 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 120: 160-168.
53. Malhotra A (2009) Tagging for protein expression. *Methods Enzymol* 463: 239-258.
54. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 43: 1-9.
55. Zhao X, Li G, Liang S (2013) Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *J Anal Methods Chem* 2013: 581093.
56. Rozkov A, Enfors SO (2004) Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89: 163-195.
57. Busso D, Peleg Y, Heidebrecht T, Romier C, Jacobovitch Y, Dantes A, Salim L, Troesch E, Schuetz A, Heinemann U, Folkers GE, Geerlof A, Wilmanns M, Polewacz A, Quedenau C, Bussow K, Adamson R, Blagova E, Walton J, Cartwright JL, Bird LE, Owens RJ, Berrow NS, Wilson KS, Sussman JL, Perrakis A, Celie PH (2011) Expression of protein complexes using multiple *Escherichia coli* protein co-expression systems: a benchmarking study. *J Struct Biol* 175: 159-170.
58. Diebold ML, Fribourg S, Koch M, Metzger T, Romier C (2011) Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: application to complexes as large as the histone octamer. *J Struct Biol* 175: 178-188.
59. Haffke M, Marek M, Pelosse M, Diebold ML, Schlattner U, Berger I, Romier C (2015) Characterization and production of protein complexes by co-expression in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 1261: 63-89.
60. Schwarz D, Dotsch V, Bernhard F (2008) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics* 8: 3933-3946.
61. Kamionka M (2011) Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Curr Pharm Biotechnol* 12: 268-274.

CRUCIBIOQ[®]

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

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



HORIZONTALES

2 Un gen defectuoso del cromosoma X permite que la enzima α -_____ (α -GAL) que metaboliza a la globotriosilceramida (GL-3) se produzca en menor cantidad, lo que ocasiona que este lípido se acumule en los lisosomas

dando lugar a la enfermedad de Fabry que en su forma leve afecta al sistema cardiovascular, cerebrovascular o renal y en su forma grave es progresiva, destructiva y potencialmente mortal; la incidencia en Estados Unidos es de 1 en 40,000 varones.

6 Es la enzima que hidroliza a los triacilglicérolos de los quilomicrones y de las VLDL, la deficiencia de esta enzima ocasiona un cuadro que cursa con la elevación de quilomicrones

y VLDL en la sangre. Se presenta con cólicos infantiles, hepatomegalia, esplenomegalia, dolor muscular y pancreatitis entre otros. El tratamiento consiste en proporcionar una dieta baja en grasas, lo cual permite que estos pacientes puedan llegar a la edad adulta.

- 8** En el cuadro patológico conocido como leucodistrofia metacromática, hay un déficit de la aril sulfatasa o proteína activadora de los _____, debido a que hay acumulación de cerebrosidos en el sistema nervioso central, en el riñón y en los nervios periféricos, lo que ocasiona retraso intelectual principalmente.
- 9** La xantomatosis cerebrotendinosa es una enfermedad ocasionada por déficit de la enzima 7 hidroxilasa que altera la síntesis de ácido _____ y quenodesoxicólico en el hígado, permitiendo que el colestanol se almacene en algunos tejidos, entre otros en el cerebro; puede dar lugar a cataratas, daño neurológico, disminución de capacidades intelectuales y epilepsia, entre otras
- 12** Son orgánulos celulares que poseen una gran cantidad de enzimas cuya función es la de digerir y eliminar los residuos que la célula ya no necesita, cuando hay falla en la existencia de alguna de esas enzimas, se producen enfermedades que en algunos casos son mortales.
- 14** La deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de _____ larga es una enfermedad autosómica recesiva, causada por mutaciones en el gen *HADHA* que impide que algunas grasas sean susceptibles de producir energía, principalmente en los periodos de ayuno. En la infancia se presenta con dificultades en la alimentación, hipoglucemia, hipotonía; en los adultos pueden tener problemas respiratorios, coma y muerte súbita; el tratamiento de por vida es disminuir los ácidos grasos de esa longitud y de preferencia evitar el ayuno.
- 15** La enfermedad de Tay-Sachs es ocasionada por aumento del gangliósido G_{M2} dentro de los lisosomas debido a la deficiencia de la enzima lisosomal _____ A, que es la encargada de su degradación, la acumulación de este gangliósido en las células cerebrales ocasiona la degradación del sistema nervioso central. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva rara y mortal, más común en descendientes de judíos asquenazí.
- 17** Durante el _____ diabético hay una secreción deficiente de insulina al mismo tiempo que una oxidación elevada pero incompleta de ácidos grasos, como consecuencia el pH sanguíneo baja debido a la alta concentración de cuerpos cetónicos.
- 19** El fitánico es un _____ graso saturado de cadena ramificada (3,7,11,15, tetrametilhexadecanoico) se ingiere en la dieta cárnica proveniente de rumiantes y de pescados; la enfermedad de Refsum es autosómica recesiva que se caracteriza por la deficiencia de la fitanoil-CoA hidroxilasa localizada en los peroxisomas, lo que permite su acumulación en sangre y en los tejidos, ocasiona problemas neurológicos, alteraciones musculares, circulatorias, lesiones en la retina con pérdida de la visión nocturna.
- 20** Con este término se designan a una serie de patologías con características propias, en la del tipo I, el nivel de colesterol se encuentra entre 300 y 800 mg/dl ocasionado por un aumento de las VLDL en plasma que puede deberse a una hidrólisis defectuosa de los triacilglicérols o sobreproducción del esteroide; generalmente se desarrolla como resultado de la diabetes mellitus, abuso de la ingesta de etanol u obesidad.
- 21** Son partículas de estructura globular constituidas por lípidos no polares, en su interior, poseen una cubierta formada por proteínas, fosfolípidos y colesterol, tienen la función de transportar por vía sanguínea a los lípidos entre los tejidos; se clasifican en de: alta (HDL), baja (LDL), intermedia (IDL) y muy baja (VLDL) densidad.
- 25** En el síndrome metabólico la obesidad está relacionada con la _____ a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, hiperinsulinemia e hipertensión arterial.
- 27** Así se designa al aumento del esteroide que es precursor de hormonas sexuales, corticosteroides, mineralocorticoides, ácidos biliares y vitamina D; este cuadro está relacionado con múltiples patologías, como daño a las arterias coronarias, angina de pecho; aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, entre otras.
- 29** La herencia _____ recesiva se produce cuando ambos padres transmiten una copia de un gen defectuoso sin que ellos padezcan el trastorno; la enfermedad de Niemann-Pick que es debida a un error genético, permite que se acumulen grasas y colesterol en las células de hígado, médula ósea, bazo, pulmones y en ocasiones cerebro; la afectación neurológica conduce a parálisis ocular, nubosidad corneal, degeneración cerebral, problemas de aprendizaje, entre otros; se ha estudiado cuatro categorías A, B, C y D; la más grave

es la del tipo A que se presenta en el recién nacido y el infante difícilmente sobrevive más allá de los 18 meses.

- 30** Con este término se identifica a la obesidad más frecuente en los varones y consiste en un mayor cúmulo de grasa arriba de la cintura; se ha considerado como predisponente de colelitiasis, hipertensión arterial, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares.
- 31** La leucodistrofia de las células globoides es un trastorno autosómico recesivo, que es responsable de una deficiencia de la galactosilceramidasa lo que conduce a la acumulación de grasas no digeridas que alteran el crecimiento de la vaina de _____ que recubre a los nervios; debido a ello hay una grave degeneración de aptitudes motoras y mentales.

VERTICALES

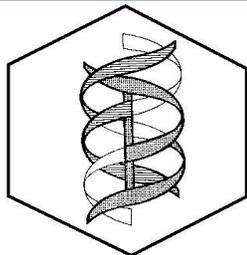
- 1** Algunos de los problemas _____ relacionados con la obesidad son: insuficiencia cardíaca, tromboflebitis, angina de pecho, hipertensión arterial e infarto al miocardio.
- 3** Cuadro en el que se presenta acumulación de moléculas de lípidos complejos, proteínas, carbohidratos y sangre con todos sus componentes que conducen a la formación de tejido fibroso y calcificación debajo del revestimiento interno de la pared arterial, lo que conduce a la reducción de su elasticidad y disminución del paso de luz y posible oclusión.
- 4** La enfermedad de Gaucher es una lipodosis autosómica recesiva que se presenta debido a un defecto en la síntesis de β -glucosidasa, una enzima que se produce en el bazo e hidroliza a los _____; los síntomas son agrandamiento de bazo e hígado, trastornos en el músculo esquelético, complicaciones neurológicas, anemia y susceptibilidad a las infecciones. Hay tres tipos dentro de las cuales el número 2 es la neuropática infantil aguda, generalmente ocasiona la muerte del infante a temprana edad, mientras que las del tipo 1 y 3 pueden tratarse con reemplazo de la enzima.
- 5** Un valor próximo al 3% de los casos de obesidad se debe a un daño endocrinológico el cual puede ocasionarse por lesiones _____, hipotiroidismo, ovario poliquístico, síndrome de Cushing o hipogonadismo.
- 7** Siglas de la lipoproteína de alta densidad, tiene un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares ya que es la encargada de retirar al colesterol de las arterias y llevarlo a través del torrente sanguíneo al hígado para su degradación.
- 10** La enfermedad de Niemann-Pick es una enfermedad genética que ocasiona el cúmulo de _____ en los tejidos, debido a la falta de la enzima que la degrada, las consecuencias son hepatoesplenomegalia, retraso mental, daño neurológico y muerte temprana.
- 11** La deficiencia de la enzima que permite que la _____ realice el transporte de los ácidos grasos de cadena larga del citosol a la matriz mitocondrial es causada por una mutación genética; esta falla puede presentarse en recién nacidos o en niños mayores, la forma más grave es la primera ya que hay hipoglucemia, niveles altos de cuerpos cetónicos y amoniaco, hepatomegalia, ritmo cardíaco anormal y en ocasiones muerte súbita.
- 13** Hormona mineralocorticoide producida por las glándulas suprarrenales, cuando su concentración es elevada induce una mayor retención renal de agua y sodio -que provoca hipertensión arterial- y una disminución de la concentración de potasio en sangre lo que ocasiona la presencia de calambres musculares, arritmias cardíacas. El tratamiento más adecuado de este cuadro conocido como síndrome de Conn, es la utilización de fármacos antagonistas de los receptores de la hormona, los cuales bloquean su acción y mejoran los síntomas.
- 16** Así se designa a la obesidad frecuentemente presentada en el sexo femenino y consiste en el cúmulo de grasa en el vientre, caderas y muslos.
- 18** Siglas de la lipoproteína de baja densidad que tiene la característica de transportar al colesterol a la intima de las arterias, lo que contribuye a la formación de las placas ateromatosas.
- 22** La enfermedad de Tangier es de naturaleza _____ y se caracteriza por una disminución muy grande de lipoproteínas de alta densidad y de colesterol en el plasma al mismo tiempo que hay acumulación de colesterol esterificado en diversos tejidos, entre otros el nervioso.
- 23** En los individuos con esta enfermedad del tipo II, presentan resistencia a la insulina, en esta patología los niveles de glucosa en sangres no son muy elevados.
- 24** El llamado _____ antifosfolípido se caracteriza por trombosis, trombocitopenia y riesgo de pérdida fetal; se plantea que la trombosis

es ocasionada porque los anticuerpos inhiben las reacciones de la cascada de coagulación catalizada por fosfolípidos

- 26** Células de la fórmula blanca de la sangre que emigran hacia la pared arterial y en su interior se transforman en células espumosas que acumulan grasa ocasionando un engrosamiento llamado placa aterosclerótica, la cual además contiene colesterol, células musculares lisas y del tejido conjuntivo.

- 28** Esta enfermedad -a excepción de la ocasionada por daño endocrinológico- se desarrolla debido a que la cantidad de energía que se ingiere con los alimentos es superior a la que se gasta; las repercusiones de este cuadro son: disminución de la esperanza de vida, factor de riesgo diabetogénico y cardiovascular, hipertensión arterial, hiperlipemia y posible cáncer de colon, de recto, de la próstata en el varón y de vesícula, del ovario y de la mama en la mujer, entre otras patologías

LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.



CONVOCA AL XXVI CONGRESO

11 y 12 de junio de 2018
SEDE

Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria. Cd. de México



Facultad de Medicina



<https://www.google.com.mx/search?hl=es419&source=hp&biw=&bih=&q=FOTOGRAF+IAS+UNAM+MEDICINA>

Auditorio “Fernando Ocaranza “



Horario: lunes y martes de 9:00 a 14:00 hrs. Y+ 16:00
a 19:00 horas

En busca de fortalecer la enseñanza de la Bioquímica y compartir experiencias docentes, este Congreso se realiza en la Facultad de Medicina de la UNAM con el apoyo del Departamento de Bioquímica. El eje temático central es “Evaluación y enseñanza de la Bioquímica”, integrando participaciones en las que la academia nacional comparta sus experiencias educativas.

BASES

1.-Podrán participar profesores(as) que imparten Bioquímica o áreas afines del nivel medio, medio superior, superior y posgrado, además de alumnos en grupo de trabajo presidido por profesor(es) participante(s).

2.-Los trabajos a exponer deberán ser propuestas de aspectos pedagógicos sobre los aprendizajes o contenidos de planes y programas de asignatura, asociados con la realización de actividades frente a grupo, teóricas, experimentales, metodologías de aprendizaje, evaluación, planeación educativa, resultados educativos, competencias, materiales didácticos, tesis, investigación educativa, entre otras.

3.-Cada trabajo a participar tendrá **un autor** y hasta **3 coautores**, mismos que serán considerados como participantes y deberán inscribirse al **Congreso** y asistir, otorgándose los reconocimientos personales respectivos como ponentes y asistentes, siempre y cuando se cumpla con los requisitos de pago de inscripción al Congreso.

4.-La participación puede ser como ponente-asistente o bien únicamente como asistente, existiendo dos opciones para realizar su pago, (en donde la primera es obligatoria para los ponentes).

5.-Para participar como ponente, se deberá enviar a más tardar el **30 de abril de 2018:**

a.- El resumen del trabajo a presentar a la dirección electrónica

asoc.mex.prof.bq@gmail.com elaborado de acuerdo al formato indicado en esta convocatoria (punto 7). El número máximo de trabajos por participante es de 5.

b.-Escaneo del pago realizado en el banco a la cuenta de la AMPB A.C.

PAGO DE INSCRIPCIÓN AL CONGRESO

A. CON ANTICIPACIÓN para registro y programación de trabajo a presentar en el Congreso

- Depósito bancario de \$1000.00 (un mil pesos 00/100 MN) por profesor participante y asistente.

- Depósito Bancario de \$500.00 peso00/100 MN para alumno participante y asistentes.

BANCO: Sucursal Bancomer al número de cuenta: **0133718123** a nombre de la **Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A.C.** Enviar copia del documento emitido por banco al hacer el depósito, a la dirección electrónica asoc.mex.prof.bq@gmail.com **ESTO ES UN REQUISITO para enviarle la carta de aceptación.** (Conservar el documento original para presentarlo al inicio del Congreso en su inscripción).

B.- PAGO PERSONAL (sólo para los asistentes, no ponentes) en efectivo el día 11 de junio de 2018, durante el XXVI Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A.C.

c.- *La aportación económica que usted realice, incluye: inscripción al Congreso, renovación anual a la Asociación como agremiado e incorporación como integrante a la Asociación de los nuevos participantes.*

Se entregará constancia de asistencia al Congreso y por ponencia en cada trabajo.

6.- EJES TEMÁTICOS DEL CONGRESO

- A. *Paradigmas educativos, enseñanza, aprendizaje, evaluación, metodologías, estrategias, investigación educativa en Bioquímica y áreas afines.*
- B. *Experiencias educativas y resultados.*
- C. *Otros.*

7.- TIPOS DE PRESENTACIÓN DE TRABAJO EN EL CONGRESO

Los trabajos al Congreso se presentarán en una de dos versiones de presentación que corresponde a : **oral o cartel**, asignados de acuerdo al orden de envío a la mesa directiva organizadora del evento y de acuerdo a disponibilidad de horario

Para registrar ponencias y carteles se deberán entregar por escrito vía correo electrónico a la dirección: asoc.mex.prof.bq@gmail.com el resumen del trabajo con una extensión de 4 a 6 cuartillas, de acuerdo a las especificaciones siguientes:

I- Documento elaborado en Word versión 2003, 2007 ó 2010, letra Arial 12, interlineado 1.5 en formato de ensayo, citando las fuentes de información de la que se extraen las ideas o que dan fundamento al texto elaborado.

Con el siguiente contenido:

a.-ENCABEZADO: Centrado en mayúsculas y minúsculas, (letra Arial 14 negrita, interlineado 1.5) que contenga: Título del trabajo a presentar; Autores (Apellidos, nombres); Institución de procedencia; Dirección de la Institución; Direcciones electrónicas de los autores del trabajo.

b.-RESUMEN

c.-FUNDAMENTOS TEÓRICOS REFERENTES AL TEMA A PRESENTAR.

d.-OBJETIVO(S)

e.-METODOLOGÍA

f.-RESULTADOS

g.-DISCUSIÓN O ANÁLISIS DE RESULTADOS

h.-CONCLUSIONES

i.-REFERENCIAS.

II.- En caso de enviar más de un trabajo, **uno de ellos será elegido para presentación oral y los demás en cartel** (se solicita indique que trabajo preferiría que se deba programar como ponencia oral). Por favor considere este punto.

III- Los carteles se colocarán al inicio de la sesión y el o los autores deberán permanecer frente a ellos para su explicación, durante la franja horario en que sea programado.

IV- El registro se llevará a cabo a partir de la publicación de esta convocatoria hasta el **30 de abril de 2018**, otorgándosele el orden de presentación conforme a la recepción de los trabajos, cubriéndose inicialmente los orales. Los trabajos que así lo soliciten serán aceptados para su presentación en cartel o bien los que excedan una vez cubiertas los espacios para presentaciones orales.

V- Los trabajos serán revisados y en su caso, aceptados por el Comité Científico del Congreso.

Solicitamos, a ustedes, calidad en los trabajos existiendo la posibilidad de solicitar a los autores modificaciones y adecuaciones a los resúmenes de sus ponencias enviadas para su aprobación.

VI.- Los resultados de aceptación de trabajos a participar se dará a conocer por escrito en documento enviado por la Presidenta de la AMPB A.C. vía correo electrónico del 1 al 7 de mayo de 2018.

POR FAVOR CONSIDERE LAS FECHAS INDICADAS PARA LA RECEPCIÓN DE LOS TRABAJOS YA QUE SE DEBE ELABORAR CON TIEMPO LA MEMORIA DEL CONGRESO. AGRADECEMOS SU COLABORACIÓN.

VII.- Cualquier situación no prevista en la Convocatoria presente será resuelta por el Comité Organizador.

SOLICITAMOS ACTUALICE SUS DATOS COMO MIEMBRO INTEGRANTE DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, MANTENGA SU VIGENCIA.

INFORMES

* **María Esther Revuelta Miranda.**

Presidenta AMPB, A.C.

FES-Cuautitlán UNAM. Sección Bioquímica y Farmacología Humana. Campo I.

Teléfono 044 55 1683-9732.

asoc.mex.prof.bq@gmail.com

***Juan Manuel Torres Merino.**

Secretario-Tesorero AMPB, A.C.

FES-Cuautitlán UNAM. Sección Bioquímica y Farmacología Humana. Campo I.

Teléfono 044 55 2086-2611.

asoc.mex.prof.bq@gmail.com

OBITUARIO

Ricardo Miledi y Dau (1927-2017)

Rocío Salceda Sacanelles

Instituto de Fisiología Celular, UNAM



Ricardo Miledi, pionero en el estudio de la comunicación entre las neuronas, demostró en colaboración con Katz demostró la dependencia de calcio para la liberación del neurotransmisor, e introdujo nuevas estrategias y modelos para el estudio de la transmisión sináptica.

Miledi, investigador emérito de la Universidad Nacional Autónoma de México, falleció el pasado 18 de diciembre en Irvine, California.

Nacido en Chihuahua, México el 15 de septiembre de 1927, se mudó a la Ciudad de México en donde realizó los estudios de Medicina. Durante su servicio social efectuó sus primeras investigaciones en el Instituto Nacional de Cardiología bajo la supervisión del Dr. Arturo Rosenblueth. Seleccionado por Albert Grass y Stephen Kuffler como el primer becario en el programa *Grass Fellowship*, en 1955 viajó a Massachusetts, USA, y en el laboratorio de Biología Marina en Woods Hole realizó sus primeros estudios en la sinapsis gigante del calamar. Posteriormente, como becario de la fundación Rockefeller (1956-1958) llevó a cabo una

estancia en la Universidad de Canberra, Australia, con Sir John C. Eccles, realizando importantes estudios sobre la transmisión neuromuscular en colaboración con Krnjevic y Curtis. En 1958, obtuvo una posición en el Departamento de Biofísica en el University College en Londres. Aquí, en colaboración con Bernard Katz trabajó en varios proyectos relacionados con la transmisión neuromuscular, particularmente la liberación de acetil colina y su receptor. En 1984 se incorporó como profesor Distinguido en el Departamento de Neurobiología y Conducta, en la Universidad de California en Irvine, USA, y continuó analizando los mecanismos de transmisión sináptica, enfocándose al estudio de diferentes receptores.

Miembro de la Academia de Ciencias de México y de la de los Estados Unidos de Norte América y autor de cerca de 500 publicaciones internacionales enfocadas a explicar los mecanismos básicos de la comunicación neuronal, es considerado uno de los diez neurobiólogos más citados.

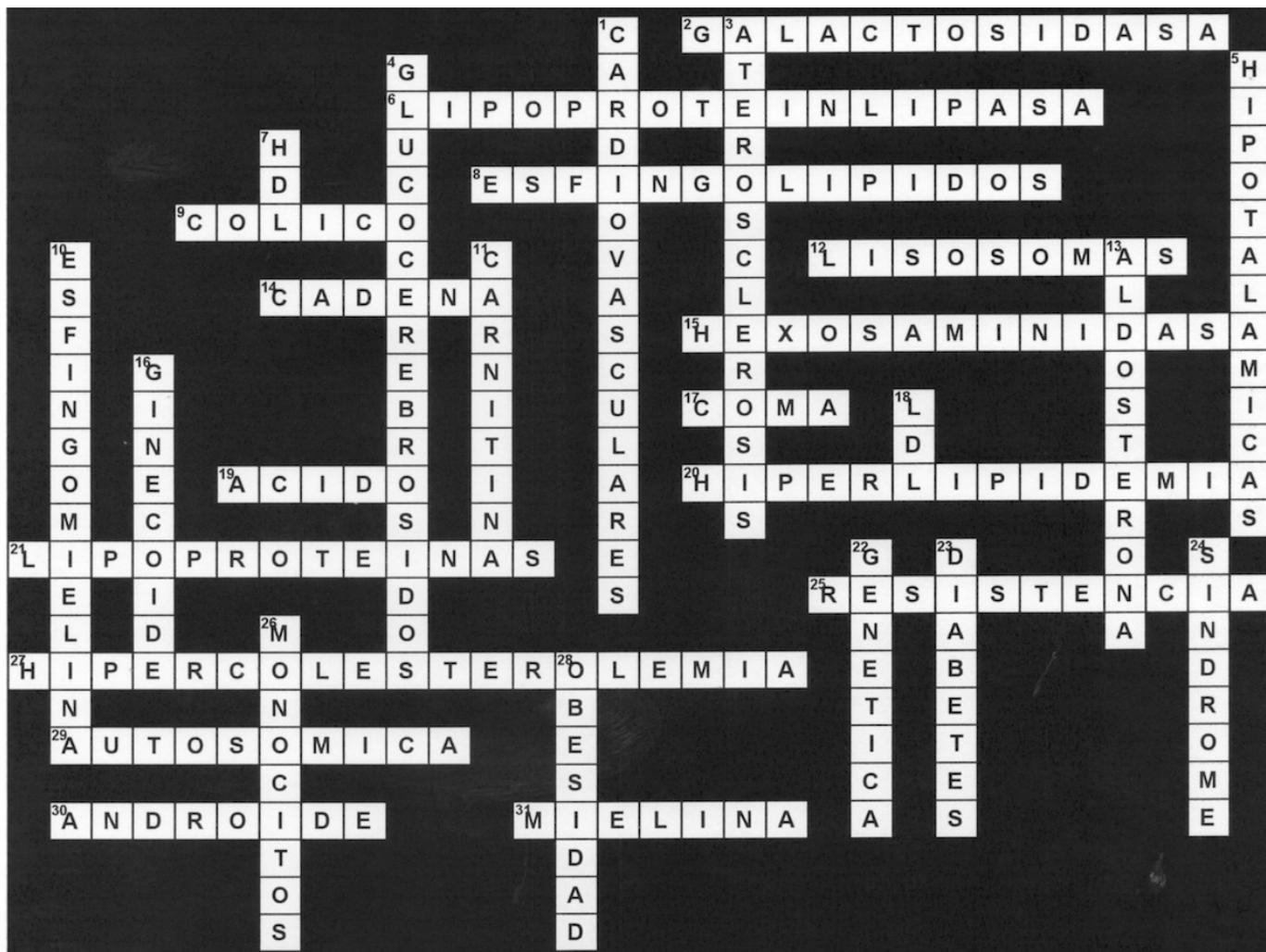
En diferentes ocasiones Miledi intentó regresar a México, pero no se dieron las condiciones para ello. No fue hasta la década de los 90 en que como investigador extraordinario en el ahora Instituto de Neurobiología de la UNAM en Juriquilla, Qro, México, participó de manera importante en el desarrollo del mismo y fomentó activamente el intercambio científico entre México y Estados Unidos.

Entre los muchos reconocimientos de que fue merecedor destacan la Royal Queen's Medal, UK (1998); Premio Príncipe de Asturias (1999); doctor Honoris Causa por varias Universidades Europeas y de México.

Una de las mayores contribuciones de Ricardo Miledi fue su influencia en varias generaciones de neurocientíficos motivados por su pasión por la ciencia, carisma y calidad humana.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ[®] ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

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



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

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

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

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

1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o en su caso, definir las al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando departamento, institución, ciudad, estado y país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.

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

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

4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.

5) Referencias. Se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener para los artículos: apellidos e iniciales de todos los autores, año

de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo: Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Gen* 113:25-34. Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma: Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The Molecular Biology of Immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, Ann Arbor, Michigan, USA, pp 81-104. Los libros podrán incluir las páginas totales o las consultadas y se citarán de acuerdo con este ejemplo: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

6) Figuras y Tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse con la abreviatura, la primera letra mayúscula y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

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

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

- 1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la Revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión.

Los manuscritos serán evaluados por lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre

ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorpore en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.