



Universidad Nacional Autónoma de México ○ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Biología

Celular

VETERINARIA



Directorio

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Dr. José Narro Robles

Rector

Dr. Eduardo Bárzana García

Secretario General

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez

Secretario Administrativo

Dr. Francisco José Trigo Tavera

Secretario de Desarrollo Institucional

Lic. Enrique Balp Díaz

Secretario de Servicios a la Comunidad

Lic. Luis Raúl González Pérez

Abogado General

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Dra. María Elena Trujillo Ortega

Directora

M en C Juan Nava Navarrete

Secretario General

M en C Ezequiel Sánchez Ramírez

Secretario Administrativo

Dr. Francisco Suárez Güemes

Secretario de Planeación y Vinculación

Dra. Silvia Elena Buntinx Dios

Jefa del Departamento de Publicaciones

MVZ Enrique Basurto Argueta

Jefe del Departamento de Diseño Gráfico y Editorial



Universidad Nacional Autónoma de México ○ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Biología Celular

VETERINARIA

- Santiago René Anzaldúa Arce • Ivonne Caballero Cruz • Milton Enrique Cardoso Rangel • Manuel Espinosa Pedroza
- Jorge Hernández Espinosa • María de Lourdes Juárez Mosqueda • Juan Ocampo López • Icela Palma Lara
- Mario Pérez Martínez • Olivia Rodríguez Morales • Luis David Zepeda Domínguez

COORDINADOR CIENTÍFICO: Santiago René Anzaldúa Arce



Primera edición, 25 de abril de 2014.

DR© 2014, Universidad Nacional Autónoma de México.
Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México, Distrito Federal.

ISBN: 978-607-02-5401-7

"Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales de la obra."

Impreso y hecho en México. / Printed and made in Mexico.

El Comité Editorial de la FMVZ reconoce el trabajo que realizó el **Dr. Crisóforo Mercado Márquez** como revisor técnico de esta obra.

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo recibido para la publicación de la presente obra a través del proyecto PAPIME PE204605: "Proyecto de Apoyo a la Docencia a las materias de Biología Celular Veterinaria, Biología Tisular y Embriología del Nuevo Plan de Estudios".

Corrección de estilo: Lic. Marcela Chapou Videgaray

Corrección de pruebas: MVZ Laura Edith Martínez Álvarez

Diseño de portada: LSCA Edgar Emmanuel Herrera López

Diseño editorial y formación electrónica: LDCV F. Avril Braulio Ortiz

Ilustraciones: LDCV Nimbe Sáenz Martínez, LDCV Carlos Iván Sánchez Sánchez

Interfaz: LDCV Carlos Iván Sánchez Sánchez



Presentación

El personal académico del Departamento de Morfología presenta esta primera obra integrante de una serie de tres libros de textos electrónicos que cubren ampliamente los contenidos programáticos de las asignaturas de *Biología Celular Veterinaria*, *Biología Tisular* y *Embriología*. El resultado de este esfuerzo se hace posible gracias al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE-204605, junto con la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), quien aprobó el proyecto, brindándole amplio respaldo.

Diseñado originalmente para los estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia que cursan la asignatura de Biología Celular Veterinaria del actual Plan de Estudios, este libro presenta material igualmente útil para estudiantes que cursan su licenciatura en otras disciplinas biomédicas afines: biólogos, químicos, odontólogos, médicos. Pero muy en especial para aquellos estudiantes que cursan la carrera en otros estados de la República Mexicana, en donde la Biología Celular se incorpora como una asignatura de reciente creación.

Esta edición electrónica proporciona las bases de conocimiento que facilitan la comprensión de textos aún más especializados, aunque abarcando las distintas unidades temáticas diseñadas expresamente para la asignatura. Asimismo, constituye un práctico material de consulta para estudiantes de posgrado que requieran información puntual acerca de los principios básicos en torno a los diversos procedimientos metodológicos utilizados para la investigación en torno a la biología celular y molecular; aquí se presentan en un último apartado, cuando éstos solían exponerse de manera dispersa a lo largo del programa original.

Pese a los esfuerzos realizados para homogeneizar el contenido de esta obra tanto en profundidad como en extensión, bien sabemos que será necesario reconsiderar los temas expuestos para la elaboración de futuras ediciones por la actualización inherente a la naturaleza del conocimiento en el campo de la biología celular –cada vez más especializado– y así, asegurar su vigencia.

Los autores queremos agradecer el apoyo e interés, así como la amplia colaboración de las instancias involucradas en el desarrollo de la presente obra: al Comité Editorial, al Departamento de Publicaciones y al Departamento de Diseño Gráfico y Editorial, todos ellos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de esta Máxima Casa de Estudios.

Ciudad Universitaria, 3 de octubre de 2013.

Dr. Santiago René Anzaldúa Arce

Coordinador Científico



Semblanzas



María de Lourdes Juárez Mosqueda

Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia por la UNAM, posee una maestría y doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Celular por el CINVESTAV-IPN, así como un posdoctorado por el Oregon National Primate Research Center (ONPRC) de la Oregon Health and Science University (OHSU), USA. Además cuenta con una especialidad en Microscopía Electrónica por la Universidad de Costa Rica; un diplomado en Morfofisiología Veterinaria y otro diplomado en Estrategias de Enseñanza y Aprendizaje en la Medicina Veterinaria y Zootecnia, los dos últimos por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Es profesora titular “C” de tiempo completo, definitivo a nivel de licenciatura y posgrado en la FVMZ, donde imparte las materias de Biología Celular Veterinaria, Biología Tisular y Bioquímica. Su área de interés se centra en la participación del citoesqueleto y la capacidad fertilizante del espermatozoide del mamífero. Es investigadora nacional nivel I en el Sistema Nacional de Investigadores y actual coordinadora de la asignatura de Biología Celular Veterinaria en el Departamento de Morfología de la FMVZ.

Icela Palma Lara

Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y en el Instituto Politécnico Nacional (IPN) obtuvo la maestría en Ciencias (Morfología) y el doctorado en Ciencias en Investigación de Medicina. En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM es profesora de asignatura “A”, en los programas de licenciatura y de posgrado, donde imparte las asignaturas de Biología Celular Veterinaria, Bioquímica y Anatomía Veterinaria. Pertenecer al Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I. Su investigación la ha dedicado al estudio de los genes del desarrollo, la morfología celular y molecular, y a estudiar las alteraciones en las vías de señalización del cáncer.



Santiago René Anzaldúa Arce

Tiene la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, una maestría en Ciencias (Biología Celular) y el doctorado en Ciencias (Biología), todos por la UNAM. Es investigador nacional nivel I, dentro del Sistema Nacional de Investigadores. Es profesor titular "B" de tiempo completo, definitivo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. En el ámbito de la docencia imparte las materias de Biología Celular, Biología Tisular y Biología Molecular, para el programa del posgrado y a nivel licenciatura. Su línea de investigación la dedica al estudio de los cambios celulares y moleculares en el aparato reproductor femenino de los mamíferos en diferentes condiciones hormonales. Actualmente ocupa la jefatura del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, para el periodo 2012-2016.

Luis David Zepeda Domínguez

Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia por la UNAM. Es profesor de asignatura "A" y "B", imparte los cursos de Biología Tisular, Biología Celular Veterinaria y Temas Selectos de Biología: Embriología, de esta última funge también como coordinador de la asignatura.

Milton Enrique Cardoso Rangel

Es médico veterinario zootecnista por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Su tesis de licenciatura la dedicó al estudio de la expresión de receptores para estrógenos en tubas uterinas de conejas gestantes, fue una investigación interdisciplinaria entre la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Química. Actualmente su experiencia la dedica a la clínica veterinaria de pequeñas especies y administra su propia clínica veterinaria al norte de la ciudad de México.



Olivia Rodríguez Morales

Es egresada de la UNAM, obtuvo su título de licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Sus estudios de posgrado los realizó en el Instituto de Biotecnología, donde obtuvo una maestría y un doctorado en Ciencias Bioquímicas, tiene además un Diplomado en Vacunología Veterinaria por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Es candidata del Sistema Nacional de Investigadores. Es investigadora titular “C” en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y en el ámbito de la docencia, imparte el curso de Biología Celular Veterinaria en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se ha dedicado al estudio de la Inmunología Molecular y Proteómica, la Microbiología y la Patogénesis Molecular.

Manuel Espinosa Pedroza

Es médico veterinario zootecnista por la UNAM. Desde hace algunos años es profesor asociado “C” de tiempo completo, definitivo, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde imparte los cursos de Biología Celular Veterinaria, Biología Tisular y Temas Selectos de Biología: Embriología. Actualmente es responsable del Programa de Servicio Social en el Departamento de Morfología.



Ivonne Caballero Cruz

Obtuvo la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, una maestría en Farmacología y un doctorado en Bioquímica y Biología Celular por la UNAM. Durante nueve años se desempeñó como docente en las áreas de Bioquímica y Biología Celular en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. En la industria privada fue la directora técnica de capacitación en Royal Canin. En la actualidad brinda asesoría externa en la División Veterinaria EFFEM, Wonder Goods Mexico, y se desempeña como responsable de comunicación y capacitación técnica para Nestlé® Purina® Pet Care Mexico.

Mario Pérez Martínez

Tiene la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia por la UNAM, una maestría en Ciencias (Biología de la Reproducción Animal) por la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa y un doctorado en Ciencias (Fisiología) por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN. Es profesor titular “C” de tiempo completo, definitivo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, imparte a nivel licenciatura las asignaturas de Biología Celular Veterinaria y Biología Tisular y en el programa de posgrado tiene a su cargo la asignatura de Temas Selectos de Biología Celular. Está adscrito al Departamento de Morfología, en el Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción “Rosa Emilia Lavielle”. Es investigador nacional nivel I del Sistema Nacional de Investigadores. Su disciplina de investigación la ha dedicado al estudio de la morfología integrativa de la función reproductiva de los mamíferos domésticos a nivel celular y tisular.



Jorge Hernández Espinosa

Tiene la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, una maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal ambos estudios por la FMVZ de la UNAM, es Doctor en Educación, cuenta además con una especialidad en Microscopía Electrónica por la Universidad de Costa Rica y un Diplomado en Enfoques y Estrategias para la Enseñanza de la Medicina Veterinaria. Es profesor asociado "C" de tiempo completo, adscrito al Departamento de Morfología en la FMVZ de la UNAM, imparte las asignaturas de Biología Celular Veterinaria y Biología Tisular a nivel licenciatura, así como Temas Selectos de Biología Celular: Embriología y Biología Celular en posgrado, aunado a su labor de investigación.

Juan Ocampo López

Tiene la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia por la UNAM, una maestría en Ciencias (Biología Celular) y un doctorado en Ciencias (Biología Celular) por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN. Es profesor investigador titular "C", en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. En el ámbito de la docencia imparte a nivel licenciatura las asignaturas de Citología, Embriología e Histología y la de Biología Celular y Molecular. Forma parte del cuerpo académico de Salud Animal, dirige el proyecto "Histología e histopatología de los quirópteros del estado de Hidalgo" y se ha dedicado al estudio de nuevos métodos de diagnóstico, prevención y control de las enfermedades de los animales.



Contenido

PORTADA

DIRECTORIO

PÁGINA LEGAL

PRESENTACIÓN

SEMBLANZAS

CAPÍTULO 1. Evolución celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda

Objetivos temáticos	19
Introducción	19
Teoría celular y concepto de célula	20
Postulados de la doctrina celular	
Concepto de célula	
De las moléculas a la primera célula	21
Modelos protobióticos	
Características del primer sistema celular	

De los procariontes a los eucariontes	24
Teorías sobre el origen de las células eucariontes	
Características, semejanzas y diferencias entre las células procariontes y eucariontes	25
Clasificación taxonómica de los seres vivos	
Organización estructural y funcional de las células eucariontes ...	27
Bibliografía	28

CAPÍTULO 2. Membranas celulares

Icela Palma Lara

Objetivos temáticos	30
Introducción	30
Funciones y estructura	30
Funciones	30
Barrera selectivamente permeable	
Transporte de solutos dentro y fuera de la célula o dominio subcelular	
Compartimentación de dominios celulares o microdominios	
Transducción de energía	
Respuesta a señales externas	
Interacción intercelular	
Sitios de actividades bioquímicas	



Punto de anclaje para el citoesqueleto y elementos extracelulares	
Formas especializadas de unión que proporcionan adhesión o comunicación celular	
Capacidad de movilidad celular y organelos	
Estructura	33
Bicapa lipídica	35
Fosfolípidos	
Colesterol	
Glucolípidos y glucoproteínas	
Proteínas de membrana	
Sistemas de transporte membranal	40
Ósmosis	
Endocitosis	
Exocitosis	
Uniones celulares	43
Uniones estrechas	
Uniones de anclaje	
Uniones comunicantes	
Uniones gap	
Plasmodesmata	
Bibliografía	46

CAPÍTULO 3. Núcleo

*Santiago René Anzaldúa Arce, Luis David Zepeda Domínguez
y Milton Enrique Cardoso Rangel*

Objetivos temáticos	48
Introducción	48
Organización estructural del núcleo	48
Envoltura nuclear	

Lámina nuclear o lámina fibrosa	
Nucléolo	
Elementos figurados intercromatinianos	
Matriz nuclear	
Organización estructural del ADN	56
Cromatina	
Organización nuclear del ADN en la cromatina	
Proteínas del núcleo	
ARN	
Eucromatina y heterocromatina	
Clasificación de los cromosomas	62
Estructura del cromosoma	
Regulación de la expresión génica	65
Regulación génica en organismos procariontes	
Regulación génica en eucariontes	
Bibliografía	78

CAPÍTULO 4. Citoplasma, citoesqueleto y movimiento celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda e Icela Palma Lara

Objetivos temáticos	81
Introducción	81
Aspectos bioquímicos y estructurales de la organización del citoplasma	82
Citoesqueleto y movimiento celular	84
Microfilamentos: filamentos de actina (actina-F)	
Microtúbulos	
Filamentos intermedios	
Bibliografía	119



CAPÍTULO 5. Matriz extracelular

Santiago René Anzaldúa Arce y Olivia Rodríguez Morales

Objetivos temáticos	122
Introducción	122
Composición y diversidad estructural	123
Glucosaminoglucanos	123
Proteoglucanos	
Proteínas fibrosas de la MEC	
Moléculas mediadoras de la adhesión celular	
Interacción célula-matriz extracelular	138
Membrana basal	
Bibliografía	142

CAPÍTULO 6. Componentes celulares involucrados en la síntesis, tráfico y distribución de las proteínas

Manuel Espinosa Pedroza

Objetivos temáticos	144
Introducción	144
Ribosomas	144
Reticulo endoplasmático rugoso	146
Aparato de Golgi	147
Lisosomas	147
Reticulo endoplasmático liso	148
Bibliografía	149

CAPÍTULO 7. Mitochondrias y peroxisomas

Ivonne Caballero Cruz

Objetivos temáticos	151

Introducción	151
Organización estructural de la mitocondria	151
Introducción al estudio de la mitocondria	
Origen de la mitocondria	
Componentes de las membranas mitocondriales	
Formas de la mitocondria	
Las ATP sintetasas de las mitocondrias	
Cloroplastos	
ADN mitocondrial	
Organización funcional de la mitocondria	156
Glucólisis y cadena respiratoria	
La producción de ATP	
Teoría quimiosmótica de Mitchell (1961)	
Betaoxidación	
División mitocondrial	159
Estudios relacionados con la mitocondria	
La mitocondria y el cáncer	
Sobre la apoptosis	
Biogénesis y función de los peroxisomas	161
Sistema de desintoxicación celular	
Respuesta celular al estrés oxidativo	165
Radicales libres	
Los antioxidantes	
Importancia médica de los radicales libres	
Niveles óptimos de antioxidantes	
Bibliografía	170

CAPÍTULO 8. División y ciclo celular

Santiago René Anzaldúa Arce y Luis David Zepeda Domínguez

Objetivos temáticos	172



Introducción	172
Ciclo celular	173
Interfase	
Sistema de control del ciclo celular	
Puntos de control del ciclo celular	
Diferenciación celular	179
Diferenciación de las células de los mamíferos	
Criterios de diferenciación celular	
La diferenciación celular no es en todos los casos una característica permanente	
Citodiferenciación y genes	
Control de proceso de diferenciación celular	
Desdiferenciación	
Diferenciación celular y cáncer	
División celular	184
Mitosis	
Meiosis	
Bibliografía	199

CAPÍTULO 9. Señalización celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda e Icela Palma Lara

Objetivos temáticos	202
Introducción	202
Principios de la señalización celular	202
Mensajeros celulares	
Receptores: los “oídos” de las células	204
Receptores externos (de superficie celular)	
Acoplamiento del receptor con su ligando	
Receptores acoplados a proteína G	

Sistema de la adenilato ciclasa	
Sistema fosfoinosítidos-calcio	
Transducción de la señal	208
Propagación intracelular y amplificación de la señal	
Receptores con actividad enzimática	
Hormonas eicosanoides	
Tipos de comunicación celular	215
Comunicación celular: tipos y funciones	
Tipos de respuesta a las moléculas de señalización	
Adaptabilidad	
Importancia biomédica	
Bibliografía	218

CAPÍTULO 10. Bases celulares de la inmunidad

Mario Pérez Martínez y Olivia Rodríguez Morales

Objetivos temáticos	220
Introducción	220
Células de la respuesta inmune	220
Respuesta inmune innata	
Respuesta inmune adaptativa	
Células de la respuesta inmune innata	
Células de la respuesta inmune adaptativa	223
Linfocitos	
Células presentadoras de antígeno (CPA)	
Células efectoras	
Características funcionales de la respuesta inmune	228
Aspectos generales	
Procesamiento y presentación del antígeno	
Función de las células T y el reconocimiento del antígeno	



Activación de la célula B y la síntesis de anticuerpos	
Regulación de la respuesta inmunológica	
Función del Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas (TLAM)	
Inmunodetección de moléculas	233
Inmunocitoquímica	
Electroforesis	
Citometría de flujo	
Pruebas primarias de unión antígeno-anticuerpo	
Pruebas secundarias de unión	
Pruebas <i>in vivo</i>	
Bibliografía	240

CAPÍTULO 11. Muerte celular y cáncer

María de Lourdes Juárez Mosqueda y Olivia Rodríguez Morales

Objetivos temáticos	243
Introducción	243
Muerte celular	243
Características del proceso de apoptosis y necrosis	244
Apoptosis <i>versus</i> necrosis	
Aspectos morfológicos, celulares y moleculares del cáncer	256
Cáncer	
Aspectos morfológicos del cáncer	
Etapas del proceso carcinógeno	
Metástasis	
Agentes etiológicos del cáncer	
Bases moleculares del cáncer	
Episodios de mutación y expansión del cáncer	
Terapia anticáncer	
Bibliografía	270

CAPÍTULO 12. Aplicación de la biología celular a la medicina veterinaria y zootecnia

Jorge Hernández Espinosa

Objetivos temáticos	272
Introducción	272
Animales manipulados genéticamente	272
Terapia génica	
Técnica de microinyección en el ovocito fecundado	
Técnica de introducción de un transgén con el empleo de virus	
Técnica con células de teratocarcinoma portadoras del transgén	
Bibliografía	277

CAPÍTULO 13. Métodos en biología celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda y Juan Ocampo López

Objetivos temáticos	279
Introducción	279
Microscopía electrónica	280
Breve consideración histórica sobre la microscopía electrónica	280
El microscopio electrónico moderno	280
Funcionamiento de un microscopio electrónico de transmisión	280
Preparación de muestras biológicas	281
Métodos para estudiar el ADN	286
Fragmentación del ADN	
Secuenciación de nucleótidos	
Hibridización de ácidos nucleicos	
Amplificación del ADN por la técnica de PCR	



Clonación del ADN	
Ingeniería del ADN	
pH.....	295
Concepto de ácido y base	
Disociación del agua	
Fundamento y aplicación del concepto de pH	
Sistemas reguladores de pH	
Cálculo práctico del pH en diversas sustancias	

Aislamiento e identificación de proteínas	302
Ultracentrifugación, cromatografía y SDS-PAGE	
Cultivo de células	306
Separación de células a partir de un tejido	
Cultivos celulares	
Líneas celulares	
Inmunodetección de moléculas con anticuerpos.....	309
Bibliografía	312

1

Evolución celular



Capítulo 1

Evolución celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda

Objetivos temáticos

- Teoría celular y concepto de célula.
- De las moléculas a la primera célula.
- De las procariontes a las eucariontes.

Introducción

El siglo XIX constituye una época extraordinariamente fecunda para el desarrollo de las ciencias naturales, entre ellas la biología, cuyo nombre no se acuñó sino hasta comienzos del siglo pasado, cuando los conocimientos que la integraban ameritaron considerarla como una disciplina distinta de la medicina y más amplia que la llamada historia natural. Es en el año de 1800 cuando se introduce el vocablo “biología”, el cual se registra por primera vez en una oscura publicación alemana para denotar el estudio del hombre desde el punto de vista morfológico, fisiológico y psicológico, y dos años más tarde (1802) aparece de nuevo, introducido por el médico y naturalista alemán Gottfried R. Treviranus, pero ahora con una connotación más cercana a la actual.

Treviranus, en su tratado *Biologie*, define a la biología o ciencia de la vida como aquella cuyo objeto de estudio “...serán los diferentes fenómenos y las diferentes formas de vida, las condiciones y las leyes bajo las que ocurren y las causas que la producen...”.

En contra de la era puramente taxonómica y descriptiva de entonces, el objeto de estudio de la nueva ciencia era el funcionamiento de los seres vivos para tratar de entender el fenómeno de la vida y sus manifestaciones.

Los biólogos del siglo XIX se preocuparon por la búsqueda de un principio común de estructura capaz de responder al *qué es* de la vida, de la naturaleza, de los seres. Imbuidos de esta idea, estudiaron los fenómenos vitales buscando incesantemente las propiedades comunes que caracterizan a los seres vivos y que los distinguen de los objetos inanimados.

En el siglo pasado se gestan y establecen una serie de generalizaciones fundamentales, universales y teorías sobre las que descansa el edificio de la biología contemporánea.

Ejemplos de este tipo de procesos extraordinarios en la historia de la biología son la teoría celular, la de la herencia mendeliana, la de la selección natural, el concepto de medio interno y su homeostasis, etcétera.



La biología celular (antiguamente llamada citología) es una rama reciente de la ciencia de la vida. Ésta fue reconocida a finales del siglo pasado como una disciplina independiente. La biología celular se dedica al estudio de la célula como una unidad fundamental de la materia viviente. Su temprana historia está íntimamente unida al desarrollo de las lentes ópticas y la combinación de éstas en la construcción del microscopio compuesto. El establecimiento de la teoría celular estuvo relacionada de modo más directo con el origen de la biología celular.

Aquí el biólogo trabaja de manera virtual con objetos que el hombre no puede ver, oír, ni tocar de manera directa; aún así, y a pesar de este gran inconveniente, las células son objeto de miles de publicaciones al año en las que se estudian casi todos los aspectos de su diminuta estructura. De muchas formas el estudio de la biología celular constituye un tributo a la curiosidad humana, así como a la inteligencia creativa que elabora los medios por los cuales puedan efectuarse estos descubrimientos.

Por otra parte, las características de un tejido, órgano o sistema de órganos depende, en última instancia, de las células que lo forman. La comprensión de las propiedades básicas estructurales y funcionales de la célula proporciona la base esencial para el análisis de los problemas de la fisiología de los órganos, la biología del desarrollo, la histología o cualquier otra área relacionada. Entonces el estudio de la biología celular no sólo es importante por sí misma, sino también es invaluable para estudiar infinidad de fenómenos en las ciencias biológicas. De la misma manera, esta disciplina es de gran importancia en las numerosas áreas de la investigación médica, pues se cree que la mayor parte de las enfermedades y el envejecimiento se deben a alteraciones que implican funciones celulares y moleculares.

Teoría celular y concepto de célula

Postulados de la doctrina celular

La teoría celular puede considerarse como la culminación de la búsqueda de un principio general o fundamental de organización de los seres vivos.

Aunque atribuida por tradición histórica a Schleiden (1804-1881), botánico de Hamburgo, y a Schwann (1810-1882), zoólogo de Neuss, la teoría celular no surgió de manera simple e improvisada en la mente y las observaciones de estos científicos. Ya desde el siglo XVII varios microscopistas habían visto células, si bien ninguno de ellos supo entender su significado e incorporar sus experiencias en un marco teórico general; en otras palabras, ninguno de ellos supo interpretar sus hallazgos para develar el principio biológico subyacente.

Los postulados que sostiene la teoría celular, como se entiende ya en este siglo, se resumen como sigue:

1. La célula es la unidad anatómica o estructural de los seres vivos. Todos los seres vivos —animales, plantas o protozoarios— están formados por células sueltas o asociaciones de células y sus productos.
2. Unidad de vida. La célula es la unidad mínima de materia capaz de tener vida independiente. Las formas más elementales de vida están constituidas por células solitarias.
3. Unidad de origen: *omnis cellula e cellula*. Toda célula se origina de otra célula preexistente por un proceso de división que comprende dos etapas secuenciales: mitosis o división nuclear y citocinesis o división citoplasmática. Las células germinales se dividen por un proceso llamado meiosis.



4. Las células son unidades de enfermedad. Este es un concepto de patología introducido por Virchow, que hoy en día ha perdido vigencia por considerarse las enfermedades no sólo en el ámbito celular sino también en el molecular.
5. Las células son entidades individuales; sin embargo, en la mayoría de los organismos existen dos tipos de individualidad: el de las células y el del organismo como un todo. Por lo tanto, la función del organismo como un todo resulta de la suma de las actividades e interacciones de las células que lo constituyen.
6. Individualidad celular. Desde este punto de vista, las células animales y vegetales pueden clasificarse en cuatro categorías:
 - a) Independientes. Seres aislados durante toda su vida o parte de ella, por ejemplo: protozoarios, bacterias, espermatozoides o eritrocitos.
 - b) Federadas. Estas células componen muchos tejidos animales y excepcionalmente algunos tejidos vegetales; se caracterizan por exhibir membranas que carecen de uniones o canales comunicantes intracitoplasmáticos. Por ejemplo, las células del epitelio intestinal.
 - c) Plasmoidales. Se encuentran comunicadas por medio de uniones o canales intracitoplasmáticos: uniones comunicantes o uniones gap en los tejidos animales y los plasmodesmos en las plantas. Por ejemplo, las células musculares cardíacas.
 - d) Sincitiales. En ciertos casos los individuos celulares funden sus citoplasmas en un todo continuo, generando una masa celular gigante con numerosos núcleos. Por ejemplo, las células trofoblásticas en la placenta.

Concepto de célula

El término célula (griego *cytos*, celda; latín *cella*, espacio hueco) fue usado por primera vez por Robert Hooke (1665). Este microscopista, en un primitivo microscopio óptico, observó que el corcho estaba compuesto por numerosas y diminutas cavidades que semejaban un panal de abejas. En realidad, lo que Hooke vio fueron los espacios vacíos que ocupaban las células en el tejido vivo, y que se habían preservado en el corte del corcho. Es claro que Hooke utilizó el vocablo “célula” en un sentido totalmente distinto del que adquirió 150 años más tarde. La contribución más valiosa de Hooke a la biología fue el haber establecido nuevas pautas y abierto nuevos caminos para la búsqueda del significado de la organización de los tejidos de los seres vivos en escala microscópica.

Desde el punto de vista químico, la célula en general puede describirse como un compartimento que contiene diversas sustancias químicas disueltas en un medio acuoso y que está limitado por una membrana.

Desde el punto de vista morfológico, las células son las unidades estructurales, funcionales y de origen de los organismos vivos. Los organismos compuestos por más de una célula son descritos como multicelulares; un organismo compuesto por una sola célula puede ser llamado unicelular.

De las moléculas a la primera célula

Modelos protobióticos

La pregunta acerca de cómo surgió la célula ancestral nos lleva al estudio del origen de la vida o biogénesis. Para tratar de explicar este punto, han surgido varias hipótesis, entre las que destaca la evolutiva, que es la aceptada científicamente como prerequisite para la formación de la vida.



Un común denominador del desarrollo de la vida en la tierra a partir de la integración de las primeras células es el aumento de la complejidad, que ocurre con el paso del tiempo en los organismos multicelulares, en los cuales se advierte un incremento no sólo del número de sus partes constituyentes, sino de las interacciones que se establecen entre ellas, característica que nos permite definir al todo desde el punto de vista de la filosofía estructuralista y considerar a las células actuales como registros bioquímicos conservados a través de la evolución.

En 1924, Oparin postula la fase de la evolución química de la materia como un requisito indispensable para el establecimiento del fenómeno de la vida en la tierra, idea que constituye una de las principales aportaciones al estudio del origen y evolución celular; asimismo, sostiene que hubo la necesidad de una atmósfera reductora para que la vida iniciara su evolución en este planeta. Esto formó la base sobre la que se han apoyado tanto las especulaciones meramente teóricas como los múltiples enfoques experimentales que se están desarrollando. Tal es el caso de los *coacervados*, *vesículas o esferas protenoides* y el de la *bicapa de lípidos*.

La formación de partículas coloidales, como los coacervados de Oparin (*figura 1*), es uno de los modelos de concentración y polimerización con el que más se ha experimentado. Esto se logra con diferentes combinaciones de proteínas (histonas, clupleína y albúmina), carbohidratos (goma arábiga) y ácidos nucleicos (ADN, ARN), que producen gotas de 1 a 500 µm de diámetro. Las gotas tienen límites que las individualizan y a la vez las comunican con el medio, y su principal característica es la de ser más estables cuando presentan cierto tipo de reacciones, las cuales constituyen un buen modelo de metabolismo primitivo. Un ejemplo de este tipo de reacciones es la polimerización de glucosa 1-fosfato en almidón y

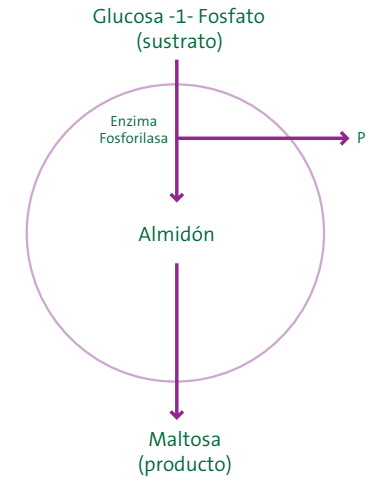


Figura 1. Representación esquemática de los coacervados de Oparin, los cuales poseen actividad metabólica.

la degradación del almidón en maltosa, que ocurre cuando las gotas del coacervado contienen una fosforilasa y una amilasa.

La polimerización térmica de aminoácidos –que a su vez fueron sintetizados por medio de las técnicas de Miller y Urey, y cuyo origen es totalmente abiótico– es otro tipo de condensación utilizado por Fox y sus colaboradores (*figura 2*), el cual produce sistemas formados por proteínoides denominados microesferas. Con base en este modelo, pensaron que los aminoácidos formados en el océano primitivo pudieron haber sido depositados por el oleaje sobre cenizas volcánicas que los evaporaron hasta secarlos totalmente y después arrastrados al mar, donde se concentraron en pequeñas gotas. Las microesferas pueden ser sometidas a centrifugación y son estables hasta por varias semanas. Vistas al microscopio electrónico muestran una doble pared que, según su contenido de

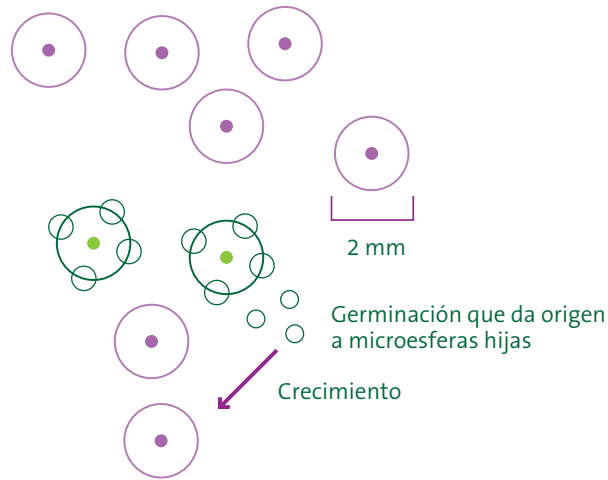


Figura 2. Las microesferas proteínoides de Fox son capaces de crecer y reproducirse.

proteínoides ácidos o básicos, responde a la técnica de tinción de Gram. Desde el punto de vista de su actividad presentan ósmosis y difusión selectiva, crecen y se multiplican por gemación y fisión. Además descomponen glucosa, descarboxilan el ácido pirúvico y actúan como esterasas y peroxidasas. Estas capacidades son de esperarse en un polipéptido con cargas orientadas, que además de unir moléculas puede actuar como centro catalítico.

También se ha postulado que las *protocélulas* (protobiontes) se formaron cuando las moléculas de fosfolípidos en el caldo prebiótico se integraron espontáneamente, formando una membrana constituida por una vesícula semipermeable que contenía un sistema autoduplicante de ARN y proteínas (*figura 3*). Este sistema duplicante evolucionó en su estructura e incrementó la síntesis de proteínas, lo que permitió la incorporación de más moléculas orgánicas de su medio externo; la energía liberada, al hidrolizar

estas moléculas, pudo ser utilizada para la síntesis de novo de ARN y proteínas. De esta manera, la secuencia de nucleótidos en las moléculas de ARN pudo llegar a expresarse en todos los componentes de la célula primitiva.

Características del primer sistema celular

Las características del primer sistema celular con el que se inició la evolución orgánica hace aproximadamente 3 500 millones de años, debieron haber sido: 1) una interfase de comunicación entre el medio interno de la célula y el medio externo; 2) un sistema de captación de energía; 3) un sistema de biosíntesis; y, 4) un sistema de codificación de la información.

- a) El sistema de comunicación entre el medio interno celular y el medio externo es una de las características que se proponen como esenciales para que pudieran construirse las primeras protocélulas y, de hecho, se supone que la diferenciación de un

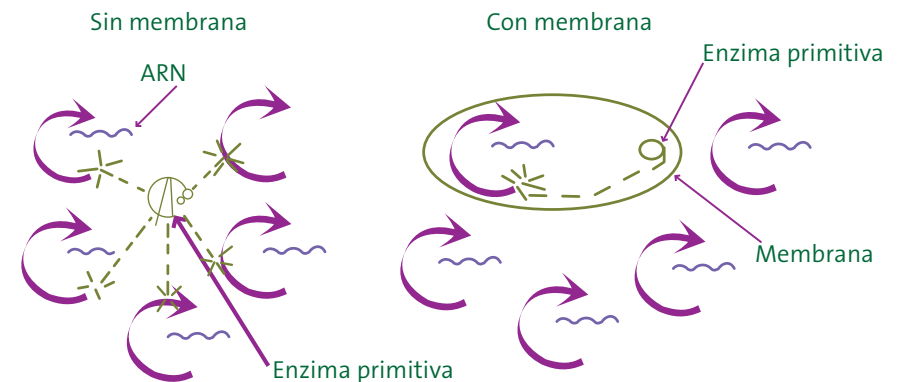


Figura 3. La adquisición de membrana de un sistema de autorreplicación del ARN permitió una mayor eficiencia de su enzima, con lo cual se evitó que otros sistemas autorreplicantes la utilizaran.



elemento de comunicación que individualiza y relaciona al medio protocelular interno con el ambiente es el acontecimiento crucial en las etapas iniciales de integración de las primeras células. Esta interfase proporcionó, además de individualidad, una forma de retroalimentación; es decir, de regulación entre ambos medios, así como la posibilidad de generar gradientes electroquímicos con movilidad energética.

- b) El sistema de captación de energía en un principio se debió de haber basado en polifosfatos, como la volutina que utilizan aún en la actualidad algunas bacterias y cianobacterias, las cuales obtienen energía a partir de estos polímeros.

Se piensa que estos polifosfatos, que pudieron haberse formado abióticamente por diversas vías, fueron probablemente las primeras moléculas energéticas producidas por condensación que utilizaron los organismos vivos y sus precursores inmediatos. Se cree que de estas moléculas evolucionaron otras, como el ATP.

La síntesis de dichas moléculas en un principio dependió de los sistemas de fermentación que originaron el primer tipo de metabolismo estable, *heterótrofo anaerobio*.

- c) El sistema de biosíntesis aseguró la utilización de la energía para realizar la polimerización, que debió de facilitarse por las características del contenido de la información intrínseca de los monómeros básicos.
- d) El sistema de codificación por polinucleótidos, mediante su propiedad de duplicación, aportó la capacidad de transporte de información de los progenitores a la descendencia; su posibilidad de mutar también produjo el aumento de variabilidad en las poblaciones.

De los procariontes a los eucariontes

Teorías sobre el origen de las células eucariontes

Existen básicamente dos teorías que tratan de explicar el origen de los eucariontes: la *autógena* o de las mutaciones y la de los mecanismos de *simbiosis*.

En el primer caso varios autores como Uzzell y Spolky, Raff y Mahler propusieron un esquema en el que, como consecuencia del aumento en la superficie de absorción, se formó dentro de la célula una serie de invaginaciones que se aislaron de la membrana y pudieron atrapar parte del genoma celular recién duplicado, así como concentrar algunas enzimas, lo que más tarde originaría las mitocondrias actuales por el desarrollo de divergencias funcionales (*cuadro 1*).

Esta posibilidad de separación del genoma puede apoyarse en la existencia de los *plásmidos*, genes extracromosómicos que pueden inte-

Cuadro 1

Algunos de los sucesos más importantes de la teoría autógena de origen de los organelos en los eucariontes

- Protocito con el genoma unido a la membrana celular.
- Duplicación del genoma.
- Crecimiento diferencial de la membrana con relación a la pared celular.
- Formación de invaginaciones de membrana alrededor de una o varias partes de la copia del genoma.
- Aislamiento y migración de las invaginaciones al interior del citoplasma.
- Formación de compartimentos intracitoplasmáticos con doble membrana.
- Reducción del genoma de los compartimentos y selección de información.
- Establecimiento de la regulación.
- Integración de los eucariontes.



ractuar con el cromosoma principal por medio de la integración física por efecto de las enzimas de recombinación de la célula, en una región del cromosoma con características homólogas a las del plásmido.

El origen de las invaginaciones se debe a la diferencia entre la velocidad de síntesis de las membranas en desarrollo.

La segunda proposición, la del origen por simbiosis, se apoya en los fenómenos de *endosimbiosis* actuales y en la presencia de ácidos nucleicos en los organelos, como los cloroplastos y las mitocondrias (*cuadro 2*).

En esta idea se sugiere que los organelos originalmente eran protocitos respiradores o fotosintéticos de vida libre, que fueron fagocitados pero no digeridos por otra célula y terminaron por establecerse como *simbiontes*. El huésped debió de ser un organismo heterótrofo que seguramente tenía mecanismos eficientes de movilidad y de fagocitosis y digestión. Este tipo de simbiosis pudo ser benéfica través de la evolución, sólo cuando se coordinaron los procesos de crecimiento y propagación de los simbiontes, lo cual daría por resultado el desarrollo de una estrecha dependencia genética de lo que finalmente resultaría la pérdida de autonomía de los simbiontes y su transformación en los organelos actuales.

Características, semejanzas y diferencias entre las células procariontes y eucariontes

Las células se clasifican en dos grupos: las procariontes y las eucariontes; los términos se derivan del griego *caryon*, que se traduce como nuez, semilla o núcleo, por lo que *procarion* significa “antes del núcleo” (células con núcleo primitivo) y *eucarion*, “núcleo bien formado” (células con núcleo verdadero). En los procariontes, el material genético está localizado en un cuerpo nuclear o nucleoide, más bien irregular, que no po-

see una membrana que lo rodee. Los eucariontes, por otra parte, tienen un núcleo muy complejo y muy desarrollado, circundado por una membrana nuclear.

Las células más sencillas y pequeñas, aquellas cuyos orígenes son más antiguos, se conocen como procariontes; están constituidas por diferentes familias de microorganismos unicelulares, generalmente llamados bacterias.

Las bacterias en la naturaleza se localizan en una gran variedad de entidades ecológicas y evolutivamente se clasifican en dos grupos: 1) las eubacterias o bacterias verdaderas; 2) las arqueobacterias o bacterias antiguas.

Las células eucariontes son más grandes que las procariontes y su estructura interna es más compleja.

Las características de estos dos grupos son comparadas y contrastadas en la *tabla 1* y la *figura 4*, en donde se puede observar que los procariontes tienen una organización más simple y son menos especializados que los eucariontes.

Clasificación taxonómica de los seres vivos

De los sistemas de clasificación propuestos, el de los cinco reinos es el que ha sido más ampliamente aceptado. Este sistema fue propuesto por H. Whittaker, quien divide el mundo viviente en los siguientes reinos: *Plantae*, *Animalia*, *Protista*, *Hongos* y *Monera*. De acuerdo con las relaciones filogenéticas existentes entre los cinco reinos, se considera que todos ellos han descendido de un ancestro común. El sistema toma en cuenta las profundas diferencias entre procariontes y eucariontes, incluyendo su organización: unicelular colonial o multicelular. De igual modo, se consideran los hábitos alimentarios: de absorción, de ingestión, de fotosíntesis o combinaciones de éstos.



Cuadro 2

Algunos de los sucesos más importantes de la teoría del origen por simbiosis de los organelos de los eucariontes (Margulis, 1967)

Heterótrofo anaerobio	Heterótrofo aeróbico		Espiroqueta			
Glucolítico probablemente	Precursor mitocondrias*	Precursor cilios*				
Amibioide o con pared celular*						
	Heterótrofo amibio de aerobio*					
	Cíclica**					
					Amiboflagelado heterótrofo aerobio**	
Autótrofo de fosforilación no cíclica*						
	Amiboflagelado autótrofo de fotofosforilación cíclica					
	Planta			Animal		Hongo

*Monera.

**Protista.

El reino Monera está formado por procariontes unicelulares y coloniales. Incluyen una amplia variedad de bacterias, cianobacterias, Rickettsia y Chlamydia. La mayor parte de estos organismos tienen una nutrición por absorción, aunque unos pocos son fotosintéticos. Su reproducción es principalmente asexual y sólo algunas especies se reproducen sexualmente.

El reino de los Hongos incluye hongos, mohos, levaduras y mixomicetos. Su tamaño va desde el microscópico hasta el de organismos que pesan varios kilos. Son eucariontes, poseen pared celular y pueden ser uni o multicelulares. No hay representantes fotosintéticos. Su nutrición se lleva a cabo por absorción.

El reino Protista está constituido por protozoarios y algas unicelulares, aisladas o en colonias. Su bioquímica y biología celular es verdaderamente única y variable entre ellos. Los protistas son eucariontes y obtienen sus nutrientes de varios modos, incluyendo absorción, ingestión, fotosíntesis y sus combinaciones; se reproducen asexual y sexualmente.

El reino Plantae está constituido por las plantas típicas y la mayor parte de las algas. Son eucariontes multicelulares, fotosintéticos en su enorme mayoría; organismos sésiles con un elevado grado de organización estructural y funcional, y poseen ciclos de vida complejos con formas de reproducción sexual y asexual.



Tabla 1

**Comparación de las características
de las células procariontes y eucariontes**

Característica	Células procariontes	Células eucariontes
Organismos	Bacterias, cianobacterias	Protistas, hongos, plantas y animales
Tamaño de las células	1-10µm	10-100µm
Metabolismo	Anaeróbico o aeróbico	Aeróbico
Organelos	Pocos o ninguno	Núcleo, RER, mitocondrias, cloroplastos, etcétera
ADN	ADN circular en el citoplasma	ADN lineal muy largo que contiene a muchas regiones no codificantes; limitado por una envoltura nuclear
ARN proteínas	ARN y proteínas en algunos compartimentos	Síntesis y procesamiento del ARN en el núcleo, síntesis de proteínas en el citoplasma
Citoplasma	No citoesqueleto, citoplasma acuoso, exocitosis ausente	Citoesqueleto compuesto por proteínas filamentosas; citoplasma acuoso, endo y exocitosis
División celular	Separación de cromosomas a través de su unión a la membrana plasmática. Fisión binaria	Cromosomas separados por el huso mitótico
		Mitosis y meiosis
Organización celular	Principalmente unicelular	Principalmente multicelular, con la diferenciación de muchos tipos celulares

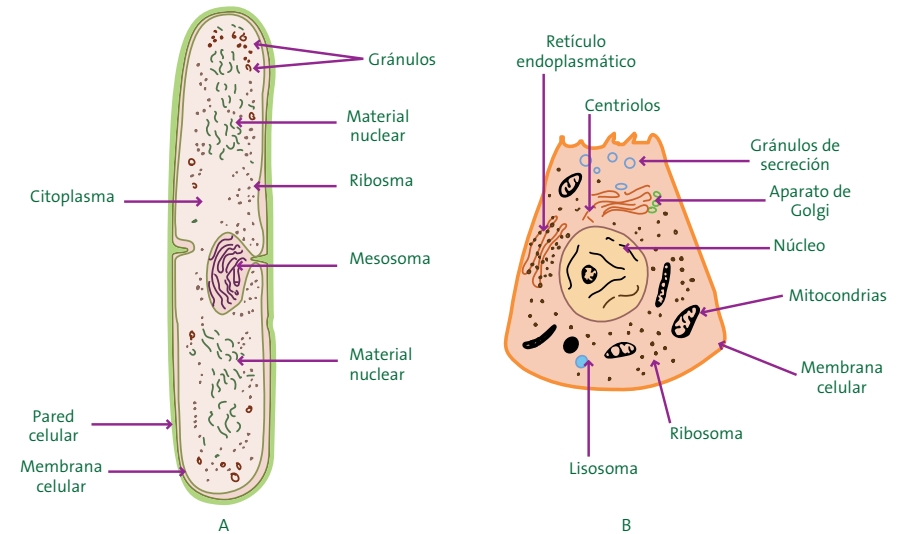


Figura 4. Diagrama esquemático de (A) una célula procarionte, (B) una célula eucarionte.

El reino Animalia incluye todos los animales, desde las esponjas hasta los mamíferos. Sus células son eucariontes, delimitadas por membranas flexibles sin pared celular. Todos son multicelulares y móviles. Poseen nutrición ingestiva y se reproducen por procesos sexuales y/o asexuales.

Organización estructural y funcional de las células eucariontes

Las células eucariontes por definición, y en contraste con las células procariontes, poseen un núcleo, el cual contiene a casi todo el ADN celular rodeado por una doble membrana. Por lo tanto, el ADN está mantenido en un compartimento separado del resto del contenido de la célula.



la, el citoplasma, donde ocurren muchas de las reacciones metabólicas. Además, en el citoplasma distintos organelos pueden ser reconocidos. Se distinguen entre ellos dos tipos de pequeños cuerpos: los cloroplastos y las mitocondrias, cada uno de los cuales está rodeado por una doble membrana que es bioquímicamente diferente de las membranas que rodean al núcleo. Las *mitocondrias* son casi un rasgo universal de las células eucariontes, mientras que los *cloroplastos* se encuentran sólo en las células eucariontes que son capaces de realizar la fotosíntesis. Se cree que las mitocondrias y los cloroplastos son de origen bacteriano. La función de las mitocondrias es oxidar los combustibles celulares y producir ATP, y los cloroplastos captan la energía luminosa para convertir el CO_2 en glucosa. Otros organelos eucarióticos son el *retículo endoplasmático*, cuya función es la síntesis y transporte de lípidos y proteínas de membrana. El *aparato de Golgi*, otro organelo membranoso, está involucrado en la modificación, clasificación y empaquetamiento de macromoléculas de secreción o moléculas que pasarán a otros organelos, como la membrana plasmática y los lisosomas. En la digestión intracelular también están involucrados los *lisosomas*, estructuras que contienen enzimas hidrolíticas, y los *peroxisomas*, con enzimas oxidativas que generan y destruyen peróxido de hidrógeno. El citoplasma de las células eucariontes tiene asimismo un *citoesqueleto* constituido por una red interconectada de proteínas filamen-

tosas (microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios), que da a la célula su forma y le proporcionan una base para su movimiento. Muchas células animales poseen cilios y flagelos, cuya actividad propulsora se debe a su contenido de microtúbulos. Las células eucariontes contienen además *ribosomas*, algunos libres y algunos unidos a la superficie del *retículo endoplasmático rugoso*. Los ribosomas, de manera individual o como polisomas (conjunto de ribosomas unidos por una molécula de ARN mensajero), no se consideran organelos, ya que estos últimos están formados por una membrana.

Bibliografía

- Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts, Walter P. Cells and genomes: The molecular biology of the cell. 5ª ed. Nueva York (EE.UU.): Garland Science, 2008: 1-44.
- Mullock BM, Luzco JP. Georgetown, Tex.: The biogenesis of cellular organelles. En Mullins Chris (ed.) Landes Bioscience/Eurekah.com; Nueva York (EE.UU.): Kluwer Academic/Plenum, 2005: 1-13.
- Polaino LJ. Ciencia y futuro: El origen de la vida. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar>
- http://mx.kalipedia.com/ciencias-vida/tema/teorias-modernas-origen-vida.html?x=20070417klpcnavid_349.Kes

2

Membranas celulares



Capítulo 2

Membranas celulares

Icela Palma Lara

Objetivos temáticos

- Funciones y estructura.
- Sistemas de transporte membranar.
- Uniones celulares.

Introducción

La célula, tanto procarionte como eucarionte, está rodeada por una estructura llamada *membrana plasmática* que no sólo representa el límite entre el medio extracelular y el intracelular, sino también funciona como una barrera selectiva para la entrada y salida de diversas sustancias, controlando de esta manera el contenido químico y el ambiente interno de la célula. Esta membrana se encuentra constituida por proteínas y lípidos, estos últimos dispuestos en forma de bicapa. Algunas proteínas contenidas en la membrana plasmática pueden mediar el paso de iones y el tráfico selectivo de las moléculas al interior o exterior de la célula. Las señales provenientes del medio y la interacción intercelular en organismos multicelulares son controladas por cierto tipo de proteínas y elementos presentes en la membrana. Las proteínas actúan como receptores específicos que permiten a la célula establecer relación con los mensajeros químicos y emitir respuestas adecuadas. Por lo anterior, queda claro que la

membrana celular participa aislando el contenido celular de su entorno y mediando la interacción entre la célula y su medio, lo cual resulta esencial para su integridad y eficiencia.

Funciones y estructura

Las células de organismos eucariontes presentan una estructura continua denominada “membrana celular” que rodea al citoplasma y lo aísla de la matriz extracelular. Se considera que la membrana plasmática tiene un espesor aproximado de 7.5 a 10 nm y se encuentra dispuesta en una bicapa lipídica que contiene proteínas, colesterol y oligosacáridos. La membrana es altamente organizada y asimétrica, presenta dos caras con diferentes topografía y funciones, además de ser altamente dinámica por adaptarse de manera constante a las condiciones y cambios de su entorno (*figura 1*).

Funciones

Barrera selectivamente permeable

Los componentes de la membrana celular en conjunto forman una barrera selectiva que permite la entrada y salida de sustancias, y al limitar el

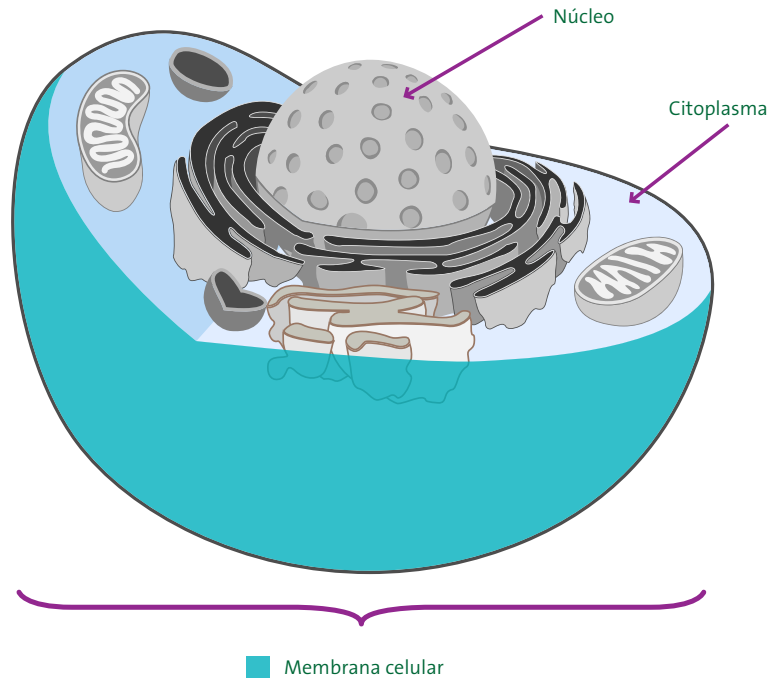


Figura 1. Representación esquemática de la membrana celular que rodea a la célula y sus componentes.

transporte de algunos iones o moléculas al interior o exterior de la célula ayudan a mantener el ambiente interno, que es muy diferente del fluido extracelular. Algunas moléculas pueden atravesar la membrana sin ayuda, como las del agua, las no polares y algunas polares pequeñas; no obstante, la membrana constituye una barrera osmótica que impide el paso de sustancias hidrosolubles y el libre flujo de material hacia el interior de la célula. Los compuestos polares como los aminoácidos, los ácidos orgánicos y las sales inorgánicas no pueden ingresar a la célula sin un transportador específico de tipo proteínico.

Transporte de solutos dentro y fuera de la célula o dominio subcelular

La membrana posee mecanismos para transportar físicamente sustancias de uno a otro de sus lados. Muchas de las proteínas de membrana funcionan como transportadores selectivos que favorecen el contacto del medio externo con el citoplasma o entre los dominios subcelulares. A menudo requieren energía para el movimiento de los compuestos a través de la membrana. Estos mecanismos permiten establecer gradientes iónicos, necesarios para mantener la polaridad de la membrana; facilitar la acumulación de los nutrientes necesarios para la elaboración de sus macromoléculas, y poseer una reserva energética. Las células eucariontes son capaces de captar macromoléculas y partículas del medio que las rodea o verterlas del medio intracelular al extracelular a través de procesos conocidos como endocitosis y exocitosis, donde la membrana celular participa activamente.

Compartimentación de dominios celulares o microdominios

Dentro de las células eucariontes, los organelos –como el núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas y otros– poseen membranas que mantienen la autonomía y las diferencias características del contenido de cada uno de ellos y del citosol. Las membranas que envuelven a las mitocondrias forman un espacio o *microdominio* en el cual tienen lugar actividades especializadas que requieren un mínimo de interferencia externa (*figura 2*).

Transducción de energía

Muchas células realizan procesos que convierten un tipo de energía en otro, denominados transducción de energía. Las membranas participan

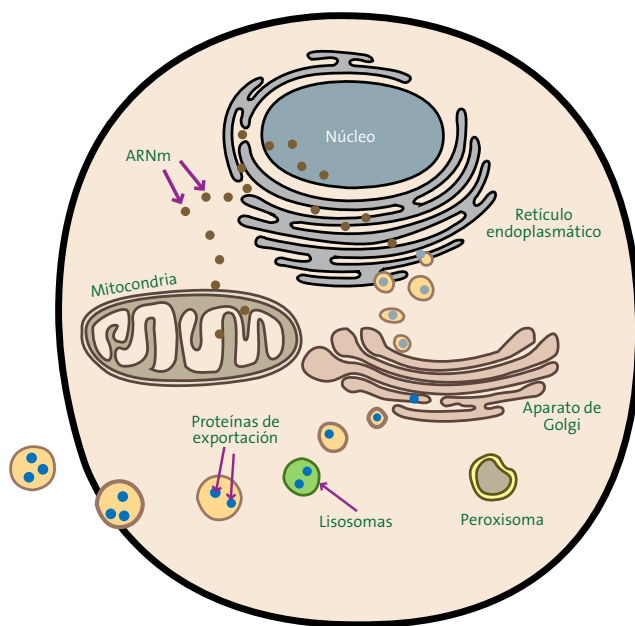


Figura 2. Esquema que representa la compartimentación y dominios celulares.

en los procesos respiratorios para la obtención de energía. Durante la respiración son liberados algunos compuestos orgánicos e inorgánicos que contienen electrones de alta energía que se dirigen hacia la membrana, donde son llevados hacia una serie de acarreadores, generando un gradiente electroquímico de protones que viajan hacia el exterior de la célula. Este gradiente de protones provee a la membrana de una energía que puede utilizarse como fuerza motora o ser canalizada hacia una proteína especial conocida como ATP sintetasa, que en ocasiones convierte ADP en ATP. Las células que realizan el proceso de fotosíntesis tienen pigmentos unidos a la membrana del cloroplasto que absorben la energía de la

luz solar y la transforman en energía química, almacenada como carbohidratos. Las membranas también participan en la transferencia de energía química de las grasas y carbohidratos al ATP.

Respuesta a señales externas

La respuesta de una célula a los estímulos externos es un proceso conocido como transducción de señales. La membrana plasmática tiene una función muy importante en este proceso debido a que posee receptores que se unen a moléculas complementarias específicas llamadas *ligandos*. Según su tipo, las células tienen membranas con diferentes receptores y, por lo tanto, pueden reconocer y responder a distintos ligandos de su ambiente. Los ligandos mejor conocidos son *hormonas*, *neurotransmisores* y *factores de crecimiento*, que se unen a los receptores de membrana pero no pasan a través de ella. La interacción de un receptor de membrana con su ligando en ocasiones provoca que la membrana genere una nueva señal que estimula o inhibe las actividades internas de la célula, o la creación de una serie de señales en cascada que modifica el comportamiento celular.

Interacción intercelular

La membrana plasmática puede regular las interacciones entre las células de un tejido u organismo multicelular; permitir a las células reconocerse entre sí; adherirse cuando es apropiado; inhibir su división, e intercambiar materiales e información.

Sitios de actividades bioquímicas

Las membranas proporcionan a la célula el armazón necesario para organizar las actividades celulares. La unión de enzimas en complejos multienzimáticos facilita la secuencia de una reacción debido a que cada enzima se sitúa en el lugar correcto y en el momento adecuado.



Punto de anclaje para el citoesqueleto y elementos extracelulares

Los elementos extracelulares que rodean la célula (llamada matriz extracelular) y el *citoesqueleto*, que consiste en una estructura tridimensional dinámica presente en el citoplasma, se encuentran unidos a la membrana plasmática, con lo cual proporcionan a la célula estabilidad y forma.

Formas especializadas de unión que proporcionan adhesión o comunicación celular

Aunque las uniones celulares son especialmente abundantes en el tejido epitelial, también se localizan en regiones de contacto entre célula-célula y célula-matriz. Ambas muestran que las regiones de las membranas plasmáticas que participan son altamente especializadas, por lo que proporcionan un sellado entre las células o permiten la interacción a través del paso de señales químicas o eléctricas entre células adyacentes.

Capacidad de movilidad celular y organelos

Los elementos que componen el citoesqueleto interactúan con la membrana plasmática permitiendo movimientos tales como el deslizamiento de las células sobre un sustrato, cambios de forma de la célula o movimientos intracelulares como el transporte de organelos de un lugar a otro del citoplasma.

Estructura

Estudios realizados sobre la membrana plasmática de los glóbulos rojos (eritrocitos) proporcionaron la primera evidencia de que las membranas biológicas estaban constituidas por una bicapa lipídica. En 1925 los científicos holandeses E. Gorter y R. Grendel extrajeron los lípidos de membra-

na de los glóbulos rojos, que en su conjunto tenían una área específica; al ser puestos sobre una superficie de agua (interfase de aire-agua) formaron una mancha que correspondía a una monocapa lipídica cuya área era del doble que la de los glóbulos rojos. Estos resultados llevaron a la conclusión de que las membranas estaban constituidas por bicapas lipídicas en lugar de por monocapas, como antes se creía.

Los primeros modelos propuestos para describir la estructura de la membrana fueron conocidos en 1935 por Hugo Davson, del University College de Londres y por James Danielli, de la Universidad de Princeton, quienes plantearon que las proteínas de la membrana se localizaban en la superficie externa de la bicapa de lípidos (*figura 3*).

Los experimentos efectuados por Jonathan Singer y Garth Nicolson de la Universidad de California condujeron a un nuevo concepto sobre la estructura de la membrana, denominado *Modelo del mosaico fluido*, el

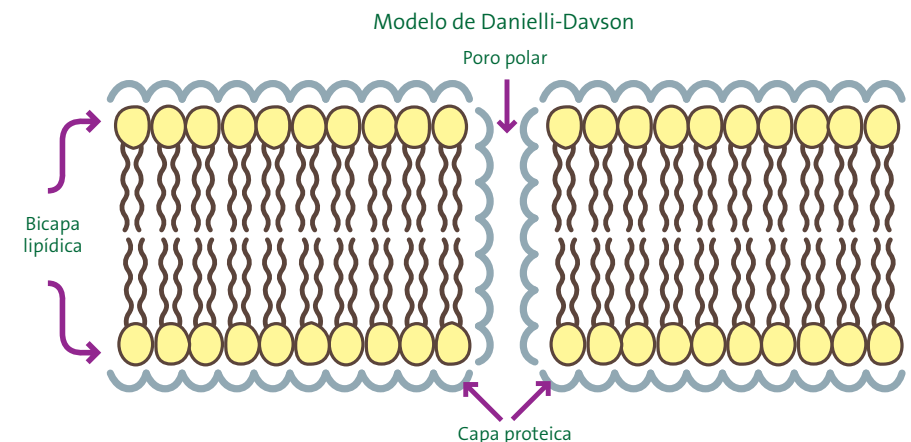


Figura 3. Representación del modelo de membrana descrito por Hugo Davson y James Danielli donde proponen que la bicapa está cubierta por una capa proteica.



cual modificó radicalmente el dogma central de la biología de la membrana que durante décadas consideró a la membrana como una bicapa inmóvil y estática (figura 4).

En este modelo se presta atención al estado físico de los lípidos, los cuales presentan capacidad de girar y efectuar desplazamientos laterales dentro de la membrana. La estructura y disposición de las proteínas de membrana en el modelo de mosaico fluido se presentan como un mosaico de partículas discontinuas que penetran y atraviesan la bicapa. Estudios recientes confirman y apoyan este modelo que considera que las membranas celulares son estructuras dinámicas cuyos componentes son movibles, con capacidad para reunirse y participar en interacciones transitorias o semipermanentes, como el autoensamblaje y autosellado que

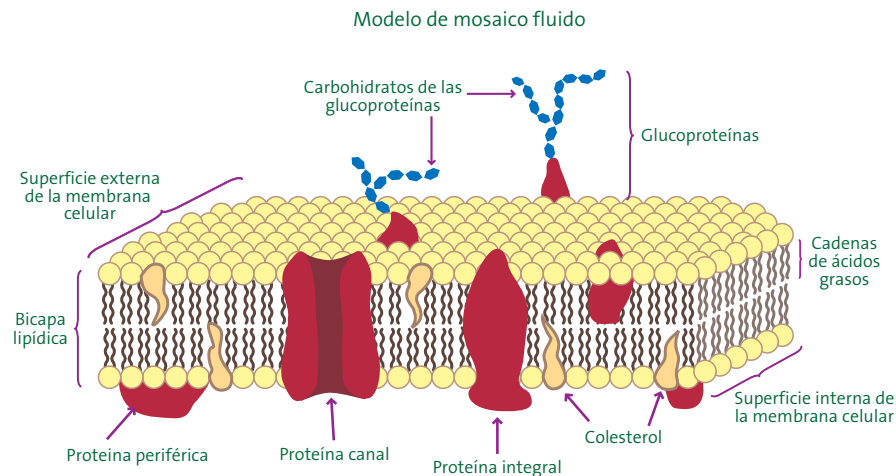


Figura 4. Esquema del modelo de Jonathan Singer y Garth Nicholson (1972), donde sugieren que la membrana es una estructura dinámica y asimétrica.

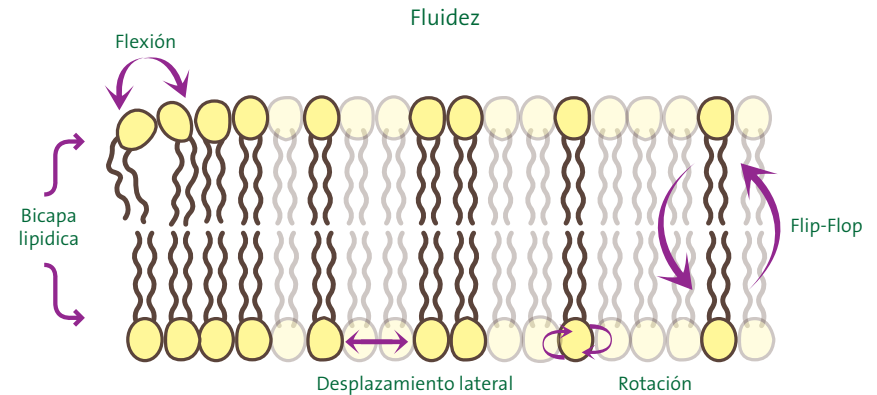


Figura 5. Esquema que muestra los diferentes movimientos que poseen los fosfolípidos y que son responsables de dar fluidez a la membrana.

se da cuando los fosfolípidos se encuentran en medio acuoso y tienden a autoensamblarse y a cerrarse sobre sí mismos (figura 5).

Se considera que la membrana celular está constituida por agregados supramoleculares de lípidos, carbohidratos y proteínas.

- Lípidos: en forma de bicapa
 - fosfolípidos
 - colesterol
- Carbohidratos: unidos a lípidos y proteínas
 - glucolípidos
 - glucoproteínas
- Proteínas:
 - integrales
 - periféricas
 - ancladas a lípidos



Bicapa lipídica

La observación de las membranas se realiza a través de un microscopio electrónico debido a que no es visible con el microscopio óptico por ser una estructura sumamente fina (7.5-10 nm, aprox). La membrana da una apariencia trilaminar con dos bandas densas separadas por un espacio intermedio, esto ocurre porque la bicapa de lípidos se coloca de tal forma que los grupos polares de los fosfolípidos (hidrófilos) son orientados hacia el exterior de la membrana, mientras que el ácido graso del lípido (hidrófobo) lo hace hacia la parte media de la estructura trilaminar (*figura 6*).

Gracias a las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de los fosfolípidos que conforman la membrana, cuando éstos se colocan en un medio acuoso se pueden arreglar en una bicapa, con lo cual se mantienen unidos por enlaces no covalentes y forman estructuras íntegras y continuas. Esta propiedad *anfipática* de la membrana, que permite la disposición en bicapa, es la responsable de la estructura flexible de la célula, necesaria en procesos como la locomoción y división celular (*figura 7*).

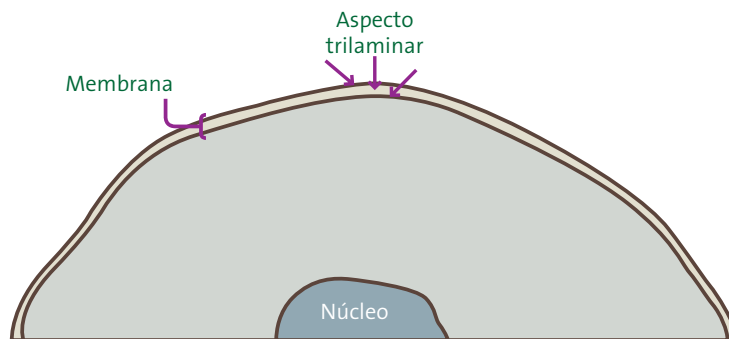


Figura 6. Dibujo que muestra el aspecto trilaminar de las membranas que se observa en fotografías de microscopía electrónica.

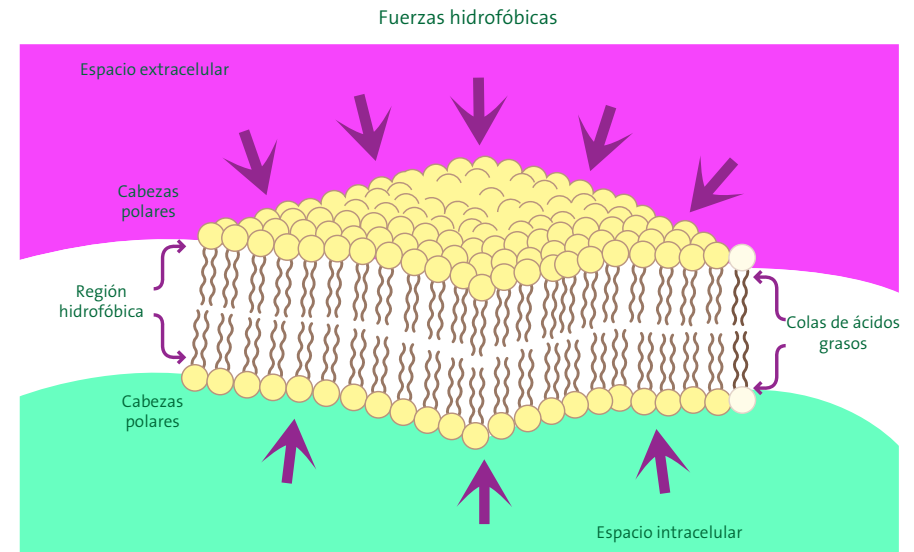


Figura 7. Representación esquemática de la disposición de la bicapa de fosfolípidos unidos por enlaces no covalentes, donde las flechas representan la fuerza que ejerce el líquido acuoso para mantenimiento de la estructura.

La composición molecular de la membrana es diferente entre lípidos y proteínas, según el tipo de membrana celular, tipo de organismo y tipo de célula. Por ejemplo, la relación de proteínas/lípidos en la membrana interna de las mitocondrias es más alta debido a que posee proteínas de la *cadena de transporte de electrones* (o *cadena respiratoria*) y su contenido de lípidos es menor en relación con otras membranas.

Fosfolípidos

La mayor parte de los lípidos que componen la membrana son fosfolípidos, estos conformados por dos *ácidos grasos* unidos a una molécula de *glicerol* (diglicéridos), donde el tercer carbono de éste se encuentra ligado



a un grupo fosfato, que a su vez puede estar unido a otra molécula polar pequeña como la colina, serina, etanolamina o inositol. La mayoría de los fosfolípidos que poseen glicerol son denominados *fosfoglicéridos*, y dependiendo de la molécula polar que se une se llamarán *fosfatidilcolina*, *fosfatidilserina*, *fosfatidiletanolamina* o *fosfatidilinositol*. Frecuentemente los fosfoglicéridos de membrana contienen una cadena lipídica acilo insaturada —que contiene uno o más dobles enlaces en su cadena— y una saturada —que carece de dobles enlaces (figura 8). Los fosfolípidos se encuentran en ambos lados de la membrana aunque algunos son más negativos como la esfingomieline y fosfatidilcolina por lo que se encuentran en la capa externa de la membrana.

El único fosfolípido que no contiene glicerol es la *esfingomieline*, la cual contiene dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo polar de *esfingocina* unida a una *colina*. Estos fosfolípidos se distribuyen de manera asimétrica en cada lado de la bicapa; es más frecuente la presencia de esfingomieline y fosfatidilcolina en la capa externa y, al estar cargados negativamente, contribuyen a la carga neta negativa de la cara citosólica de la membrana plasmática. La fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina son fosfolípidos predominantes en la capa interna, y aunque el fosfatidilinositol se encuentra en menor cantidad en la capa interna de la bicapa, es importante la función que desempeña en la señalización celular.

Colesterol

El colesterol se encuentra en mayor cantidad en las membranas de células animales, y es menos *anfipático* que los fosfolípidos. La mayoría de las membranas plasmáticas de células vegetales y todas las de las células bacterianas carecen de colesterol. Las moléculas de colesterol, debido a su estructura en anillo rígido, confieren una mayor fortaleza a las membra-

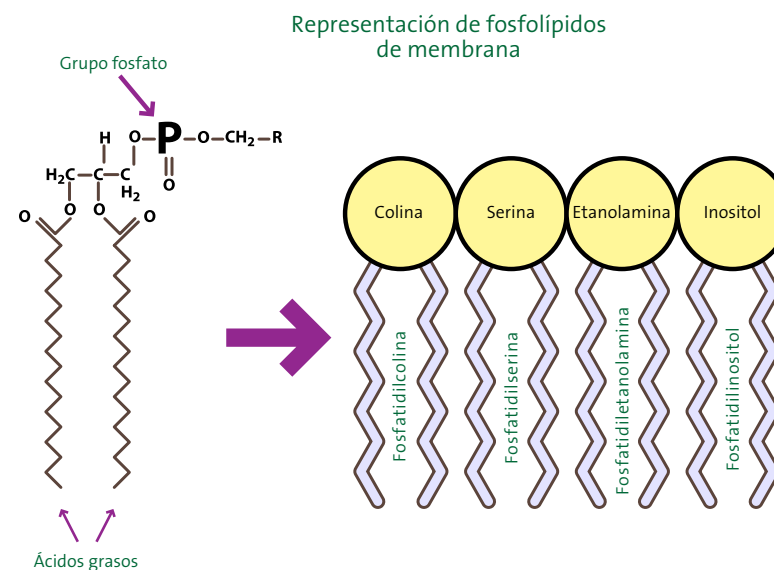


Figura 8. Esquema que muestra la estructura química de un fosfolípido y los diferentes elementos que se unen a él.

nas, aunque disminuyen su flexibilidad. Dependiendo de la temperatura, el colesterol tiene efectos diferentes sobre la fluidez de la membrana; así, en temperaturas altas interfiere con el movimiento de las cadenas de ácido graso de los fosfolípidos, lo que disminuye la fluidez de la parte externa de la membrana y reduce su permeabilidad a las moléculas pequeñas. Si la temperatura es baja, el efecto es opuesto cuando interfiere con las interacciones entre las cadenas de los ácidos grasos, ya que evitan que las membranas se congelen, manteniendo su fluidez (figura 9).

Glucolípidos y glucoproteínas

Otros componentes de ciertas membranas celulares son los *glucolípidos* y *glucoproteínas*. Los glucolípidos son también anfipáticos y se encuentran

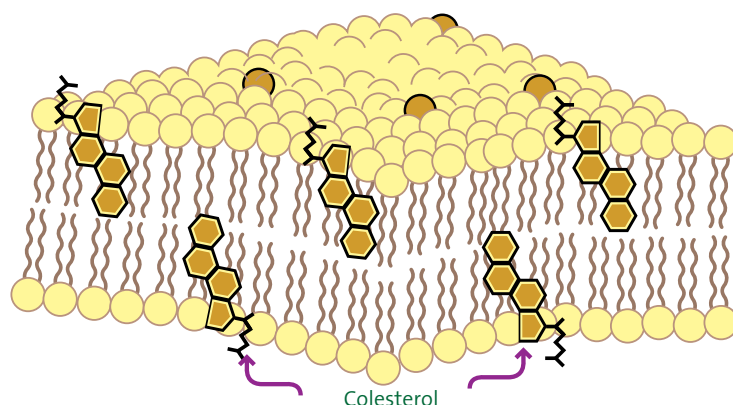


Figura 9. Representación de la disposición del colesterol en las membranas que gracias a su estructura anillada le proporcionan más rigidez.

exclusivamente en la cara externa de la membrana plasmática, donde sus residuos hidrocarbonatos se encuentran expuestos hacia la superficie de la célula. Se considera que constituyen tan sólo de 2 a 5% de los lípidos de la membrana, según la especie y tipo de célula. Estos glucolípidos desempeñan un papel importante en la adhesión entre células y tejidos, y pueden contribuir a la comunicación y reconocimiento entre las células, además de ser blanco de ciertas toxinas bacterianas. Si el carbohidrato que forma parte del glucolípidido es un glúcido simple, se denominará *cerebrósido*, y si es un oligosacárido, será un *gangliósido*. Uno de los principales componentes glucolípidicos de la membrana celular de las fibras nerviosas, que forma parte de la mielina, es el galactocerebrósido.

Las glucoproteínas, también llamadas glicoproteínas, son componentes formados por un carbohidrato unido covalentemente a una proteína. Los carbohidratos asociados a la membrana plasmática son oligosacáridos cortos ramificados, en los que el *ácido siálico* es común en la parte terminal y confiere una carga negativa a estas cadenas. Los glúcidos predo-

minantes en las glucoproteínas son la glucosa, galactosa, manosa, fucosa, GalNAc, GlcNAc y NANA. Los carbohidratos están unidos a componentes proteínicos a través de un *enlace O-glucosídico* o *N-glucosídico*. El enlace O-glucosídico se presenta en el grupo hidroxilo de la serina, treonina o hidroxilisina, y el N-glucosídico, a través del grupo amino de la asparagina; este último es el enlace predominante en las glucoproteínas de las células de los mamíferos. Estas glucoproteínas, contienen heteropolisacáridos conocidos como glucosaminoglucanos, que forman parte de la *matriz extracelular*, así como de los fluidos extracelulares y la pared celular (*figura 10*).

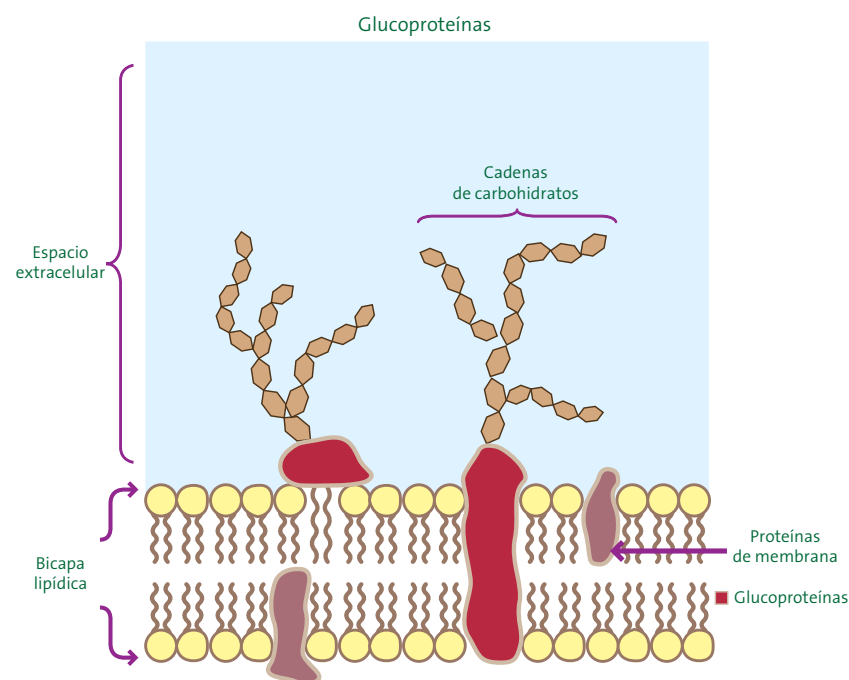


Figura 10. Esquema de glucoproteínas donde se puede observar la disposición de las cadenas de carbohidratos ancladas en proteínas transmembrales y periféricas.



Proteínas de membrana

Las proteínas son una parte muy importante de la membrana celular; poseen una localización específica y asimétrica dentro de la bicapa de lípidos, y proporcionan funciones diferentes para la porción externa e interna de la membrana. Se considera que las proteínas participan en: *a)* mantenimiento de la forma celular, *b)* transporte de sustancias, *c)* reconocimiento de mensajeros químicos, como hormonas y neurotransmisores, *d)* reacciones enzimáticas y *e)* en el movimiento celular.

Las proteínas pueden ser clasificadas en grupos, según la distribución física dentro de la membrana:

1. Proteínas integrales
 - proteínas transmembranales
2. Proteínas periféricas
 - proteínas ancladas a lípidos
3. Las *proteínas integrales o intrínsecas* se encuentran incluidas dentro de la membrana celular. Parte de su cadena polipeptídica interacciona directamente con el núcleo hidrofóbico de la bicapa y puede atravesar más de una vez la matriz lipídica. Las fuerzas que mantienen intercaladas las proteínas a la matriz lipídica son precisamente las *interacciones hidrofóbicas*. Gran parte de estas proteínas son glucoproteínas que pueden contener uno o más carbohidratos, localizados principalmente en la superficie externa de la membrana. Varios receptores de membrana son glucoproteínas que participan en la señalización, adherencia y reconocimiento celular. La mayoría de las proteínas tiene una posición estable en la membrana, gracias a las interacciones con

el citoesqueleto. Sin embargo, algunas proteínas integrales se mueven y aumentan en una región específica de la membrana, de acuerdo con la actividad de cada tipo celular (*figura 11*).

4. Las *proteínas periféricas o extrínsecas* se encuentran asociadas a la superficie externa o interna de la membrana por enlaces relativamente débiles. El hidrato de carbono de glucoproteínas y glucolípidos se encuentra en la superficie externa de la membrana celular, donde son parte importante de la estructura como receptor. Los receptores son necesarios en la señalización, adherencia y reconocimiento celular.

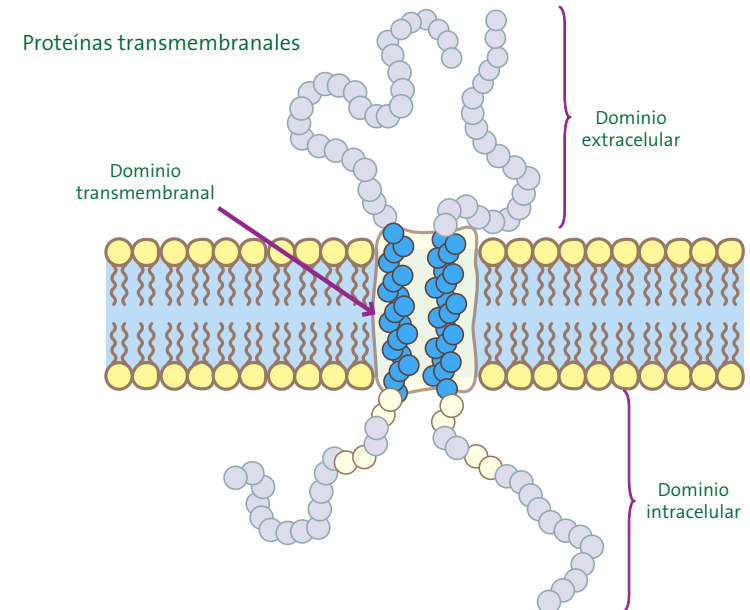


Figura 11. Representación de una proteína transmembranal con sus dominios extra e intracelulares y su asociación a la matriz hidrofóbica.



La mayoría de las proteínas presenta un lugar determinado dentro de la membrana celular, por las interacciones con el citoesqueleto. Sin embargo, algunas proteínas integrales pueden moverse a lo largo de la membrana e incluso concentrarse en una región particular de ésta, en un proceso conocido como *capping* (figura 12).

Lo anterior nos deja en claro que la membrana celular no es estática. Se remodela por la suma de nuevas vesículas provenientes del aparato de Golgi, así como por vesículas de las vías pinocíticas y fagolisosomales que se forman y funden con la membrana. A menudo, muchos de los recepto-

res membranales internalizados se reciclan en la membrana plasmática, en un proceso cuyo objetivo recae en la economía celular.

Funciones de las proteínas de membrana

- **Canales:** proteínas integrales (generalmente glucoproteínas) que permiten el paso de las moléculas a través de la membrana.
- **Transportadoras:** son proteínas que cambian de forma para dar paso a determinados productos, como solutos orgánicos e inorgánicos y nutrientes en general.
- **Receptores:** son proteínas integrales que reconocen determinadas moléculas (conocidas como ligando) a las que se unen o fijan.
- **Enzimas:** pueden ser integrales o periféricas, formar complejos enzimáticos o actuar como activadores de vías de señalización.
- **Anclajes del citoesqueleto:** son proteínas periféricas que le confieren estabilidad a las proteínas del citoesqueleto.
- **Marcadores de la identidad de la célula:** son glucoproteínas y glucolípidos característicos de cada individuo, que les confieren una identidad orgánica y permiten detectar células provenientes de otro organismo. Dichas glucoproteínas y glucolípidos presentan cadenas de carbohidratos orientadas hacia el exterior, que forman una cubierta conocida como *glucocáliz* (figura 13).

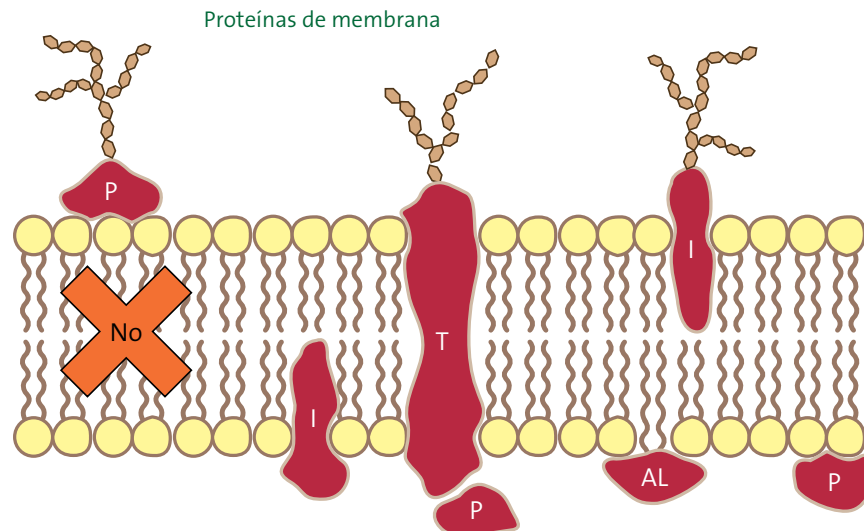


Figura 12. Esquema que muestra las diferentes proteínas de membrana.

Las asociaciones que se muestran son con la matriz lipídica en el caso de las proteínas transmembranales (T), integrales (I). Para el caso de proteínas periféricas (P) se asocian a la porción polar del fosfolípido, así como las asociadas a lípidos (AL). No es posible que las proteínas de membrana se localicen únicamente con la matriz lipídica como se muestra en el esquema (NO).

Glucocáliz (o glucocáliz)

Como ya se mencionó, esta estructura está constituida por glucoproteínas y glucolípidos, además de contener glucosaminoglicanos que forman una capa adherida a la superficie externa de la membrana plasmática. Entre las funciones específicas del glucocáliz se encuentran la de proteger a las células contra la acción enzimática del medio extracelular; la recepción de toxinas, virus y bacterias, y favorecer la permeabilidad, el re-

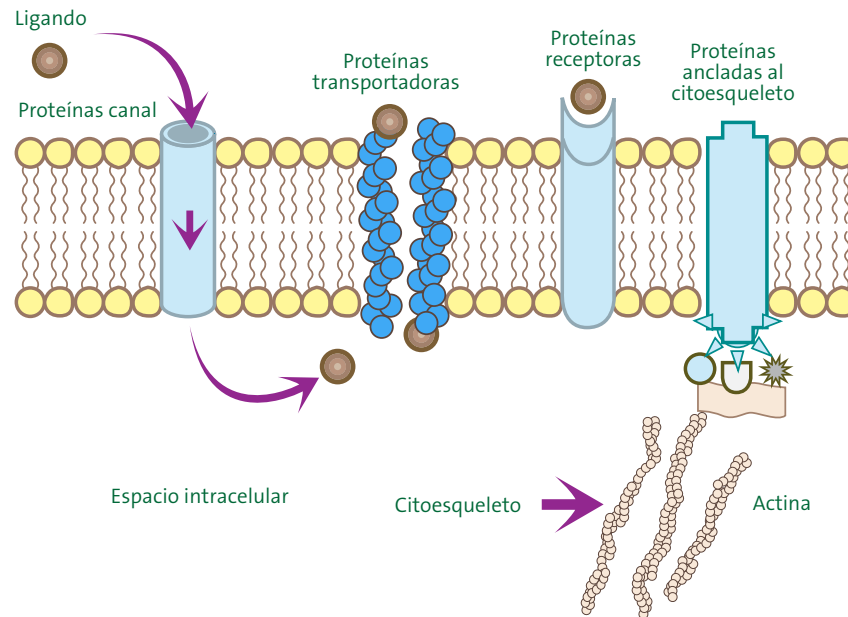


Figura 13. Representación esquemática de las diferentes funciones de las proteínas de membrana en el transporte de moléculas.

conocimiento celular, la inhibición por contacto, la inmunohistocompatibilidad, el control de la vida mediante la división celular y la fecundación.

Sistemas de transporte membranar

Las células necesitan incorporar nutrientes del exterior y eliminar las sustancias de desecho originadas por la actividad metabólica intrínseca para mantener estable su medio interno. Se sabe que la membrana celular presenta una *permeabilidad selectiva*, ya que permite el paso de pequeñas moléculas, siempre que sean solubles en lípidos (lipofílicas), pero regula

el paso de las moléculas poco o nada solubles en lípidos. De esta manera, las sustancias que pueden atravesar la membrana celular se agrupan en solventes, solutos y complejos macromoleculares, cada uno de los cuales presenta un mecanismo de transporte específico. De acuerdo con el mecanismo que utilizan algunas moléculas para atravesar la membrana plasmática, se han clasificado en:

- *Uniporte*. Sustancia que pasa por sí misma la membrana, en una dirección.
- *Cotransporte*. Sustancia que facilita el paso de otra al mismo tiempo.
- *Simporte*. Sustancia que facilita el paso de otra que lleva la misma dirección.
- *Antiporte*. Sustancia que facilita el paso de otra pero en diferente dirección, o direcciones opuestas (*figura 14*).

La necesidad de medios de transporte para permitir el paso a *solutos* impermeables a la membrana se origina cuando la concentración del soluto hacia el lado que se transporta es más alta (gradiente químico); o bien, la carga eléctrica del soluto hacia el lado que se transporta es más alta (gradiente eléctrico).

Ósmosis

El paso de *solventes*, como el agua, a través de una membrana semipermeable se presenta de una región de baja concentración de solutos hacia otra de alta concentración. Así, puede haber *medios hipotónicos* en los que la concentración del soluto es baja dentro del compartimento celular, o bien, *medios hipertónicos*, en cuyo caso la concentración del soluto es alta ahí mismo.

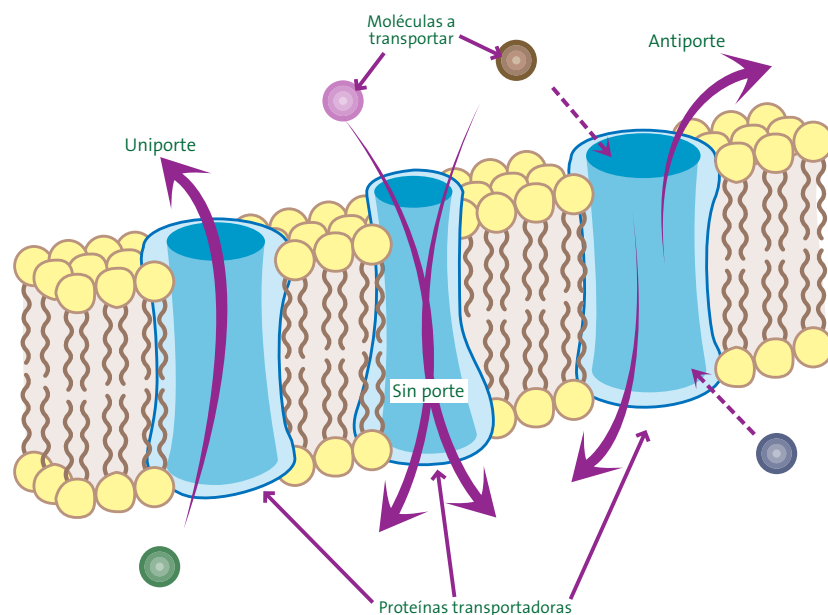


Figura 14. Esquema de los diferentes mecanismos de transporte membranar que se utilizan de acuerdo a las características bioquímicas de las moléculas a transportar.

Transporte pasivo

Algunos solutos pueden atravesar la membrana celular mediante el *transporte pasivo*, en el cual se presentan procesos espontáneos de difusión simple o facilitada. Este transporte se produce siempre a favor del gradiente, es decir, de una región de mayor concentración de solutos hacia una región de menor concentración, que finaliza cuando se elimina la diferencia de concentraciones entre ambas regiones.

Difusión simple

Es el paso de pequeñas moléculas a favor del gradiente y puede realizarse a través de la bicapa lipídica o de canales proteínicos. El gradiente que se

presenta en ambos lados de una membrana puede ser un *gradiente químico* cuando la diferencia de concentración es ocasionada por solutos sin carga (como el oxígeno y nitrógeno atmosférico). El *gradiente eléctrico* se presenta cuando algunas moléculas muy pequeñas tienen carga eléctrica neta (como el agua, CO_2 , etanol, glicerina, urea), o bien, el *gradiente electroquímico* en donde se conjuntan las dos propiedades en los solutos. De esta manera, muchas moléculas como las *hormonas esteroideas*, *anestésicos* como el éter y *fármacos liposolubles* pueden ganar acceso al interior celular.

Difusión simple a través de canales

Este tipo de transporte se realiza a través de las denominadas *proteínas de canal* y permite el paso de *iones* como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- . Algunas proteínas de canal son *dependientes de ligandos* específicos, como ocurre con los neurotransmisores u hormonas, que se unen a una región membranar determinada. Algunas otras proteínas de canal son *dependientes de voltaje*, en el cual el receptor de la proteína de canal sufre una transformación estructural que induce la apertura del canal (como ocurre en la transmisión de los impulsos nerviosos). Finalmente, también hay proteínas de canal *dependientes de concentraciones iónicas*, de tal manera que el ión Ca^{2+} provoca la abertura del canal, que permite el transporte del soluto correspondiente.

Difusión facilitada

La *difusión facilitada* permite el transporte de pequeñas moléculas polares, como los *aminoácidos* y *monosacáridos*, las cuales, al no poder atravesar la membrana, requieren algunas *proteínas transmembranales* que les faciliten el paso. Dichas proteínas reciben el nombre de *proteínas transportadoras* o *permeasas*; éstas sufren un cambio en su estructura tridimensional al unirse a la molécula que van a transportar a la que arrastran hacia el interior de la célula (como ocurre en el transporte de la glucosa).



Transporte activo

Hemos visto que algunas proteínas presentes en la membrana ayudan en el transporte selectivo de ciertas moléculas. De manera general, estas proteínas requieren el gasto de energía en forma de ATP para efectuar su función. El *transporte activo* se produce cuando el paso se realiza en contra del gradiente electroquímico. El funcionamiento de la *bomba de Na/K* es un ejemplo excelente de transporte activo, en el cual se requiere una proteína transmembranal que bombea Na^+ hacia el exterior de la membrana y K^+ hacia el interior. Esta proteína actúa contra el gradiente gracias a su actividad como ATPasa, ya que rompe el ATP para obtener la energía necesaria para el transporte.

El funcionamiento de la bomba de sodio/potasio también se fundamenta en el transporte activo, ya que mantiene una clara diferencia en la concentración de iones de sodio en ambos lados de la membrana. Dada esta diferencia, los iones de sodio tienden a entrar al medio intracelular a través de los poros membranales y esta energía potencial se aprovecha para que otras moléculas como la glucosa y los aminoácidos puedan entrar a la célula en contra del gradiente de concentración.

En el transporte activo es frecuente la presencia de proteínas transportadoras, ligandos, receptores y enzimas que están involucradas en el funcionamiento de los canales de transporte. Dichas moléculas pueden ubicarse en el espacio extracelular y el citoplasma; pueden estar entre la membrana fosfolipídica, o bien, abarcar ambos lados membranales (*figura 15*).

Endocitosis

Dentro del transporte de complejos macromoleculares entre la célula y su entorno físico está la *endocitosis*, en la cual una sustancia es transportada

al interior de la célula por varios mecanismos, como la endocitosis mediada por receptor, la pinocitosis y la fagocitosis.

Endocitosis mediada por receptor

Se requiere la unión de una molécula (ligando) a un receptor membranal específico para la formación de vesículas endocíticas, las cuales se trasladan al citoplasma, donde se denominan endosomas.

Pinocitosis

En este proceso no se forman pseudópodos membranales, sino que aparecen *vesículas pinocíticas*, las cuales pueden ser recubiertas por proteínas señalizadoras citoplasmáticas (como la clatrina) para dirigir las a un lugar específico. Generalmente se presenta para el transporte de moléculas muy pequeñas o líquidos extracelulares.

Fagocitosis

Se caracteriza por la formación de estructuras membranales especializadas denominadas *pseudópodos*, las cuales se encargan de *envolver* y *engullir* diversas células o partículas extracelulares originando la formación de vesículas fagocíticas o *fagosomas*. A dichas estructuras se les unen intracelularmente vesículas ricas en contenidos lisosomales (fagolisosomas) que ayudan a la degradación del material fagocitado. Este tipo de transporte o incorporación de macromoléculas o de otras células es común incluso en células mononucleares, como monocitos y macrófagos, y en células polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos).

Exocitosis

En este proceso celular hay un movimiento de las *vesículas de exocitosis* presentes en el citoplasma, las cuales se fusionan con la membrana plasmática para transportar una sustancia hacia el medio extracelular (*figura 16*).

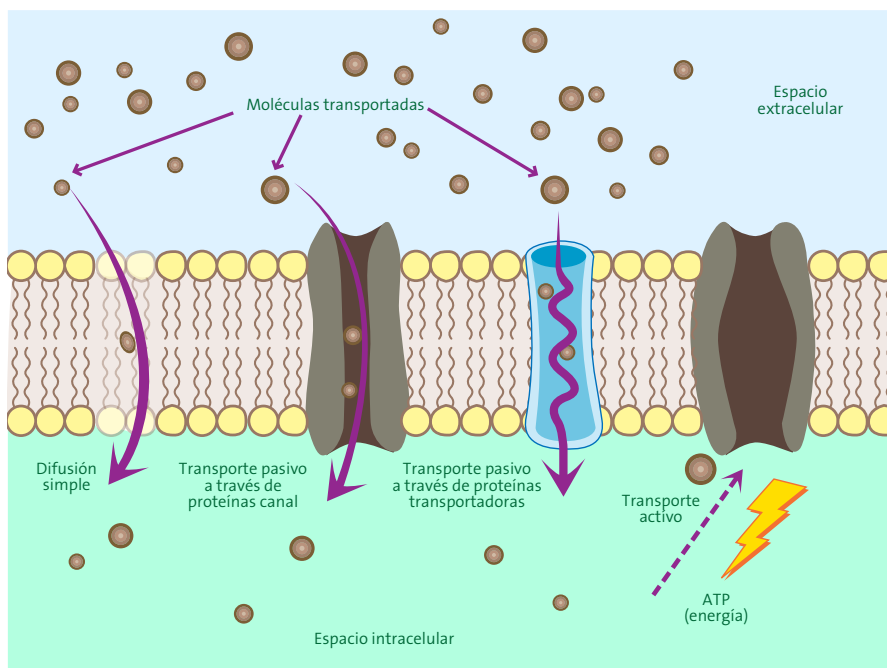


Figura 15. Representación de los diferentes mecanismos de transporte que utilizan proteínas de membrana.

Uniones celulares

De manera general, podemos mencionar que las células de organismos eucariontes pueden establecer regiones de contacto célula-célula y célula-matriz en todos los tejidos, a través de una diversidad de uniones celulares, como son las uniones estrechas, de anclaje y comunicantes (*figura 17 y cuadro 1*).

Uniones estrechas

También son conocidas como *uniones de oclusión* (u *ocluyentes*), estancas, herméticas o *Tight junctions*. En ellas existe una serie de contactos

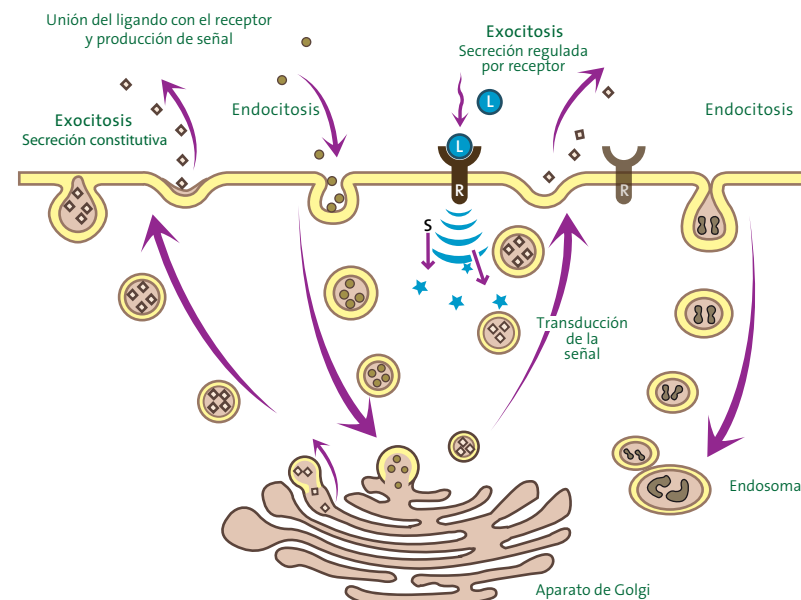


Figura 16. Esquema del transporte de complejos moleculares a través de la membrana. Se representa los eventos de exocitosis mediada por receptor y constitutiva, así como el evento de endocitosis.

Uniones celulares

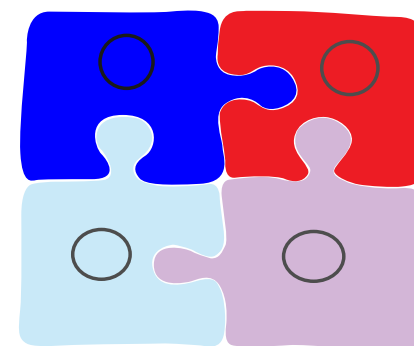
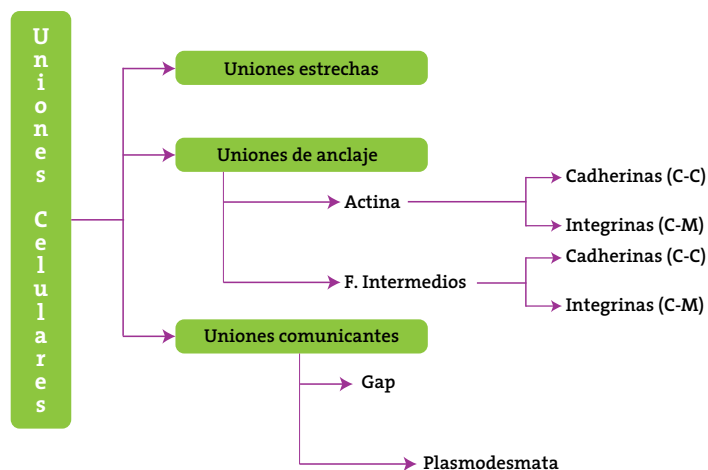


Figura 17. Representación gráfica de la interacción entre células a través de las uniones celulares.



Cuadro 1. Clasificación.

puntuales de las membranas plasmáticas, las caras externas adyacentes convergen y se funden, sellando así el espacio intercelular. Estas uniones forman una barrera de permeabilidad selectiva, evitan el paso de iones y moléculas al espacio entre las células, y participan en el mantenimiento de la polaridad celular. Se han identificado diversos componentes de uniones estrechas, como las moléculas de *occludina*, *claudina*, *espectrina*, *neurexina*, *simplekina*, ZO-1, ZO-2, ZO-3, a y β *catenina*, entre otras (figuras 18, 19 y 20).

Las uniones estrechas también pueden actuar como complejos transductores de señales y como puentes entre proteínas transmembrales y proteínas asociadas al citoesqueleto. Se sabe además que estas uniones están morfológica y funcionalmente asociadas al citoesqueleto. Por otra parte, se ha considerado que son elementos supresores de tumores debido a los contactos intercelulares que establecen y a su relación con proteínas que funcionan como factores transcripcionales en el núcleo.

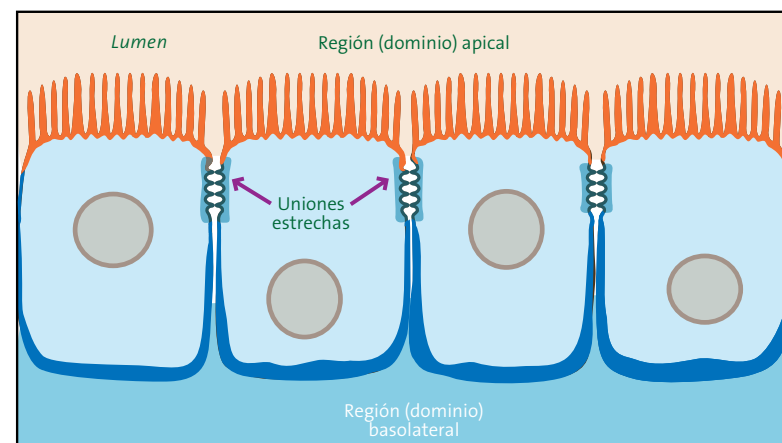


Figura 18. Esquema de la unión estrecha caracterizada por presentarse comúnmente en epitelios en la región apical de la célula.

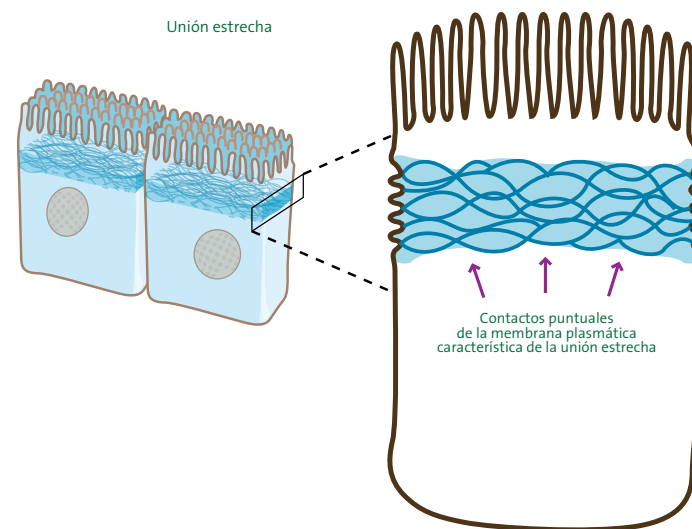


Figura 19. Esquema donde se muestra que las uniones estrechas forman una barrera sumamente selectiva debido a la amplitud de sus contactos puntuales entre células.

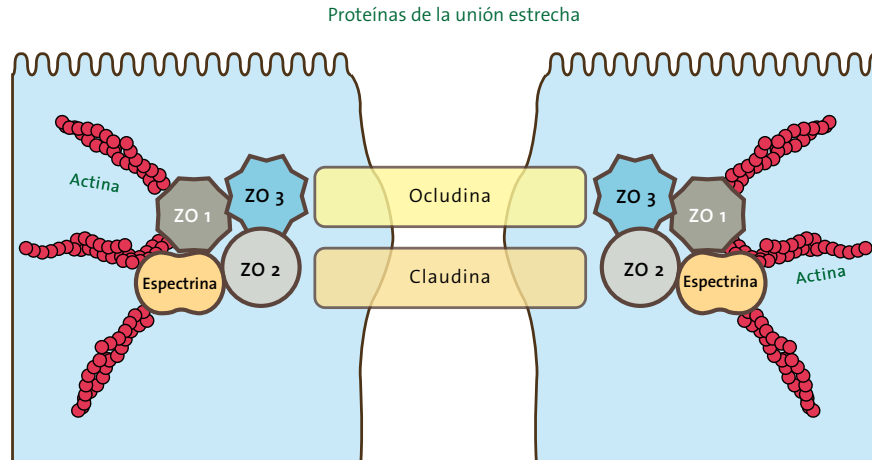


Figura 20. En este esquema se representan las diferentes proteínas que participan en las uniones estrechas.

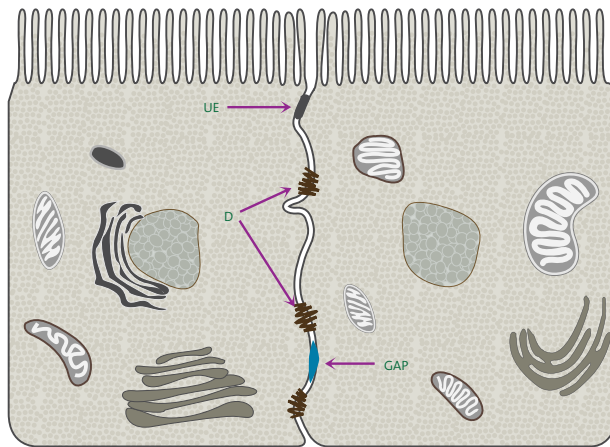


Figura 21. Dibujo de un micrografía electrónica de unión entre dos células, donde se puede visualizar la unión estrecha (UE) y las uniones de anclaje como los desmosomas (D) y uniones comunicantes (GAP).

Uniones de anclaje

Este tipo de uniones también se conocen como *uniones adherentes*, o *intermedias* o *máculas de adhesión*. Están constituidas por complejos multiproteínicos a su vez formados por la proteína de unión transmembranal, el ligando extracelular, la proteína intracelular de unión y el componente del citoesqueleto al que se une (actina, caderina, catenina, conexina, filamentos de actina, integrinas, proteínas de matriz, selectinas, vinculina, etcétera) y se presentan en tejidos sometidos a tensiones mecánicas, como el músculo cardíaco, o en células epiteliales. Participan en procesos como la inhibición por contacto.

En la referencia a las uniones de anclaje podemos mencionar a las *adherentes* (unión célula-célula o célula matriz), los *desmosomas* (unión célula-célula) y los *hemidesmosomas* (unión célula-matriz) (figura 21).

Uniones comunicantes

También son conocidas como uniones de *nexo* o de *coberura*; su función esencial es la comunicación intercelular a través de canales (o pequeños puntos citoplasmáticos). Los tipos principales de éstas son las *uniones gap* (*hendidura*) y las *plasmodesmata* (presentes en las células vegetales).

Uniones gap

Las uniones *gap* permiten el paso de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles. Las proteínas integrales que participan se llaman *conexinas*; éstas forman un complejo de subunidades llamado *conexón*, el cual está mediado por la concentración de Ca^{2+} y las condiciones de pH (figura 22).

Plasmodesmata (o plasmodesmos)

Las plantas sólo presentan un tipo de unión, conocido como *plasmodesmata* o *plasmodesmosoma* o *plasmodesmo*; estas uniones forman canales

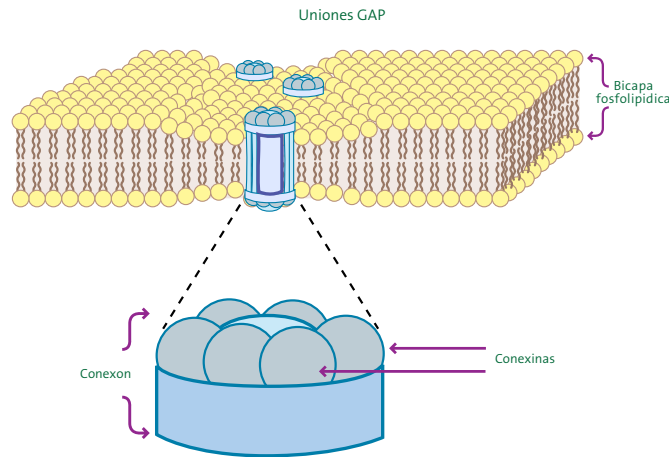


Figura 22. Representación esquemática de un conexón y sus unidades proteicas, las conexinas. Se muestra cómo se encuentran inmersas en la membrana y establecen comunicación entre células.

citoplasmáticos a través de las paredes celulares, permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas (glúcidos, aminoácidos, ARN) y la transmisión de señales.

Bibliografía

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Introducción a la biología celular. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2006.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona: Ediciones Omega, 2004.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser Ch A, Krieger M, Scout MP, Zipursky SL, Darnell J. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2005.

3

Núcleo



Capítulo 3

Núcleo

Santiago René Anzaldúa Arce

Luis David Zepeda Domínguez

Milton Enrique Cardoso Rangel

Objetivos temáticos

- Organización estructural del núcleo.
- Organización estructural del ADN.
- Clasificación de los cromosomas.
- Regulación de la expresión génica.

Introducción

El núcleo es un compartimento intracelular limitado por una doble membrana llamada envoltura nuclear. En su interior se encuentra el material genético formado por el ADN, además de todos los componentes necesarios para llevar a cabo la transcripción del ADN en ARN, los mecanismos de procesamiento del ARN recién sintetizado o transcrito para transformarse en ARN maduro, y finalmente para la duplicación del ADN. El núcleo es la estructura más característica de las células eucariontes, del griego *eu* = verdadero y *karyon* = núcleo: células con núcleo verdadero; contiene la mayor parte del ADN de la célula, además de ARN y proteínas confinadas en un espacio rodeado por una envoltura nuclear constituida por una doble membrana; a diferencia de las células procariontes

(*pro* = primitivo y *karyon* = núcleo: células con núcleo primitivo), en las que el material genético se encuentra disperso en el citoplasma.

Organización estructural del núcleo

El núcleo está formado por las siguientes estructuras:

- a) Envoltura nuclear
- b) Nucléolo
- c) Elementos figurados intercromatinianos
- d) Matriz nuclear

Envoltura nuclear

La envoltura nuclear está formada por tres elementos estructurales:

1. Las membranas nucleares: una interna y otra externa, esta última se continúa con el retículo endoplasmático. Entre las dos existe un espacio de 10 a 50 nm de ancho.
2. La lámina nuclear, de 50 a 80 nm de espesor, está formada por tres proteínas distintas (laminas A, B y C) que corresponden a los



filamentos intermedios que interactúan con la membrana nuclear interna, la cromatina y los poros nucleares.*

3. Los poros nucleares: integrados por un conjunto proteínico que regula la permeabilidad selectiva del núcleo, tienen alrededor de 70 a 80 nm de ancho, pero se cree que el canal del poro (o diámetro funcional) tiene sólo 9 nm de diámetro.

A pesar de que las membranas nucleares externa e interna son contiguas, hay entre ellas una composición proteínica distinta debido a que las proteínas no se difunden de una membrana a la otra, es decir, se forman dominios específicos para cada una.

Ésta es una cisterna membranosa similar a la del retículo endoplasmático, formada por dos membranas. Las dos membranas nucleares están separadas por un espacio de 10-50 µm llamado *espacio perinuclear*, y se unen formando un poro circular que contiene un armazón complejo de proteínas; existe un promedio de 3 000 poros nucleares en una célula.

La membrana externa presenta ribosomas adheridos a su superficie y continúa en el retículo endoplasmático, es decir, la luz de éste desemboca en el espacio perinuclear (*figura 1*). Las proteínas producidas por los ribosomas de la membrana externa son transportadas al espacio perinuclear.

La envoltura nuclear presenta poros; debido a que es una estructura supramolecular compleja, se le denomina *complejo de poro*. En los bordes de estos poros se unen las membranas interna y externa.

La parte interior de la membrana interna está revestida por las láminas nucleares; la integridad de éstas depende de procesos de fosforilación y desfosforilación. La envoltura nuclear permanece intacta durante la in-

* Lámina nuclear es una estructura del citoesqueleto adosada a la cara interna de la membrana nuclear interna, en este caso la palabra "lámina" nuclear debe acentuarse, cuando nos referimos a los componentes proteínicos de esta estructura, las "lamínas", éstas no se acentúan.

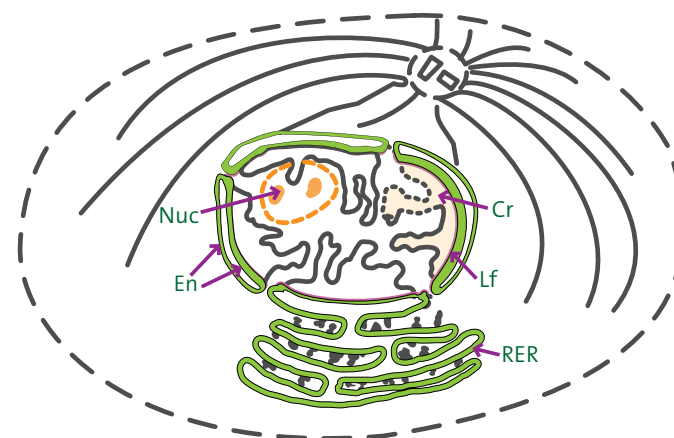


Figura 1. Estructura general del núcleo.

RER: retículo endoplasmático rugoso; Cr: cromatina; Nuc: nucléolo; En: envoltura nuclear; Lf: lámina fibrosa o nuclear.

terfase y profase, mientras que durante los procesos tempranos de la prometafase se fragmenta y se deja de observar al microscopio óptico (MO). La membrana nuclear interna contiene proteínas que se encargan de unir de manera específica la cromatina y la red proteínica de la lámina nuclear.

Las membranas nucleares actúan pasivamente separando el núcleo del citoplasma. A pesar de diversos estudios en los que se ha identificado actividad enzimática de la membrana externa, no se puede llegar a conclusiones definitivas, pues la membrana externa es una continuación estructural del retículo endoplasmático y estas enzimas están íntimamente asociadas a él.

La membrana interna no presenta ribosomas adheridos y se encuentra en contacto con la lámina nuclear y la cromatina.

La doble membrana nuclear es penetrada por el complejo de poro, que está constituido por canales acuosos que conectan al nucleoplasma



con el citosol, y a través de los cuales se pueden difundir moléculas menores de 50 000 daltons, lo que implica que algunos compuestos como el ARNm y las proteínas requieran un proceso de selección y propulsión para el paso bidireccional de estas moléculas. La superficie que ocupan los complejos del poro en los mamíferos es de 10% del área total, mientras que en células vegetales y protozoarios llegan hasta 36%. El número de poros de la membrana nuclear está directamente relacionado con la actividad transcripcional de las células (30 millones por núcleo para el ovocito de *Xenopus* y 300 para células somáticas). Igualmente, en espermatoцитos, células embrionarias y células tumorales (células muy activas) el complejo de poro se localiza en pilas de membranas citoplasmáticas llamadas *láminas anilladas* (a manera de reservas), que ocupan hasta 50% de su superficie.

Los poros están rodeados por estructuras circulares llamadas anillos, que junto con el poro constituyen el complejo de poro; estos complejos tienen forma octagonal con dos anillos: uno hacia la superficie externa de la envoltura y otro en la superficie nucleoplasmática, con un diámetro interno de 80 nm; en el centro se localizan unas partículas grandes que forman un tapón de material electrodensito, y se extienden ocho rayos desde el tapón hacia los anillos; no siempre se observan las partículas centrales. Probablemente este material electrodensito se forma con partículas en tránsito entre el núcleo y el citoplasma.

Lámina nuclear o lámina fibrosa

La lámina nuclear es una capa proteínica de 10 a 20 nm de espesor, que está adosada a la cara interna de la membrana nuclear interna; se distribuye de manera continua y sólo se interrumpe en los bordes de los complejos del poro. Es una estructura formada por polipéptidos subyacentes

a la membrana interna. Los polipéptidos se autoensamblan y se unen a las proteínas de la membrana interna y a la cromatina condensada de la periferia del núcleo.

Bioquímicamente, la lámina nuclear está formada por un número variable de proteínas que se denominan *laminas* (sin tilde, pues llevan el acento prosódico en la “i”); en los mamíferos son tres (A, B y C, de 74 000, 72 000 y 62 000 daltons, respectivamente); en las aves son dos, y en los anfibios, cuatro. Estas proteínas corresponden a variedades del citoesqueleto, clasificadas como filamentos intermedios.

La lámina nuclear parece desempeñar funciones fundamentales para la vida de las células eucariontes, ya que en algunos protistas (o protozoarios) y en células de vertebrados no se han encontrado filamentos intermedios en el citoplasma, pero sí presentan láminas nucleares. También se sabe que los filamentos intermedios más antiguos desde el punto de vista filogenético son las láminas nucleares.

La función de estos polipéptidos puede ser organizar los complejos del poro y mantener la cromatina condensada e inactiva en la periferia, separándola de la activa. Otra función parece ser la de anclar la cromatina a la envoltura nuclear, aparentemente la lamina A se solubiliza durante la mitosis, mientras que la lamina B se asocia a las vesículas formadas por la fragmentación de la envoltura nuclear. En meiosis la lámina nuclear desaparece por completo durante paquiteno de profase y reaparece en diploteno en los ovocitos mientras que en los espermatoцитos no vuelve a aparecer.

Las láminas A y C son codificadas por una misma unidad de transcripción (gen) y son producidas por un *procesamiento alternativo* que genera dos moléculas de ARN mensajero. Las laminas A y C se unen a los cromosomas (o a la cromatina durante la interfase). Durante la mitosis separan a los



cromosomas de la membrana nuclear interna. La lámina B está asociada a la membrana nuclear interna, estas moléculas existen como homodímeros.

Complejo de poro

Son estructuras supramoleculares de forma octagonal, de 125 nm de diámetro y un peso molecular aproximado de 120 megadaltons (MDa), alrededor de 120 millones de daltons. Se sitúan en regiones donde al fusionarse las membranas nucleares delimitan un orificio circular, que es ocupado por el complejo de poro y determina un intercambio selectivo de compuestos entre el núcleo y el citoplasma. Los complejos de poro se comportan como canales acuosos que relacionan de manera directa al citosol y al nucleoplasma. Mientras más activa sea la transcripción en una célula, mayor será el número de complejos de poro. Una célula llega a tener un promedio de 3 500 complejos de poro, pero este número puede incrementarse considerablemente en células como los ovocitos.

El complejo de poro contiene más de 50 proteínas, denominadas **nucleoporinas**; estos polipéptidos se organizan formando las siguientes estructuras (*figura 2*):

- **Subunidades columnares**, que forman la pared del poro.
- **Subunidades anulares**, a partir de las cuales emergen radios o rayos de rueda dirigidos hacia el centro del poro.
- **Subunidades luminales**, formadas por proteínas integrales que anclan el complejo de poro a las membranas nucleares.
- **Subunidades del anillo**, que forman cada una de las caras correspondientes del complejo: existe un anillo citoplasmático y uno nuclear.
- **Fibrillas citoplasmáticas y nucleares**, la cuales emergen del poro hacia la parte correspondiente de la célula; en la parte

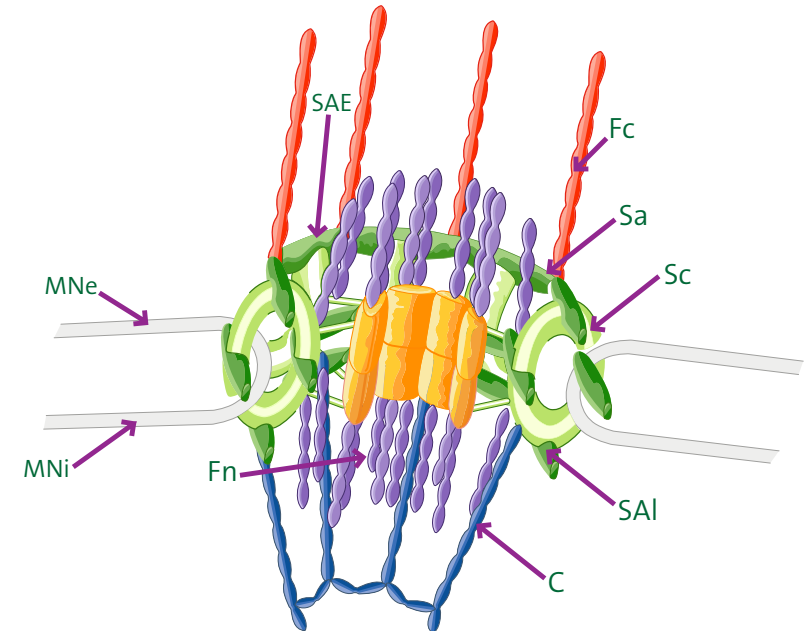


Figura 2. Componentes estructurales del complejo del poro.
SAE: subunidades del anillo externo; SAI: subunidades del anillo interno;
Fc: fibrillas citoplasmáticas; Fn: fibrillas nucleares; Sa: subunidades anulares;
Sc: subunidades columnares; MNe: membrana nuclear externa;
MNI: membrana nuclear interna; C: canastilla.

nuclear estas fibrillas convergen formando una estructura en forma de canasta (la canasta nuclear); el fondo de la cesta, constituido por fibrillas que conforman el anillo terminal; la naturaleza bioquímica de las fibrillas es diferente en el lado citosólico o nuclear.

- **Partícula central, transportador o complejo del canal central**, que es una estructura muy variable entre un poro y otro debido a que corresponde a un material en tránsito. A partir de



este transportador emergen fibrillas más cortas hacia el citoplasma y hacia el núcleo llamadas **fibrillas proximales**.

Un tipo de cromatina llamada *constitutiva* es, probablemente, el sitio donde se inicia la nucleación (o armado inicial) de la lámina y la envoltura nuclear. Otra propiedad interesante es su capacidad de unirse al ADN de diversas especies (incluso bacteriófagos) por lo que no es necesaria una secuencia de información específica para la que la lámina fibrosa inicie el armado del núcleo.

La periferia del complejo de poro permanece unida a la lámina nuclear y los radios se unen al borde formado por la fusión de las membranas nucleares.

Para tener una idea del intenso intercambio que se realiza en los complejos de poro de compuestos entre el citoplasma y el núcleo, o viceversa, se analizará aquí el caso de las histonas y las moléculas de ARN: las primeras se sintetizan en el citoplasma y deben exportarse al núcleo; si la célula está duplicando su ADN necesitará realizar el procedimiento a una velocidad de aproximadamente 100 moléculas de histonas por minuto; en el caso de las segundas, si la célula está en un proceso de crecimiento, requerirá exportar del núcleo al citoplasma alrededor de seis subunidades ribosómicas por minuto. La luz del complejo de poro contiene un canal o túnel acuoso de 9 nm de diámetro y 15 nm de largo, este espacio puede ser traspasado por moléculas pequeñas y solubles en agua, de tal forma que las moléculas de 5 000 daltons o menos pueden pasar sin dificultad el complejo; sin embargo, hay proteínas como las ADN y ARN polimerasas que tienen pesos moleculares de 100 000 a 200 000 daltons, que deben ser importados por el núcleo.

Existen varias hipótesis del intercambio selectivo de sustancias entre el núcleo y el citoplasma:

- a) Se impide la entrada al núcleo de ribosomas activos (la traducción siempre ocurre en el citoplasma).
- b) Las subunidades ribosómicas sí son capaces de salir del núcleo, alargándose en el momento de atravesar el complejo de poro (proceso conocido como vehiculización). Sin embargo, no todo el ARN puede salir del núcleo, como es el caso del ARN nuclear heterólogo (ARN_{nh}) y los ARN nucleares pequeños (ARN_{sn}); del mismo modo, no todo el ARN_m sale finalmente al citoplasma y parte de él es degradado en el núcleo.
- c) Las membranas nucleares permiten la difusión de iones (K, Na, y Cl) provocando cambios abruptos en el potencial de membrana.
- d) Existen proteínas propias del núcleo (cariofílicas) que pasan fácil y rápidamente del citoplasma al núcleo. Se ha demostrado que estas proteínas contienen dentro de su estructura una secuencia de aminoácidos que actúa como señal que favorece su acumulación en el núcleo luego de haber sido inyectadas en el citoplasma; así, al romper una proteína nuclear (nucleoplasmína), sólo una parte conserva la propiedad de entrar al núcleo. Las proteínas cariofílicas se acumulan en el núcleo a pesar de que sus dimensiones sean enormes (120 000 daltons).

Nucléolo

En 1781, Fontana describió el nucléolo por primera vez en células epiteliales descamadas, procedentes de una anguila. McClintock, en 1934, junto con otros investigadores, estableció que el nucléolo se forma a partir de un segmento presente en algunos cromosomas, a los que se les llamó la región del organizador nucleolar (NOR). Desde la década de los sesenta del siglo pasado, ha quedado claro que el nucléolo es el prin-



principal centro celular de generación (biogénesis) de los ribosomas en las células eucariontes.

El nucléolo es una estructura intranuclear ribonucleoproteínica (es decir, formada por ARN y proteínas), es la estructura más ubicua y conspicua de las células eucariontes. El nucléolo es el sitio donde ocurre la síntesis (transcripción), procesamiento del ARN prerribosómico (pre-ARNr) y el ensamblado de las subunidades del ribosoma.

Durante la interfase del ciclo celular el nucléolo alberga, de manera casi exclusiva, un conjunto de nucleótidos y proteínas que participan en la biogénesis y maduración de los ribosomas. Las proteínas del ribosoma se producen en el citoplasma a partir del ARNm correspondiente, que ha madurado en el nucleoplasma, mientras que la mayoría de las moléculas y ARN ribosómico (ARNr) se sintetiza y madura dentro del nucléolo a partir de un solo precursor llamado pre-ARNr, que en mamíferos tiene un coeficiente de sedimentación —en unidades Svedberg (S), que se refieren de manera indirecta al peso molecular del compuesto— de 45 S. Este precursor se transcribe a partir de genes específicos llamados ADN ribosómicos (ADNr), que a su vez corresponden a las constricciones secundarias de los cromosomas metacéntricos; en humanos son 13, 14, 15, 21 y 22; estos genes se encuentran en el nucléolo, en forma de copias múltiples, situados uno detrás de otro (en tándem). El ribosoma maduro consta de dos subunidades ultraestructurales denominadas pequeña (o menor) y grande (o mayor), que en mamíferos tiene unidades de sedimentación que corresponden a 40 S y 60 S, respectivamente. Existe una molécula de ARNr cuyos genes no están en el nucléolo, sino que se ubican en otra porción del nucleoplasma; esta molécula, que se conoce como fracción 5 S, pasa del nucleoplasma hacia el nucléolo para participar en el proceso de ensamblaje de ribosomas. Todos estos elementos (ARNr y proteínas) se ensamblan en el nu-

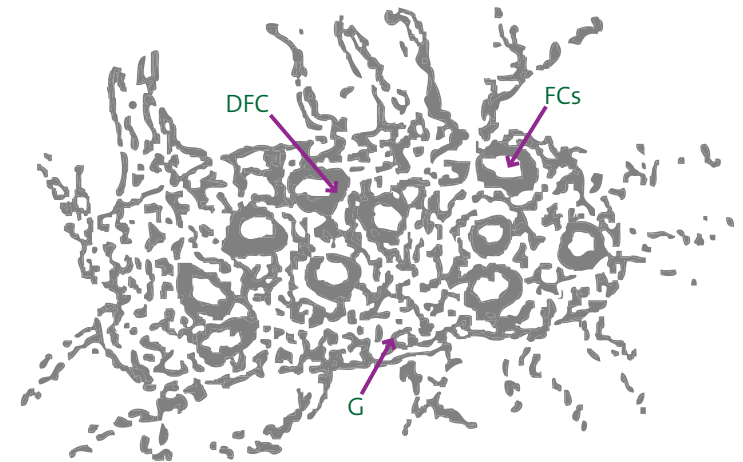


Figura 3. Componentes estructurales del nucléolo: centros fibrilares (FCs), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (G).

cléolo. Las estructuras que componen al nucléolo son a la vez la expresión morfológica de dichos procesos de maduración y ensamblaje ribosómico.

En el nucléolo hay un grupo de moléculas de ARN llamado usnARN (en inglés: *uracyl-rich small nuclear*), que se caracteriza por su tamaño pequeño (de hasta 200 nucleótidos de longitud), la abundancia de secuencias en uracilo y su localización exclusivamente en el núcleo; éste participa en el proceso de maduración, tanto de las moléculas de pre-ARNm (antes ARNnh), como del pre-ARNr.

El nucléolo consta de tres compartimentos bien definidos: los *centros fibrilares* (FCs), el *componente fibrilar denso* (DFC) y el *componente granular* (G) (figura 3). Los centros fibrilares actúan como un almacén de componentes nucleares relacionados con la transcripción. El componente fibrilar denso es el sitio de actividad transcripcional más abundante de los genes ribosómicos (a excepción de la fracción 5 S) y donde se lleva a



cabo la maduración o procesamiento temprano del pre-ARNr. El componente granular es el sitio donde se lleva a cabo la maduración final del pre-ARNr y el ensablado de las subunidades ribosómicas, por lo que también es un almacén de prerribosomas.

Con técnicas especiales como el método para el aislamiento del nucléolo, se han podido identificar en células de mamíferos alrededor de 400 proteínas propias del nucléolo; entre las más importantes están: la ARN polimerasa I, que sintetiza el pre-ARNr; la nucleolina, proteína fosforilada, muy abundante en las células que sintetizan gran cantidad de ribosomas; la numatrina, presente en el componente granular, por lo que es probable que participe en las etapas tardías del ensamblado de ribosomas; la fibrilarina, en el componente fibrilar denso (transcripción y procesamiento temprana del pre-ARNr; las proteínas Ag-NOR, que se localizan en los NOR, aparentemente se requieren para la transcripción de genes ribosómicos durante la interfase, se usan como marcadores de NOR en estado activo y se han localizado en el centro fibrilar y en el componente fibrilar denso.

Elementos figurados intercromatinianos

Los elementos figurados intercromatinianos o partículas ribonucleoproteicas no nucleolares se estudiaron al microscopio electrónico con la técnica especial de Moneron y Bernhard en 1969.

Estos elementos son cuatro:

1. **Fibras pericromatinianas.** Se localizan a la periferia de la cromatina compacta. Para Nasha y colaboradores, éstas corresponden al primer transcrito, es decir, el pre-ARNm (o ARN_{nh}).
2. **Gránulos pericromatinianos.** Miden entre 50 y 60 nm; según diversas investigaciones, corresponden al ARN maduro, de tal

forma que el primer transcrito (fibras pericromatinianas), una vez que ha madurado, forma los gránulos pericromatinianos.

3. **Gránulos intercromatinianos.** Se localizan en áreas de cromatina laxa (eucromatina); en los vertebrados están agrupados y en los invertebrados, dispersos. Contienen proteína en abundancia y escasa cantidad de ARN. Actualmente se cree que corresponden a moléculas de ARN_{sn} que ayudan a la maduración del ARNm. Es decir, son almacenes de la maquinaria de maduración postranscripcional de las moléculas de pre-ARNm.
4. **Cuerpos espiralados.** Son los elementos intercromatinianos más grandes; no se conoce su función y son poco frecuentes en las células. Los cuerpos espiralados desaparecen durante la mitosis y se forman en G₁, una vez que la transcripción se ha reiniciado. Están constituidos por moléculas relacionadas con el procesamiento o maduración del pre-ARNm, como son las ARN_{sn} (ARN pequeños nucleares) y proteínas nucleolares, entre ellas la p80-coilina (así llamada por tener 80 kilodaltons) que se considera característica de esta estructura; sin embargo, no forman parte de su composición las moléculas de pre-ARNm, ARNr, ni la fracción de ARNr 5S (la cual es la única que no se sintetiza en el nucléolo) (*figura 4*).

Matriz nuclear

Muchos biólogos celulares consideran la existencia de una red o andamio intranuclear, similar al citoesqueleto citoplasmático, sobre la cual se organizan y ensamblan la cromatina y los demás componentes del núcleo interfásico. La matriz nuclear se define como el material insoluble que permanece en el núcleo después de numerosas etapas de

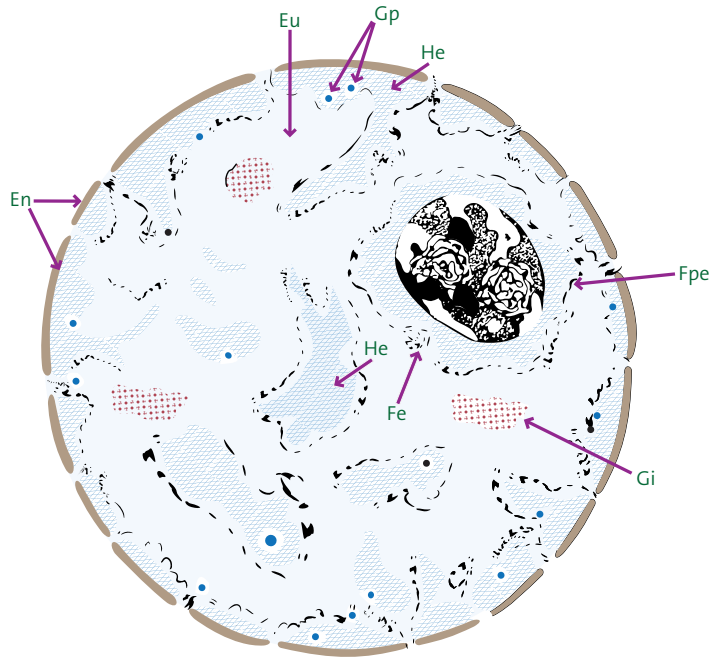


Figura 4. Elementos figurados intercromatinianos.

He: heterocromatina; Eu: eucromatina; Gp: gránulos pericromatinianos;
Gi: gránulos intercromatinianos; Fe: fibras espiraladas; Fpe: fibras pericromatinianas;
En: envoltura nuclear.

extracción bioquímica. Las estructuras que conforman la matriz deben distinguirse de la lámina nuclear, que son los únicos componentes del citoesqueleto situados en el núcleo, pero que no forman parte de la matriz nuclear.

Al microscopio electrónico se han observado redes de filamentos proteínicos muy delgados que pudieran ser la base estructural de la matriz nuclear; sin embargo, se desconoce su composición. Esta red se mez-

cla con otros filamentos morfológicamente similares, pero de naturaleza ribonucleoproteínica; la red se extiende ocupando todas las regiones extracromosómicas y termina por unirse a la lámina nuclear, a los gránulos de los elementos figurados intercromatinianos y a la heterocromatina.

Se ha demostrado que algunas proteínas que constituyen la matriz se unen a secuencias específicas del ADN, llamadas regiones SAR o MAR (que significa, de acuerdo con sus siglas en inglés: *regiones asociadas al andamio* o *a la matriz*, respectivamente). Estas secuencias participan en la formación de los bucles de los cromosomas, o bien, en su unión con la envoltura y otras estructuras nucleares. Los sitios de unión de la cromatina permiten a la célula ordenar los cromosomas, así como localizar genes específicos, regulando la transcripción del ADN.

La matriz interna contiene proteínas que unen a las moléculas de ARNm y pre-ARNm, a otras moléculas de ARN; también se han identificado la topoisomerasa II, ADN polimerasa, ARN polimerasa II, factores de transcripción (entre ellos los receptores a hormonas esteroideas) y proteínas relacionadas con los procesos de maduración del pre-ARNm (o ARNnh).

Una de las pruebas de la existencia de la matriz nuclear radica en que la distribución de diversas estructuras nucleares y las funciones asociadas a ellas se llevan a cabo en regiones específicas del núcleo y no de manera azarosa, formando una especie de compartimentos subnucleares bien definidos. Dentro de las principales funciones que se llevan a cabo (por lo menos parcialmente) en la matriz nuclear, están: la duplicación del ADN, la transcripción que se realiza fuera del nucléolo y el procesamiento o maduración postranscripcional del pre-ARNm.

A pesar de los esfuerzos experimentales, aún no queda claro si las estructuras aisladas por los biólogos celulares e identificadas como la matriz nuclear están presentes en las células intactas.



Organización estructural del ADN

Cromatina

James Watson y Francis Crick, en 1953, proponen un modelo molecular del ADN que articuló un gran número de conocimientos acumulados previamente. Este descubrimiento representó una enorme puerta de acceso a la genética (en el ámbito molecular) y a sus mecanismos de transmisión de modo definitivo.

El término cromatina se refería inicialmente al material nuclear que se teñía intensamente cuando se observaba al microscopio fotónico; en la actualidad se refiere a un complejo molecular presente en las células eucariontes, formado por ADN y un conjunto de proteínas, que se dividen en dos grupos: proteínas histónicas y no histónicas; algunos autores consideran dentro de la cromatina a las moléculas de ARN, pues tiene apetencias tintoriales similares a las del ADN.

El **genoma** se define tradicionalmente como la totalidad de la información genética presente en las células de un organismo, por lo que también comprende todos los genes que contienen los mensajes e instrucciones que especifican la estructura, la función y los procesos reguladores de una forma de vida especial. Los genes están presentes en el o los cromosomas que determinan los caracteres hereditarios de una célula o individuo. A su vez, son unidades (de herencia) que ocupan un lugar específico (*locus*) en el cromosoma, y pueden codificar la estructura de un polipéptido, o bien, regular la actividad y expresión de otros genes (estructurales).

En las células eucariontes los genes están separados unos de otros debido a que las secuencias codificadoras o *exones* se encuentran alternados con las secuencias no codificadoras llamadas *intrones*, a diferencia de los procariontes, en donde los genes son lineales y ligados. Además, en estos últimos pueden estar superpuestos, pues genes diferentes que

compartan secuencias nucleotídicas comunes pueden ser transcritos en dos o tres marcos de lectura distintos, y por tal motivo pueden especificar productos génicos diferentes.

El curso y la conducción de la información genética es explicada por el *dogma central de la biología molecular*, en el que se señalan los tres elementos fundamentales de este proceso: ADN, ARN, proteínas y su interrelación, lo cual constituye, sin duda, los fundamentos de la vida misma.

Organización nuclear del ADN en la cromatina

Una de las principales características de las células eucariontes es la separación de los compartimentos nuclear y citoplasmático, ya que es importante aislar en tiempo y espacio la síntesis del ARN (transcripción) de la síntesis proteínica (traducción). En los organismos procariontes ambos fenómenos se dan de manera simultánea, lo cual implica la falta de modificación o procesamiento del ARN transcrito antes de ser traducido (que en los eucariontes es fundamental). Por lo anterior, se hace indispensable la existencia de una estructura especializada en esta separación de los compartimentos, formada por una doble membrana denominada envoltura nuclear.

Empaquetamiento del ADN

La longitud del ADN es mucho mayor que la de la estructura en la cual está contenido (el núcleo). Así, el ADN cromosómico humano extendido tiene una longitud de 2 m, por lo que debe plegarse para caber en un núcleo de tan sólo 5 µm de diámetro.

Los niveles progresivos de compactación del ADN son:

- a) El *nucleosoma*: primer plegamiento de la doble hélice en un orden estricto.



- b) *Fibras de 30 nm*: nucleosomas compactados.
- c) *Dominios estructurales en forma de bucles*: plegamientos de las fibras de 30 nm.
- d) Condensación de dominios para formar *secciones empaquetadas de cromosomas mitóticos*.

- **El nucleosoma.** Es una estructura aplanada en forma de disco, que constituye la unidad fundamental de empaquetamiento. Tiene la apariencia de collar de cuentas de 11 nm de diámetro y 5.7 nm de altura, unidas entre sí por un filamento (en forma de doble hélice) de ADN.

Cada nucleosoma posee un núcleo (*core*) y un espaciador (*linkage*). El núcleo tiene una longitud aproximada de 140 pb, mientras el espaciador es de longitud variable, pero en promedio, de 60 pb, por lo que el nucleosoma posee 200 pb en su conjunto (figura 5).

Cada cuenta nucleosómica posee ocho moléculas (octámero) de histonas, dos copias de los cuatro tipos de histonas altamente conservados: H2A, H2B, H3 y H4, que se encuentran en cantidades equimoleculares. El octámero forma un núcleo proteínico alrededor del cual el ADN da dos giros completos.

La partícula núcleo y el espaciador pueden separarse mediante enzimas hidrolíticas, como la nucleasa (ADNasa); el ADN entra y sale del nucleosoma en sitios próximos, y son estabilizados o sellados por las histonas H1; estas últimas además son responsables del empaquetamiento del ADN en fibras de 30 nm. Análisis posteriores indicaron que las histonas H3 y H4 ocupan el centro del nucleosoma y las H2A y H2B están en los extremos.

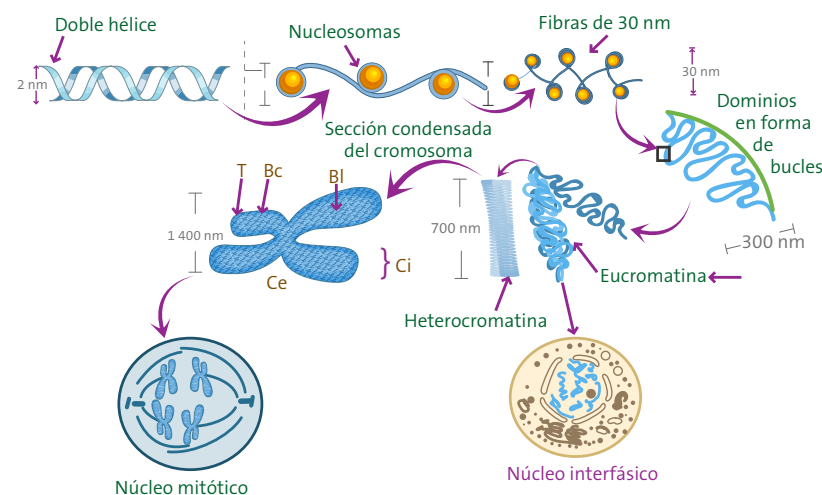


Figura 5. Niveles de empaquetamiento de la cromatina y partes del cromosoma. T: telómeros; Bc: brazo corto; Bl: brazo largo; Ce: centrómero; Ci: cromátida.

El surco menor de la doble hélice se dispone hacia el lado interno del nucleosoma, y presenta surcos menores con secuencias ricas en Adeninas y Timinas (A-T), mientras que las secuencias de surcos menores, ricas en Guaninas y Citosinas (G-C), se ubican hacia el exterior.

Los nucleosomas adyacentes están unidos por ADN de conexión o puente, que se encuentra más expuesto a la *nucleasa*. La longitud del nucleosoma varía en distintos tejidos; sin embargo, esta variación se produce sólo en el puente de ADN, y no en la parte central del nucleosoma.

En ciertas células, como los espermatozoides, que presentan un grado máximo de compactación, las histonas han sido reemplazadas por *protamina* (una serie de proteínas ricas en



arginina) que se unen al ADN y adoptan la disposición predominante de α -hélice, permitiendo con ello que el ADN quede sumamente compactado.

Con el nucleosoma existe una condensación del ADN entre cinco y siete veces, pero es mil veces menor que la existente en un cromosoma en metafase.

A lo largo del ADN existen regiones carentes de nucleosomas con secuencias específicas que no permiten su unión a las histonas; estas regiones son sensibles al ataque de la ADNasa y se conocen como sitios hipersensibles a la nucleasa; son comunes en porciones donde es activado un gen en particular. Se piensa que la secuencia del ADN es específica para las proteínas unidas al ADN, involucradas en la regulación genética y que desplazan el nucleosoma.

- **Fibras de 30 nm.** Cuando el nucleosoma es gentilmente lisado, se observan al microscopio electrónico las fibras de 30 nm, que están constituidas por nucleosomas muy compactos. Para el plegamiento de las cadenas de nucleosomas se requiere la H1, ya que esta estructura es estabilizada por interacciones entre moléculas H1 en nucleosomas adyacentes; la compactación se debe a un proceso de neutralización de cargas eléctricas, puesto que la porción C-terminal de la histona H1 tiene carga positiva y se une al ADN, cuya carga es negativa. Además, las histonas H1 pueden ayudar a modificar la trayectoria de la molécula de ADN cuando sale del nucleosoma.

La unión entre dos nucleosomas se realiza por un efecto de cooperatividad entre dos H1: el extremo COOH de uno de ellos se une con el extremo NH₂ del otro.

Con las fibras de 30 nm el ADN se pliega 40 veces (cerca de 0.1 cm), pero debe ser plegado 100 veces más para alcanzar el grado de compactación de un cromosoma metafásico.

- **Dominios en forma de bucle.** Este nivel de compactación se sugirió al observar los cromosomas politénicos y plumulados (organizados de esta manera). En 1972, también se demostró que puede producirse artificialmente en *E. coli* (a pesar de que carece de histonas propias). Se piensa que su existencia se debe a las proteínas no histónicas que también se unen al ADN y aparecen en ciertas secuencias para formar el *cuello* de cada bucle. Los bucles tienen longitudes que van desde 20 000 hasta 80 000 pb dispuestos a su vez en fibras de 30 nm. Se calcula que un cromosoma humano podría tener alrededor de 2 600 dominios en forma de bucle, con una longitud media de 40 nm, con lo cual el ADN tendría un empaquetamiento con una longitud de 100 nm, por lo que se requiere mayor condensación de la cromatina (*figura 6*).
- **Condensación de los dominios para formar segmentos de cromosomas mitóticos.** Cada cromátida (de cada cromosoma mitótico) está organizada en una serie de dominios en forma de bucles muy plegados, que proceden de un eje central (según observaciones realizadas al microscopio electrónico), de tal forma que los bucles se encuentran enrollados en una hélice densa con diversos patrones de plegado. Se cree que el bandeo de los cromosomas representa diversas modalidades de empaquetamiento regional del ADN mediante diferentes maneras de plegado de los bucles, formando secciones condensadas de

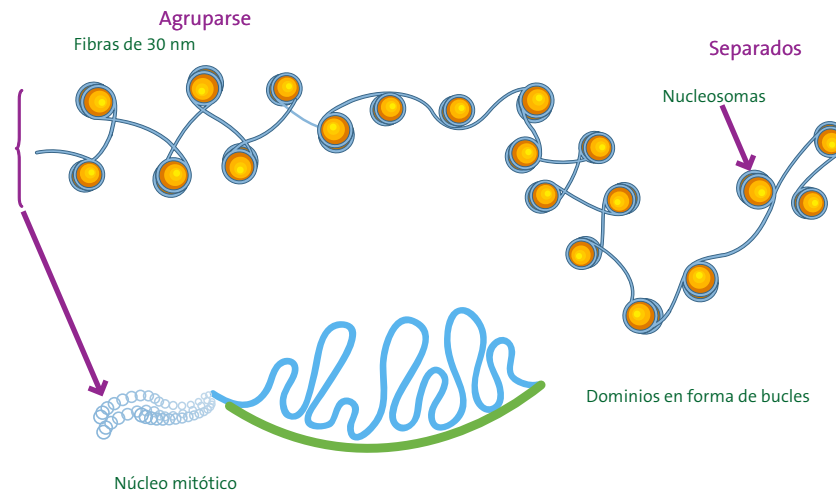


Figura 6. Niveles progresivos de compactación del ADN que comprenden los nucleosomas, las fibras de 30 nm y los dominios en forma de bucles.

los cromosomas mitóticos. Para el plegamiento de los bucles son necesarias las proteínas específicas llamadas *condensinas*, que requieren de la hidrólisis del ATP para realizar este proceso.

Proteínas del núcleo

Las proteínas que se unen al ADN, y que junto con ésta constituyen la cromatina de las células eucariontes, se han clasificado en dos grandes grupos:

Histonas.

Proteínas nucleosómicas no histónicas.

- **Histonas.** Se encuentran en altas cantidades (aproximadamente hasta 60 millones por célula). Son relativamente pequeñas (entre 11 000 y 23 000 daltons) y básicas, ya que contienen entre 10 y 20% de los aminoácidos lisina y arginina (cargados positivamente).

te) por lo que se unen fuertemente al ADN. Existen, como ya se ha visto, cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4; de éstas, las cuatro últimas se conocen como histonas nucleosómicas.

Están ausentes en las bacterias, pero son capaces de organizar su ADN en nucleosomas. En las bacterias existen proteínas básicas similares a las histonas, que organizan y condensan el ADN de manera similar a los nucleosomas dentro del *nucleoide*.

Las histonas H2A y H2B son relativamente ricas en lisina y conservadas; las H3 y H4 son ricas en arginina y se encuentran tan conservadas que al parecer desempeñan un papel crucial en la información del nucleosoma.

Las histonas nucleosómicas experimentan una serie de modificaciones covalentes en su extremo amino terminal, como la acetilación de ciertas lisinas y la fosforilación de las serinas; los aminoácidos modificados están altamente conservados en la evolución. La acetilación de histonas (por la enzima acetilasa) elimina cargas positivas y se sabe que es elevada en la cromatina de genes activos; la fosforilación de las serinas añade cargas negativas a la molécula.

Una modificación reversible de una proteína pequeña (de 74 aminoácidos) sumamente conservada, llamada *ubiquitina* (proteína no histona), se une al 10% del total de H2A, parece ubicarse en la cromatina con genes activos y desaparece posteriormente durante la mitosis.

Las histonas H1 no se conservan entre las especies e incluso presentan formas específicas para varios tejidos; existe una molécula por cada 200 pb (un nucleosoma). Cada molécula tiene una porción central globular y dos brazos extendidos (por-



ciones de NH_2 y COOH); la porción central se une al nucleosoma y los brazos se extienden cubriendo el ADN espaciador. Las histonas se agrupan entre sí formando enlaces cooperativos que ayudan a compactar el ADN; recordemos que las histonas H1 son las responsables del empaquetamiento de los nucleosomas en fibras de 30 nm.

- **Proteínas nucleosómicas no histonas.** Éste es un término genérico que involucra miles de proteínas diferentes con funciones muy diversas. En ellas se incluyen por ejemplo: ARN polimerasa, ADN polimerasa, helicasas, topoisomerasas, y una enorme cantidad de proteínas reguladoras. Estas proteínas se encuentran en cantidades muy reducidas (lo cual impide su fácil aislamiento y estudio), y algunas de ellas influyen en rasgos estructurales como la transcripción y replicación genética.

De éstas, entre las más abundantes está un grupo de proteínas relativamente pequeñas y de elevada carga que migran rápidamente durante la electroforesis, por lo que se les llama *grupo de alta movilidad* o proteínas HMG (*high mobility group*), de las cuales destacan dos: HMG14 y HMG17, presentes en todas las células de los mamíferos; estas proteínas parecen seleccionar los nucleosomas asociados a genes activos, y dos moléculas de cada tipo se unen a estos nucleosomas. Cuando las dos proteínas no histonas se agregan a la cromatina, el gen activo recupera su sensibilidad a la ADNasa I y viceversa; esto no tiene ningún efecto en las células donde este gen no se encuentre activo; así que las HMG son responsables, al menos en parte, de la sensibilidad del ADN a la ADNasa de la cromatina activa.

La ubiquitina es otra proteína no histona que se une al extremo carboxilo terminal de la H2A en nucleosomas con secuencias transcritas (formando la histona uH2A).

Entre las funciones de las proteínas unidas a ADN están:

- Ayudar al plegado del ADN.
- Ayudar a la replicación del ADN.

Muchas controlan el proceso de transcripción, por lo que algunas se conocen como *proteínas reguladoras génicas*.

ARN

En todos los organismos existen tres tipos principales de ARN: el ARN mensajero (ARNm), el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosómico (ARNr). Cada clase difiere de las otras por su función, tamaño y estabilidad.

El ARNm es de longitud variable; en células eucariontes requiere un proceso de maduración de su precursor, el pre ARNm o antiguamente llamado ARN heterogéneo nuclear (ARNnh).

La molécula de ARNt tiene alrededor de 75 nucleótidos de cadena sencilla, presenta una estructura secundaria bien definida que les permite reconocer, por un extremo de su molécula, el *codón* del ARNm que se corresponde con el *anticodón* del ARNt, y por el otro, transportar al aminoácido específico durante la traducción. El ARNr se asocia y ensambla a las proteínas llamadas ribosomas (constituidas por dos subunidades con diferente constante de sedimentación).

Eucromatina y heterocromatina

En 1928, Emil Heitz descubrió por primera vez la existencia de la cromatina de interfase, en dos diferentes estados de condensación reconocibles:



la *heterocromatina*, que permanece condensada en toda la interfase, y la *euromatina*, que se encuentra muy extendida y laxamente distribuida en los mismos núcleos (figura 7).

En 1960, Herbert Taylor demostró que las regiones heterocromatínicas de los cromosomas se replicaban considerablemente más tarde que las regiones eucromatínicas; de tal forma que la heterocromatina condensada durante la interfase es genéticamente estable e inactiva, además de experimentar replicación tardía.

En la euromatina corresponde al material genético activo o que puede expresarse mediante transcripción (aunque no todas las moléculas de ARNm salen al citoplasma, pues una gran parte son degradadas en el núcleo).

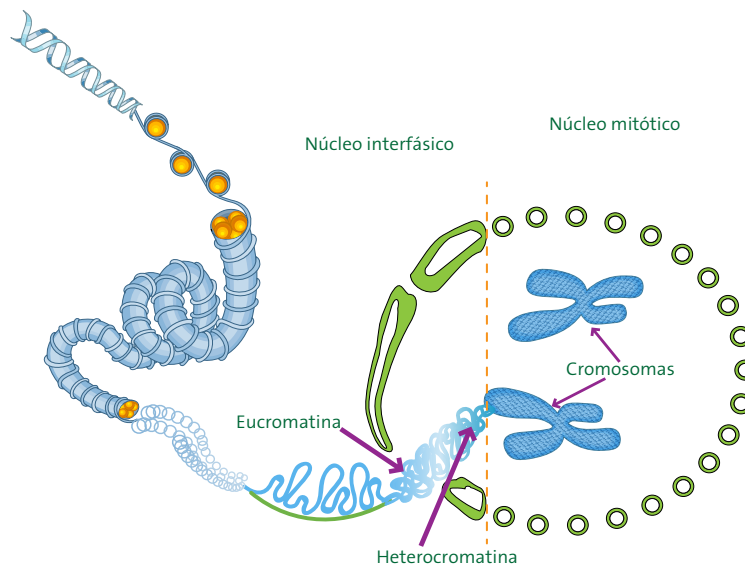


Figura 7. Núcleo interfásico: euromatina y heterocromatina.
Núcleo mitótico: cromosomas.

La cromatina activa se define por tener sitios hipersensibles, ya que se puede digerir a concentraciones muy bajas de ADNasa I, y corresponde a fragmentos de genes activos; no toda la euromatina se transcribe al mismo tiempo, de tal manera que la ADNasa no degrada tan fácilmente al ADN cuando el gen está inactivo.

La *heterocromatina* puede ser *constitutiva* o *facultativa*. La primera siempre está condensada y aparece en todos los tipos celulares, por lo que es imposible utilizar su información genética; es la más común; tiene ADN satélite; se observa en centrómeros y telómeros, o bien, en regiones intercalares o en la vecindad de los organizadores nucleolares; puede desempeñar una función estructural en los cromosomas, y tiende a localizarse en la región pericentromérica de la mayoría de las plantas y animales, en los telómeros (sobre todo de los vegetales).

La cromatina constitutiva se visualiza citológicamente por el bandeo "C". El colorante Giemsa es inespecífico, pero suele unirse a él porque la heterocromatina constitutiva es la que permanece sin ser degradada (después de los tratamientos con HCl o NaOH al que son sometidas las muestras) y por eso está presente para ser teñida y visualizarse.

La heterocromatina facultativa también es inactiva en cuanto a la transcripción; sin embargo, sólo se condensa en ciertos tipos celulares o en momentos especiales del desarrollo. A menudo, uno de los dos cromosomas homólogos se vuelve total o parcialmente heterocromático, como ocurre para el *cromosoma X* (uno de los dos) de las hembras de mamíferos; uno permanece eucromático y el otro heterocromático, y durante la interfase constituye el *corpúsculo de Barr* o *palillo de tambor*. El único cromosoma X en los machos permanece eucromatínico.

El fenómeno de inactivación se conoce como *lionización* (en memoria a Mary Lyon, pionera en este campo de investigación). Ella proponía



que la activación del cromosoma X ocurre al azar en las células somáticas (son ejemplos de esto las gatas *conchas de tortuga*, que presentan parches negros y amarillos al azar, por la inactivación alternada de uno u otro cromosoma X en las células de la piel). En cambio, en las células del trofoectodermo se inactiva el cromosoma X paterno.

La desactivación ocurre muy temprano en el desarrollo embrionario en mamíferos (día 16 en el ser humano) y esta inactivación se realiza al azar, ya que en un principio ambos cromosomas eran euromatínicos.

Clasificación de los cromosomas

Estructura del cromosoma

Morfología

Los cromosomas se descubrieron por primera vez en la década de 1880 y se observaron al microscopio fotónico como cuerpos coloreados en forma de barras. En los núcleos en interfase tienen una apariencia de fibras sumamente plegadas y distendidas; sin embargo, el mejor momento para observarlos es durante la división celular, ya que es en esta etapa cuando se encuentran sumamente condensados. En ciertos organismos eucariontes simples, protistas y hongos están condensados permanentemente.

Los cromosomas se tiñen con colorantes básicos, como *orceína* y *Giemsa*, y para estudiar su morfología se creó una nomenclatura específica que describe sus componentes principales.

- **Cromátida.** Principalmente durante la metafase, cada cromosoma está constituido por dos estructuras simétricas, conocidas como cromátidas, que corresponden a una molécula de ADN (de doble hélice), y se unen entre sí en un punto llamado cen-

trómero. En este mismo cromosoma, ya sea materno o paterno, las cromátidas se conocen como cromátidas hermanas, cada una de las cuales es una imagen especular de la otra, pues contienen secuencias idénticas de ADN.

- **Centrómero.** Es la región del cromosoma donde convergen las cromátidas hermanas; se localiza en la porción más delgada del cromosoma (constricción primaria). La región donde concurren las fibras del huso mitótico y se unen a las cromátidas se conoce como *cinetocoro*, que al microscopio electrónico aparece en células animales como una estructura trilaminar con distinta densidad electrónica. Esta estructura permite el ensamblaje de los microtúbulos.

A ambos lados del centrómero existen secuencias de ADN muy repetitivas que se tiñen intensamente con los colorantes básicos y se consideran como parte de la heterocromatina constitutiva. La mayoría de los cromosomas tiene un solo centrómero (monocéntricos); sin embargo, algunos presentan varios cinetocoros dispuestos a todo lo largo de su estructura (holocéntricos); además, en ciertas anomalías, los cromosomas pueden perder el centrómero (cromosomas acéntricos) o presentar dos de ellos (dicéntricos). Estas anomalías no son duraderas, ya que en el primer caso, el cromosoma no puede migrar a uno de los polos, y permanece en el citoplasma (creando micronúcleos durante la interfase). En el segundo caso, el mismo cromosoma es traccionado para migrar a polos opuestos, lo que provoca su fragmentación.

Si se pierde el centrómero, ninguna otra porción del cromosoma es capaz de sustituirla.



El centrómero en cada cromosoma presenta una localización fija; esta característica ha servido para identificar y clasificar a los cromosomas de la siguiente manera:

- a) *Telocéntricos*: Presentan el centrómero en uno de los extremos.
- b) *Acrocéntricos*: El centrómero se encuentra muy cercano a alguno de los extremos, lo que hace que presenten brazos muy cortos.
- c) *Submetacéntricos*: El centrómero se desplaza ligeramente de la parte media del cromosoma, lo que ocasiona que sus brazos tengan distinta longitud, la corta se conoce como brazo “p” y la larga, como “q”.
- d) *Metacéntricos*: El centrómero está a la mitad del cromosoma y sus brazos son iguales.

Los centrómeros telocéntricos se encuentran rara vez.

Existen evidencias de que los fragmentos de longitud de 500 pares de bases de ADN repetitivo (ADN satélite) tienen función de centrómero; los experimentos en levadura son peculiares, ya que un solo microtúbulo (de cada lado) se une a ellos, a diferencia de otras células eucariontes superiores, en las que hay entre 20 y 40 microtúbulos; en consecuencia, es muy probable que dichas secuencias específicas se repitan muchas veces más en estas especies que en las levaduras. Las porciones mencionadas se fijan a las proteínas específicas y les confieren protección frente a la acción de nucleasas, lo cual indica que posiblemente las proteínas unidas a estas secuencias conservadas sean un sitio de fijación para los microtúbulos del huso.

Estas regiones ocupan el núcleo (o parte central) del centrómero y están franqueados por nucleosomas muy cercanos (a intervalos de 160 pb), el resto de la cromatina presenta nucleosomas más aislados, por lo que tienen mayor sensibilidad a la nucleasa.

Al parecer, estas secuencias específicas son propias de cada especie y los datos no pueden extrapolarse ni siquiera a otras especies de levaduras u otras eucariontes superiores.

- **Telómeros.** Se llaman así los extremos de los cromosomas, necesarios para su replicación y estabilidad, pues a través de los extremos libres evitan la fusión con otros cromosomas; cuando se pierden los telómeros, los bordes se vuelven adherentes y tienden a unirse a con otros extremos.

Algunos estudios en levaduras y protozoarios han permitido conocer la existencia de una secuencia común de ADN, de tal forma que los extremos de cada cromosoma son virtualmente idénticos. Se han identificado 2 grupos de secuencias:

- a) *Secuencias teloméricas simples*: Se localizan en el extremo del cromosoma, son secuencias muy cortas y repetidas en tándem.
- b) *Secuencias teloméricas asociadas*: Se encuentran y extienden a muchos miles de bases de los extremos; son repetidas, pero completas.

Las secuencias teloméricas simples dan estabilidad y permiten que el telómero sea replicado por completo, por lo que se consideran las porciones funcionales del telómero. En diversas especies: protozoarios, hongos, plantas y animales, las secuencias repetidas son ricas en guanina.



Una enzima conocida como *telomerasa*, reconoce la secuencia de los telómeros y es responsable de la replicación de su extremo 3' (cada uno de los extremos de las cadenas de ADN se conocen como 5' y 3').

- **Constricción secundaria.** Estas porciones se identifican por una falta de coloración en ciertos segmentos del cromosoma que pueden visualizarse diferencialmente empleando tinciones a base de plata. Se distinguen del centrómero porque en éstas no existe una desviación angular de los segmentos cromosómicos.
- **Organizador nucleolar.** Se refieren a ciertas constricciones secundarias en las que los genes contenidos en ella codifican la transcripción del ARN ribosómico (ARNr).

Junto al organizador nucleolar se distingue una región conocida como *satélite*, que se proyecta hasta el extremo del cromosoma (no debe confundirse con el ADN satélite, cuyas secuencias repetitivas pueden identificarse en diversas porciones del cromosoma).

- **Cromonema.** Se refiere a las cromátidas en estados tempranos de condensación.
- **Cromómeros.** Son cúmulos de material cromatínico visibles a lo largo de los cromosomas en la interfase. Se observan claramente en los cromosomas politénicos.

Cariotipo

El estudio del juego completo de cromosomas de células eucariontes se facilita ordenando (e incluso fotografiando) los cromosomas, en un arreglo específico llamado *cariotipo* (tabla 1).

En el estudio del cariotipo se utilizan células somáticas (linfocitos, células de médula ósea, fibroblastos, etc.), se les aplica un agente mutagénico (fitohemaglutinina), se incuban y se detienen posteriormente en metafase mediante colchicina (o colcemida), para después someterlas a la acción de soluciones hipotónicas que provocarán la ruptura de la envoltura nuclear; enseguida, se dejan los cromosomas libres y finalmente se tiñen. El ordenamiento para su estudio es específico: se colocan del más grande al más pequeño, con los centrómeros alineados, poniendo de manifiesto las diferencias de la longitud de los brazos; esto se conoce como *índice centromérico*.

Tabla 1

Número diploide (2n) de cromosomas en las especies domésticas.
Número diploide de cromosomas de diversas especies.

Nombre común	Nombre científico	No. de cromosomas
Ratón	<i>Mus musculus</i>	40
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	44
Rata	<i>Ratus norvegicus</i>	42
cobayo	<i>Cavia cobaya</i>	64
perro	<i>Canis familiaris</i>	78
Gato	<i>Felis domestica</i>	38
Caballo	<i>Equus caballus</i>	66
Oveja	<i>Ovis aries</i>	54
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	40
Vaca	<i>Bos taurus</i>	60
Gorila	<i>Gorilla gorilla</i>	48
Orangután	<i>Pongo pygmaeus</i>	48
Chimpancé	<i>Pan troglodytes</i>	48
Hombre	<i>Homo sapiens</i>	46
Pollo	<i>Gallus domesticus</i>	78



ADN satélite

El ADN satélite está compuesto por múltiples copias de una misma secuencia corta dispuestas en tándem y formando grandes bloques (cientos de millones de ellos). Presenta una extensa variedad en la composición de nucleótidos y secuencias entre diversas células y entre la misma célula. Se localiza en la heterocromatina que permanece condensada, por lo que es transcripcionalmente inactiva, pero no por eso carece de efecto genético, sino al contrario, pues puede ejercer una marcada influencia en la expresión de genes en su vecindad (efectos de posición).

No toda la heterocromatina constitutiva es ADN satélite, por lo que este tipo de ADN no siempre es un componente de la cromatina condensada permanentemente; de manera similar la *heterocromatina facultativa* no requiere la presencia del ADN satélite.

Regulación de la expresión génica

Regulación génica en organismos procariontes

En los organismos pluricelulares, cada tipo de célula tiene una forma y funciones características, y la producción de proteínas es también muy específica. De acuerdo con esto, y sabiendo que todas las células contienen la misma información genética, entonces, ¿por qué no todas son iguales en forma, funciones y síntesis proteínica? La respuesta es que los genes son regulados, y sólo determinados bloques de información genética se expresan en cada tipo celular.

¿Qué mecanismos controlan la expresión de un gen? Si consideramos que un gen es una porción de ADN que se encarga de contener la información para la síntesis de una proteína específica, ese gen, para expresarse, debe ser transcrito en un ARNm, el cual lo traducirá en una

proteína, y si la proteína corresponde a una enzima, ésta debe catalizar activamente una reacción específica. De este modo, la expresión génica es el resultado de una serie de procesos, cada uno de los cuales puede ser controlado de maneras distintas. Los mecanismos de control requieren información en forma de diversas señales (intracelulares o extracelulares).

Algunas de las estrategias empleadas para regular la *expresión génica* comprenden el control de la cantidad de ARNm disponible, la rapidez de traducción del ARN mensajero y la actividad de la proteína producida.

En células bacterianas, la eficiencia energética y la economía en el uso de los recursos son los aspectos que requieren más atención. Como resultado, la mayor parte de la regulación génica en procariontes implica el control de la transcripción de los genes, cuyos productos participan en la utilización de los recursos. En las células eucariontes, tal regulación depende en gran medida del ajuste fino de los sistemas de control, lo cual concuerda con la mayor complejidad de estas células y la necesidad de controlar el desarrollo de los organismos pluricelulares; por ello, la regulación en los eucariontes se lleva a cabo en diversos niveles, que se revisarán más adelante.

Operón de la lactosa: inducción enzimática

Los investigadores franceses Francois Jacob y Jackes Monod, en 1961, demostraron el modo en que son regulados algunos genes a nivel bioquímico en procariontes; estudiaron los genes que codifican las enzimas encargadas de desdoblar la lactosa (disacárido de la leche) en la bacteria llamada *Escherichia coli* (*E. coli*).

Esta bacteria, que habita normalmente en el intestino de los mamíferos, tiene 4 288 genes que codifican proteínas, de las cuales, alrededor de 62% son conocidas. Algunos de los genes codifican proteínas que siempre son requeridas (como las del proceso de glucólisis). Estos genes



que se transcriben de manera constante son llamados genes constitutivos. Otras proteínas sólo se necesitan cuando la bacteria se desarrolla en condiciones especiales.

Un ejemplo de lo anterior son las *E. coli* del intestino de un bovino adulto que por lo general no se exponen a la lactosa. Sin embargo, las bacterias intestinales de un becerro lactante tendrán constantemente la presencia de lactosa.

Esto plantea un dilema, ya que en el caso del becerro las bacterias invertirán energía para la producción de lactasa, mientras que en el adulto esto no ocurre. *E. coli* resuelve este problema regulando la producción de muchas de sus enzimas, de manera que se haga uso eficiente de las moléculas orgánicas disponibles.

Las células cuentan con dos procesos básicos de control de su metabolismo: regulación de la actividad de ciertas enzimas (la eficiencia con que una molécula enzimática funciona) y control del número de moléculas de las enzimas presentes. Algunas enzimas pueden ser reguladas de ambas maneras en la misma célula. Se cree que una *E. coli* que vive en un medio con glucosa necesita unas 800 enzimas distintas. De algunas de estas enzimas se requieren grandes cantidades, mientras que de otras sólo son necesarias cantidades pequeñas (unas cuantas moléculas). Para que la bacteria funcione correctamente, cada enzima debe ser controlada con eficiencia.

Para que la *E. coli* pueda utilizar la lactosa como fuente de energía, debe ser desdoblada en glucosa y galactosa, por la enzima *beta-galactosidasa* (la cual también convierte algunas moléculas de lactosa en un isómero estructural: la *alolactosa*).

La galactosa es convertida entonces en glucosa por otra enzima, y las dos moléculas de glucosa resultantes son degradadas por la vía de la glucólisis.

Las *E. coli* cultivadas en glucosa contienen muy poca beta-galactosidasa (de una a tres moléculas por célula). Sin embargo, las bacterias cultivadas en lactosa tienen hasta 3 000 moléculas de beta-galactosidasa por célula, lo que representa alrededor de 3% de la proteína celular total. Las concentraciones de otras dos enzimas, como la *galactósido transacetilasa* y la *galactopermeasa*, también se incrementan cuando las bacterias se cultivan en lactosa. La galactopermeasa es necesaria para transportar lactosa de manera eficaz, a través de la membrana plasmática bacteriana; sin ella, sólo pueden entrar en la célula bajas cantidades de lactosa. La *transacetilasa* también participa en menor grado en el metabolismo de la lactosa.

Jacob y Monod pudieron identificar cepas mutantes de *E. coli* en las cuales un solo defecto genético daba por resultado la no producción de las enzimas mencionadas. Este dato los llevó a concluir que las secuencias de ADN que codifican las tres enzimas están ligadas en el cromosoma bacteriano como una unidad y están sujetas a un mecanismo de control común. Cada secuencia codificadora de proteína se denomina *gen estructural*. Ambos investigadores franceses acuñaron el término *operón* para referirse a un complejo génico consistente en un grupo de genes estructurales con funciones relacionadas, más las secuencias de ADN estrechamente ligadas (secuencias reguladoras) que los controlan. Los genes estructurales del operón para la lactosa (*lacZ*, *lacY* y *lacA*) codifican beta-galactosidasa, galactopermeasa y galactósido transacetilasa, respectivamente.

La transcripción del operón para la lactosa comienza cuando la ARN polimerasa se une específicamente a un solo sitio *promotor* arriba o antes de las secuencias codificadoras y procede a transcribir el ADN, formando una sola molécula de ARNm, que contiene la información codificadora para las tres enzimas; la región codificadora del ARNm que tiene la in-

formación para producir una proteína se llama *cistrón*, debido a que el ARNm procarionte tiene dos o más regiones codificadoras se denomina *policistrónico*. Este ARNm contiene *codones* (grupo de tres nucleótidos o tripletes) para el inicio y la terminación de la traducción entre las secuencias codificadoras de enzima, de modo que se traducen como tres moléculas de proteína distintas. Debido a que las tres enzimas se traducen a partir de la misma molécula de ARNm policistrónico su síntesis puede ser coordinada si se acciona un solo “interruptor” molecular (*figura 8*).

Este interruptor controla la síntesis de ARNm llamado *operador*; es una secuencia de bases que se superpone a una parte de la región promotora y se encuentra arriba del primer gen estructural (codificador de la proteína) en el operón. Cuando la lactosa está ausente, una *proteína represora*, denominada *represor para la lactosa* (o represor lac), se une de manera estrecha a la región del operador. Como la proteína represora es lo suficientemente grande para cubrir parte de la secuencia promotora, la ARN polimerasa es incapaz de unirse al sitio promotor de la lactosa, y la transcripción del operón lac se bloquea de manera eficaz (*figura 8*).

La proteína represora para la lactosa es codificada por un *gen regulador*, que en este caso es un gen localizado en una región distante del sitio promotor. A diferencia de los genes del operón lac, el gen represor es *constitutivo*, es decir, siempre está activo o “encendido”, por lo que de manera continua se producen pequeñas cantidades de la proteína represora. Esta proteína se une de manera específica a la secuencia del operador lac. Cuando se cultivan bacterias en ausencia de lactosa, el sitio operador casi siempre está ocupado por una molécula represora. Sólo en raras ocasiones, cuando el sitio operador queda libre del represor por un lapso breve, la ARN polimerasa puede unirse e iniciar la transcripción de los genes

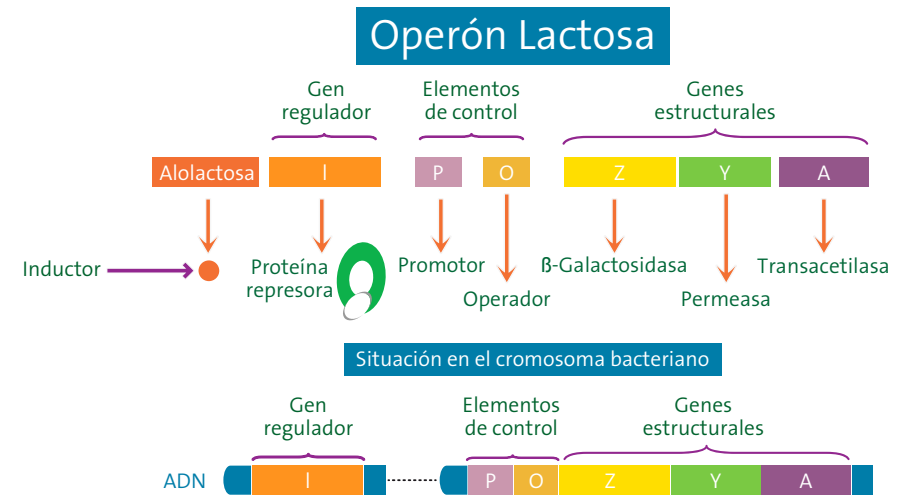


Figura 8. Componentes del operón de la lactosa.

estructurales. Como el ARNm de la *E. coli* es degradado con rapidez (su promedio de vida es de 2 a 4 minutos), muy pocas proteínas se traducen a partir de ese ARNm (*figura 9*).

La lactosa puede “encender” o “inducir” la transcripción del operón lac, debido a que la proteína represora para la lactosa contiene una segunda región funcional separada de su sitio de unión con el ADN; éste es un sitio de unión alostérico para la *alolactosa* (un regulador alostérico, como la alolactosa, se une a un sitio proteínico distinto del sitio activo, con lo que cambia su conformación y por lo tanto modifica su funcionamiento). Si la lactosa está presente en el medio de cultivo, unas cuantas moléculas pueden entrar a la célula y son convertidas en alolactosa por las pocas moléculas de beta-galactosidasa presentes. Cuando una molécula de alolactosa se une al represor en el *sitio alostérico*, se altera la conformación de la proteína, de manera que su sitio de unión con el ADN

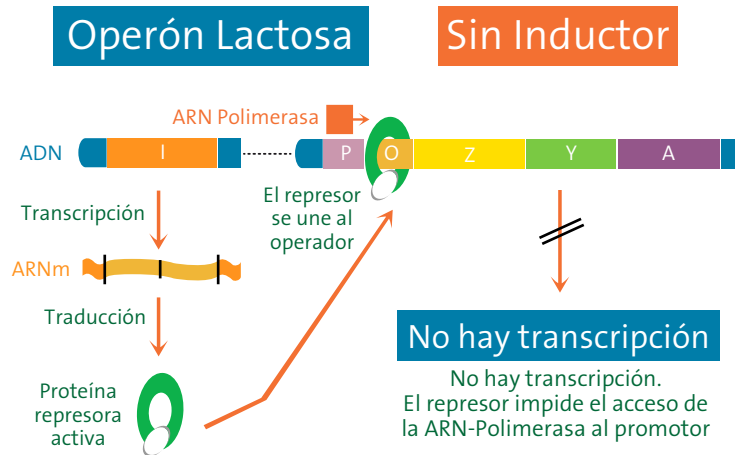


Figura 9. Estado del operón de la lactosa sin el inductor.

ya no puede reconocer al operador. Cuando todas las moléculas represoras tienen alolactosa unida a ellas, y por lo tanto son inactivas, la ARN polimerasa se une al promotor no bloqueado y el operón se transcribe de manera activa (figuras 10 y 11), lo que significa que los genes estructurales están “encendidos”.

La *E. coli* continúa produciendo beta-galactosidasa y las demás proteínas del operón lac, hasta que casi toda la lactosa se ha consumido. Cuando las concentraciones intracelulares de lactosa descienden, las proteínas represoras ya no tienen alolactosa unida a ellas; entonces adquieren una conformación que les permite unirse a la región operadora, y desactivan o “apagan” la transcripción del operón.

Para la lactosa, el operón es un sistema *inducible*. Éste, por lo general, es controlado por un represor que lo mantiene inactivo. La presencia de una *molécula inductora* (en este caso la alolactosa) desactiva al represor, y de este modo el gen, u operón, se “enciende”. Los genes u operones indu-

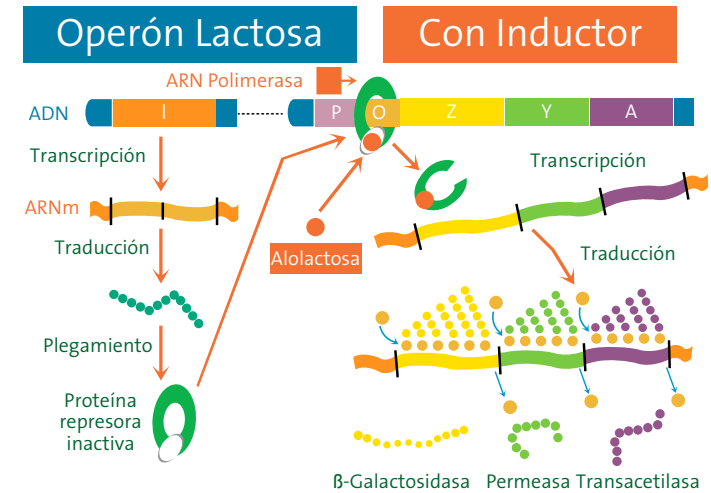


Figura 10. Operón de la lactosa con el inductor.

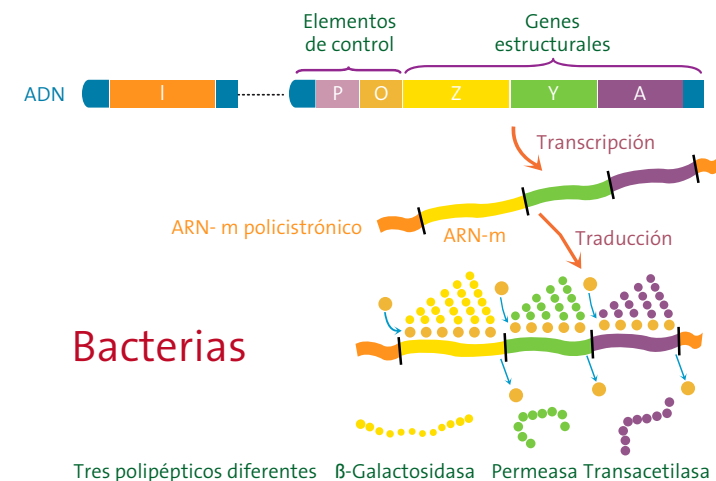


Figura 11. Elementos de control y genes estructurales del operón de la lactosa.

cibles normalmente codifican enzimas que constituyen vías catabólicas, las cuales degradan las moléculas a fin de aportar energía y componentes para reacciones anabólicas. Este tipo de sistema regulador permite a la célula ahorrar la energía que emplearía en elaborar enzimas cuando no hay sustratos sobre los cuales éstas actúen.

Represión enzimática

Otro tipo de sistema de regulación génica en bacterias se asocia sobre todo a las vías anabólicas, en las que los aminoácidos, nucleótidos y otras moléculas esenciales son sintetizados a partir de precursores más sencillos. La regulación de estas vías por lo general implica a las *enzimas reprimibles*, que son codificadas por genes también reprimibles.

Los genes y operones reprimibles naturalmente están activos, y sólo en condiciones especiales se inactivan. En la mayoría de los casos la señal molecular empleada para regular estos genes es el producto final de la vía metabólica. Cuando el suministro del producto final (por ejemplo un aminoácido) es escaso, todas las enzimas de la vía se sintetizan en forma activa. Cuando las concentraciones intracelulares del producto final son altas, la síntesis enzimática se reprime. Dado que moléculas como los aminoácidos son continuamente requeridas por las células en desarrollo, la estrategia más eficaz consiste en mantener en actividad los genes que controlan su producción, excepto cuando se dispone de un gran suministro del aminoácido. La capacidad de inactivar los genes permite a la célula evitar la sobreproducción de aminoácidos y otras moléculas que son esenciales, pero cuya producción es costosa en términos de energía.

El operón para en *triptófano* (operón *trp*) es un ejemplo de un sistema reprimible. Tanto en *E. coli* como en *Salmonella*, el operón consiste en cinco genes estructurales que codifican las enzimas requeridas para la

síntesis del aminoácido triptófano; éstas se agrupan como una unidad de transcripción con un solo promotor y un solo operador. Un gen represor distante codifica una proteína represora difusible, que difiere del represor *lac* en que se sintetiza en forma inactiva y es capaz de unirse a la región operadora del operón para el triptófano (figura 12).

El sitio de unión del ADN del represor se vuelve eficaz sólo cuando el triptófano, su *corepresor*, se une a un sitio alostérico en el represor. Cuando las concentraciones intracelulares de dicho aminoácido son bajas, la proteína represora está inactiva y es incapaz de unirse a la región operadora del ADN (figura 13). Cuando la concentración intracelular de triptófano se eleva, se une al sitio alostérico del represor y modifica su conformación hasta que se asocia a la secuencia operadora. Esto desactiva al operón y, en consecuencia, se bloquea la transcripción (figura 14).

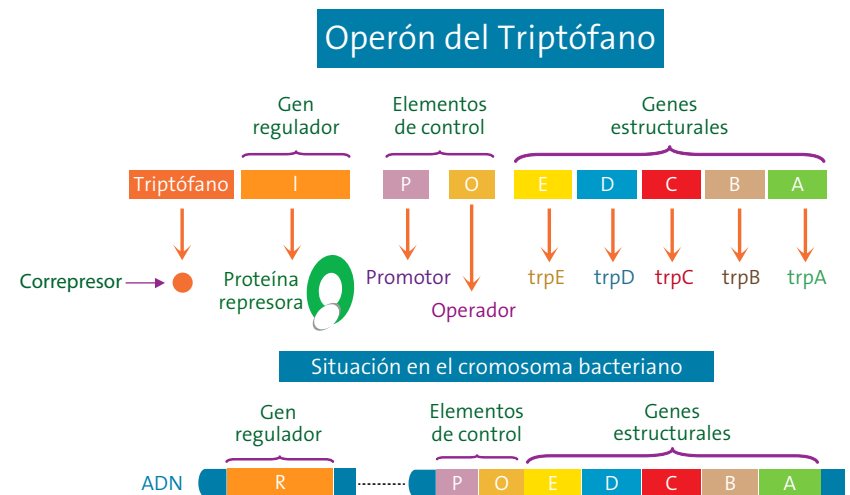


Figura 12. Componentes estructurales del operón del triptófano.

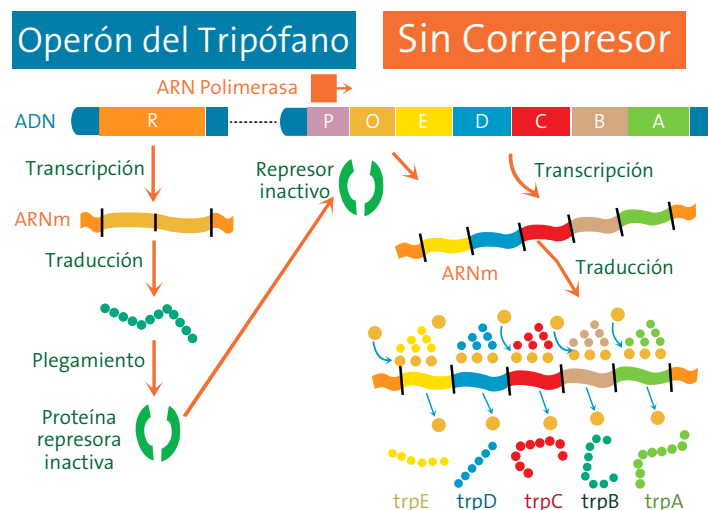


Figura 13. Funcionamiento del operón del triptófano sin correpresor.

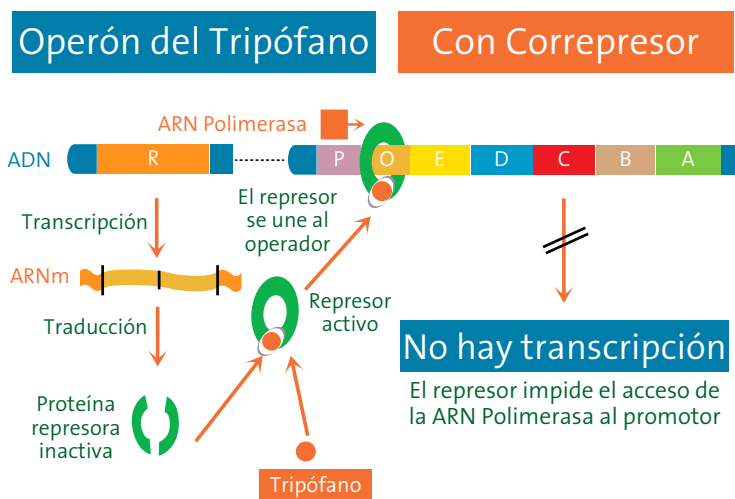


Figura 14. Funcionamiento del operón del triptófano con el correpresor.

Las características del operon lac descritas son ejemplos de *control negativo*. Los sistemas bajo control negativo son aquellos en los cuales la *forma activa* de la proteína reguladora (el represor, en este caso) se une al ADN y los genes estructurales permanecen “apagados”, por lo que no hay transcripción. *En este tipo de regulación la forma activa del represor se une al operador*. En algunos sistemas de regulación hay un *control positivo*; en el que la forma activa de la proteína reguladora permite que los genes estructurales estén “encendidos”, regulación por *proteínas activadoras* (en estado activo) que se unen al ADN y de este modo estimulan la transcripción de un gen. El operón lac contiene elementos de control positivo y de control negativo.

En el caso del operón trf la forma activa del represor no tiene afinidad por el operador, por lo que los genes estructurales igualmente se expresan y se lleva a cabo un control positivo.

En algunos operones, como en el operón lac, puede llevarse a cabo tanto control negativo como positivo.

El control positivo del operón para la lactosa requiere que la célula sea capaz de percibir la ausencia de glucosa, que es el sustrato inicial de la glucólisis. La lactosa, al igual que la glucosa, es un *catabolito*, y puede experimentar degradación escalonada para producir energía. Sin embargo, como la lactosa debe ser convertida antes en glucosa, para las *E. coli* es más eficaz utilizar directamente el suministro disponible de glucosa. Si se emplea glucosa como sustrato principal, se evitará el gasto energético de la célula para producir enzimas adicionales, como la beta-galactosidasa.

El operón para la lactosa tiene en realidad una secuencia promotora muy ineficiente; esto es, tiene baja afinidad por la ARN polimerasa cuando la proteína represora está desactivada. Sin embargo, una secuencia de



ADN adyacente al sitio promotor es un punto de unión para otra proteína, llamada *proteína activadora de genes por catabolitos* (CAP).

La CAP incrementa la afinidad de la región promotora por la ARN polimerasa, lo cual permite a la enzima reconocer de manera eficaz el promotor y unirse con fuerza al ADN. En su forma activa, la CAP tiene *AMP cíclico*, una variante bioquímica de monofosfato de adenosina, unido a un sitio alostérico. Conforme se agota la glucosa en las células, las concentraciones de AMP cíclico aumentan. Estas moléculas se unen a la CAP, y el complejo resultante se enlaza entonces al sitio de unión para la CAP, cerca del promotor del operón lac, donde estimula la transcripción del operón en presencia de lactosa.

De este modo, el operón estará completamente activo sólo si hay lactosa en el medio y la concentración intracelular de glucosa es baja.

La CAP difiere de los represores para la lactosa y para el triptófano en que puede controlar la transcripción de operones implicados en el metabolismo de varios otros catabolitos, como la galactosa, arabinosa y maltosa, además de la lactosa. Un grupo de operones controlados por un regulador de este tipo suele denominarse *regulón*.

Otros sistemas multigénicos bacterianos también son controlados de esta manera. Por ejemplo, los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y fosfato se organizan en regulones; otros sistemas multigénicos complejos reaccionan a los cambios de las condiciones ambientales, como las variaciones de temperatura, radiación, presión osmótica y concentraciones de oxígeno.

Muchos genes codificados por el cromosoma de la *E. coli* son necesarios sólo en determinadas condiciones ambientales o nutricionales. Como ya se ha mencionado, dichos genes son regulados en la transcripción, y pueden ser activados o desactivados por cambios metabólicos y ambien-

tales. En contraste, los genes constitutivos se transcriben (o sus ARNm se traducen) de manera continua, pero no necesariamente todos al mismo ritmo. Algunas enzimas funcionan con más eficiencia o son más estables que otras, y, por tanto, se requieren en menores cantidades. Los genes constitutivos que codifican las proteínas requeridas en grandes cantidades por lo general se transcriben más rápido que los genes para proteínas requeridas en menores concentraciones. La velocidad de transcripción, en este caso, es controlada por secuencias promotoras. Los genes constitutivos con promotores eficientes (también llamados promotores “fuertes”) se unen a la ARN polimerasa con mayor frecuencia y, por lo tanto, transcriben más moléculas de ARNm que los que tienen promotores ineficientes (o “débiles”).

Los genes que codifican proteínas represoras o activadoras que regulan a las enzimas metabólicas suelen ser constitutivos, y generan de manera constante sus proteínas. Debido a que cada célula suele requerir relativamente pocas moléculas de cualquier proteína represora o activadora específica, los promotores para esos genes tienden a ser relativamente débiles.

Como ya se ha mencionado, una gran parte de la variabilidad en las concentraciones de proteína de la *E. coli* es determinada por *controles transcripcionales*. Sin embargo, también existen mecanismos reguladores que operan después de la transcripción, conocidos como *controles pos-transcripcionales*, los cuales actúan a diversos niveles de expresión génica.

Los controles traduccionales regulan la rapidez con que se traduce una molécula de ARNm específica. Como el tiempo de vida de esta molécula en una célula bacteriana es muy breve, si se traduce con rapidez, producirá más proteínas que la que se traduzca con lentitud. Algunas moléculas de ARNm de la *E. coli* se traducen hasta 1 000 veces más rápido que otras. Al



parecer, en la mayoría de los casos, las diferencias se deben a la rapidez con que los ribosomas pueden unirse al ARN mensajero e iniciar la traducción.

Los controles postraduccionales por lo general actúan como interruptores que activan o desactivan una o más de las enzimas o proteínas previamente sintetizadas.

Estos sistemas permiten a la célula reaccionar a los cambios en las concentraciones intracelulares de las moléculas esenciales, como los aminoácidos, mediante ajustes rápidos en la actividad de sus enzimas. Un método postraducciona común para ajustar la velocidad de síntesis en una vía metabólica es la *inhibición por retroacción*, que consiste en que el producto final se une a la primera enzima de la vía, en un sitio alostérico, lo que desactiva la enzima de manera temporal.

Cuando la primera enzima de la vía no funciona, todas las enzimas siguientes son privadas de sustratos. Obsérvese que esto difiere de la represión que el producto final ejerce en el operón para el triptófano, que anteriormente se mencionó. En este caso, el producto final de la vía impide la formación de nuevas enzimas. La inhibición por retroacción actúa como un mecanismo de ajuste fino que regula la actividad de las enzimas existentes en una vía metabólica.

Regulación génica en eucariontes

La morfología y el funcionamiento de los distintos tipos celulares de un organismo pluricelular se diferencian de manera muy notoria, a pesar de contener el mismo genoma; las diferencias se presentan debido a que cada tipo celular sintetiza y acumula distintos juegos de moléculas de ARN y de proteínas; de tal forma que, de los 25 000 genes que en promedio tiene una célula de un mamífero, sólo se expresa una cantidad reducida (entre 10 000 y 15 000), dependiendo del tipo celular, de los cuales, la mayoría

se conocen como *proteínas constitutivas*; éstas son indispensables para el correcto funcionamiento celular, y se producen de manera constante y en cantidades similares en casi todas las células del organismo. Ejemplos de dichas proteínas son las enzimas del ciclo de Krebs y de la glucólisis, así como las proteínas de la cadena respiratoria y de la membrana plasmática, es decir, son genes propios de la “economía doméstica” de la célula, indispensables para que realice procesos cotidianos indispensables para su supervivencia. Por último, es probable que se expresen de forma autónoma porque sus genes no requieren grandes procesos de regulación.

Además de las proteínas constitutivas existe un grupo específico de proteínas, llamadas *dependientes de células o tejido-específicas*, que caracterizan a los distintos tipos celulares, como la insulina en las células β de los islotes pancreáticos, o la mioglobina de las células musculares, de tal forma que el conjunto de estas moléculas confieren la identidad particular a la célula. El grado de diferenciación entre los tipos celulares depende de la acumulación y síntesis específica de estas proteínas, así como de la regulación génica necesaria para que esta expresión pueda efectuarse. La clave de la diferenciación celular se centra en los mecanismos que determinan la expresión de los genes que codifican a las proteínas específicas de los diferentes tipos celulares.

Niveles de regulación génica en células eucariontes

En las células eucariontes existen diversos pasos para que un gen contenido en un segmento de una de las dos cadenas de una molécula del ADN llegue a convertirse en una proteína. A diferencia de las células procariontes, en donde, por ejemplo, la transcripción y la traducción ocurren de manera simultánea, en las células eucariontes estos dos procesos bioquímicos ocurren en dos compartimentos diferentes y en momentos



distintos; además se requiere completar diversas etapas intermedias para que dichos procesos puedan tener lugar, lo cual permite a la célula activar diversos mecanismos de regulación en varios niveles.

1. Control transcripcional: cuándo y con qué frecuencia se transcribe un gen en particular. Se lleva a cabo en el núcleo y consiste en la síntesis de la primera molécula de ARN transcrita, denominada pre-ARNm (o también ARN heterogéneo nuclear, ARNhn) a partir de un molde de ADN.
2. Control del procesamiento del ARN: control de la maduración o procesamiento de la molécula de pre-ARN para su transformación en ARNm. Se lleva a cabo en el núcleo.
3. Control del transporte y localización del ARNm: determina cuáles moléculas de ARNm podrán abandonar el núcleo para transportarse al citosol y su localización específica en este último. Tiene lugar en el núcleo, poros nucleares y citosol.
4. Control traduccional: selección de las moléculas de ARNm que serán traducidos por los ribosomas. Ocurre en el citosol.
5. Control de la degradación de los ARNm: diversas moléculas de ARNm sufrirán un proceso de desestabilización antes de ser traducidas, con lo que el ARNm quedará inactivo. Se lleva a cabo en el citosol.
6. Control de la actividad proteínica (control postraduccional): las proteínas ya sintetizadas estarán sujetas a procesos de activación, inactivación, degradación y ubicación específica en el citosol (figura 15).

De todos estos niveles de regulación, los más importantes para la mayoría de los genes son los que se realizan a nivel transcripcional, ya que con

esta forma, no hay necesidad de ejercer otros mecanismos de regulación y se evita la síntesis de moléculas en exceso y sin una finalidad específica.

Control de la transcripción

La regulación de la transcripción en eucariontes difiere de la de los procariotes en tres aspectos principales:

1. Existe un gran número de proteínas reguladoras que actúan sobre el ADN a miles de nucleótidos de distancia del sitio promo-

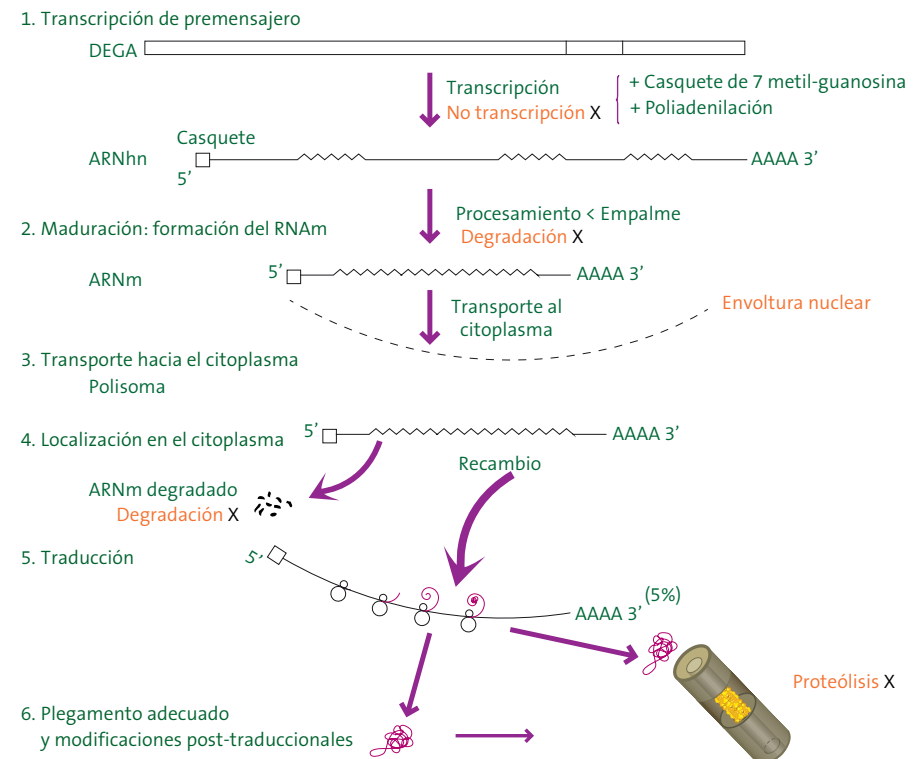


Figura 15. Niveles de regulación de la expresión génica en células eucariontes.



tor al cual regulan; estas moléculas pueden estar antes, dentro o después del gen en cuestión, es decir, un solo promotor puede ser regulado por un inmenso número de moléculas reguladoras que están dispersas a todo lo largo de ADN.

2. La ARN polimerasa II, que es la molécula encargada de la transcripción de moléculas de ARN que finalmente originará las proteínas, requieren la presencia y la acción coordinada de una serie de proteínas llamadas *factores generales de transcripción* (FGT), los cuales deben ensamblarse a la enzima antes de que la transcripción pueda iniciarse; estos factores son comunes para todos los promotores que utilizan las moléculas de ARN polimerasa II. El proceso de ensamblaje ocurre por etapas y existen diversas proteínas reguladoras que pueden influir dichas etapas, por lo que la velocidad de inicio de la transcripción puede aumentar o disminuir como respuesta al efecto de las proteínas reguladoras.
3. Dado el plegamiento de las moléculas del ADN eucariótico dispuesto en cromatina, potencia mecanismos de regulación que no pueden realizarse en procariontes.

La transcripción de un gen está controlada por dos elementos: una *región reguladora* que comprende secuencias específicas presentes en la molécula de ADN y un complejo de *proteínas reguladoras* que reconocen y se unen a las secuencias del ADN. Las secuencias reguladoras corresponden al promotor, sitio al que se unirán los FGT y la ARN polimerasa II, así como a secuencias incrementadoras o activadoras (*enhancers*), o bien, secuencias reguladoras negativas (represores).

Las proteínas reguladoras actúan permitiendo y evitando la transcripción de un gen. Si la forma activa favorece la transcripción, se le de-

nomina, de manera genérica: *activador transcripcional*, y si la forma activa hace lo contrario, se denomina: *represor transcripcional*. De tal forma que, para poder observar el efecto neto de una proteína reguladora, no basta con que esté presente (o ausente), sino que además se requiere la participación de otras proteínas o compuestos que modifiquen su conformación, y que se encuentre en forma activa o inactiva.

Las proteínas reguladoras pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: a) los *factores de transcripción*, b) los *activadores transcripcionales*, c) los *coactivadores* y d) los *represores* y *correpresores*.

- **Factores de transcripción.** Éstos son de dos tipos: los que se producen de manera constitutiva, ya que muchos genes dependen de ellos para su expresión, y los *factores específicos de la transcripción* o específicos de tejido, cuya expresión debe ser regulada por cada célula en particular.
- **Activadores de transcripción o *enhancers*.** Ocupan las secuencias incrementadoras o activadoras, o secuencias *enhancers* del ADN; están dispuestas a miles de bases del promotor, pueden estar en la dirección de la transcripción del gen (5'→3') o viceversa. Estas proteínas sólo son inducidas o expresadas como respuesta a señales específicas. Las proteínas activadoras facilitan el ensamblaje de la ARN polimerasa II y de los FGT en el sitio de inicio de la transcripción, aumentando la velocidad de la transcripción hasta 1 000 veces; otra forma en la que intervienen es modificando la estructura local de la cromatina, mediante la acetilación de las histonas adyacentes al gen y la *remodelación de la cromatina* en el sitio en el que éste se encuentra; estas modificaciones favorecen el acceso de los elementos necesarios



para la transcripción (FGT y ARN polimerasa II). Los activadores de transcripción actúan de forma secuencial, coordinada y sinérgica, de tal forma que la velocidad de la transcripción producida por varias proteínas activadoras es mucho mayor que la producida por cada una de ellas si actuaran por separado; este fenómeno se conoce con el nombre de *sinergia transcripcional*. Es común encontrar que existe una interacción muy cercana entre los activadores y los FGT, lo cual se logra mediante dobles en la molécula de ADN, de tal forma que interaccionan los activadores que en muchos casos están a una gran distancia del sitio promotor.

- **Coactivadores.** Son proteínas que frecuentemente actúan como mediadores para conectar o aproximar los activadores y los FGT, con lo que el dispositivo en su conjunto funciona de manera óptima y la velocidad de la transcripción se incrementa enormemente.

Además de los tres tipos de proteínas ya mencionados, hay un grupo de *proteínas represoras génicas*, las cuales actúan de diversas maneras, entre ellas están: las que impiden el completo ensamblaje de los FGT o las que compiten por una misma secuencia reguladora dentro del ADN, se unen a una porción de la proteína activadora (llamada dominio de activación) que impide su acción, promoviendo *remodelaciones locales de la cromatina* que contrarrestan las modificaciones favorables causadas por los activadores, o provocando la *desacetilación* de las histonas (mediante la atracción de la enzima histona desacetilasa), lo que ocasiona la disminución en la afinidad de ciertos FGT por el sitio promotor.

Las proteínas reguladoras que se autoensamblan y forman los complejos proteínicos denominados *complejos coactivadores o correpresores*, según el efecto que tengan sobre el inicio de la transcripción de los genes, un mismo correpresor o coactivador, pueden interactuar con otros complejos proteínicos, como los que participan en la remodelación de la cromatina, las enzimas modificadoras de histonas, las ARN polimerasa II y los FGT.

- **Metilación del ADN.** La metilación de los nucleótidos, principalmente la citosina (5-metil citosina) y en menor proporción la adenina, determina que los genes puedan expresarse, de tal forma que a mayor metilación, menor expresión del gen. Aparentemente, en las regiones metiladas se dificultan las interacciones entre las proteínas y el ADN, y, por lo tanto, el acceso de los FGT. La proporción de metilación varía de un organismo a otro; en las citosinas del ADN de los mamíferos se encuentra de 2 a 7%, y en las plantas superiores, llega hasta 50%. Desde etapas muy tempranas del desarrollo pueden observarse genes activos o inactivos a causa de los diferentes grados de metilación; la presencia de estos genes “marcados” por metilación se conoce con el nombre de *impresión génica*.

Por otro lado, se han observado diferencias entre los patrones de metilación de las células cancerosas, y los de las células normales.

Control del procesamiento del ARN

Las células eucariontes utilizan tres tipos distintos de ARN polimerasa, los cuales se describen a continuación:



- **ARN polimerasa I** (pol I). Transcribe los genes ADNr, que especifican a los ARN ribosómicos (ARNr) 5.8S, 28S y 18S. Estos genes ribosómicos (ADNr) se asocian frecuentemente con las regiones organizadoras nucleolares (NOR) presentes en los cromosomas que forman parte del nucléolo durante la interfase del ciclo celular. El sitio promotor reconocido por la ARN pol I es distinto al de las otras dos ARN polimerasas. La pol I no transcribe los genes de la ARNr 5S, ya que éstos son transcritos por la ARN polimerasa III, a partir de los genes dispuestos en otras porciones del genoma fuera del nucléolo. El ARNr es codificado por genes largos que originan transcritos primarios de 45S llamados pre-ARNr, estos genes son procesados por endonucleasas presentes en el nucleolo, que cortan regiones no codificadas del ARNr, llamadas *ARN espaciador*, de tal forma que una sola molécula de 45S originará fragmentos de 18S, 4.5S, y 28S: el transcrito primario está altamente metilado; de modo que todos los nucleótidos metilados permanecen como productos finales y varias enzimas degradan el resto de nucleótidos. Estos fragmentos ya maduros, junto con las proteínas ribosómicas específicas, constituyen los componentes de las dos subunidades ribosómicas: la menor de 40S (18S) y la mayor de 60S (5.8S y 28S), esta última además contiene la fracción 5S que es transcrita por otro gen dispuesto en el nucleoplasma. El ensamblado de los ARNr y las proteínas correspondientes ocurre en el nucleolo.

La *polimerasa III* (pol III) controla la síntesis de moléculas como la fracción ARNr 5S, ARNs de transferencia (ARNt) y ARN pequeños nucleares (ARNnp) que forman parte de las enzimas involucradas en el procesamiento del pre-ARNm, y la partícula

reconocedora de la señal (ARNsrp) que detiene la traducción de las proteínas para que se transfieran al retículo endoplasmático rugoso y ahí la concluyan.

El procesamiento de los transcritos primarios es auxiliado por moléculas ARNnp pues tienen de 90 a 300 nucleótidos de largo; muchos de ellos se designan con la letra “U” debido a que son ricos en uracilo.

La ARN polimerasa II (pol II) transcribe el pre-ARNm, el cual sufrirá el proceso (o *splicing*) que se describe a continuación:

- El pre-ARNm presenta un casquete (o apéndice) de guanosina metilada (llamada 7-metilguanosina) en el extremo 5', que se une al fosfato del extremo 5' del pre-ARNm, y se forma una unión 5'→5'. Este casquete es necesario para poder concluir la transcripción de la molécula naciente de pre-ARNm y para realizar posteriormente la traducción de la mayoría de los ARNm eucariontes.
- En el extremo 3', el pre-ARNm tiene una cadena de cien a 250 residuos de adenosina, llamada cadena de poli A's. Se cree que esta porción es necesaria para evitar que el ARNm sea degradado en el núcleo y ya no pueda pasar hacia el citoplasma.
- Existen dos regiones “no traducidas” (RNT): una situada entre el casquete 5' y la *región codificante* (que comienza con el codón de inicio AUG); la otra se encuentra entre el inicio del apéndice, o cadena de poli A's, y el final de la región codificante, que corresponde a uno de los codones de terminación UAA, UGA y UAG. Estas dos regiones no traducidas tienen gran relevancia en el control del procesamiento del ARN.



- d) La región codificante está compuesta de porciones que especifican una secuencia de aminoácidos en el proceso de traducción, llamadas *exones*, interpuestas por secuencias de nucleótidos que no especificarán aminoácidos en la proteína que será traducida, estas porciones se denominan *intrones*. Esto implica que los genes están divididos y deben pegarse. Una de las principales actividades del proceso de maduración de ARNm consiste en la eliminación de los intrones y el empalme de los exones. La presencia de intrones es común en moléculas de ARN, de plantas, animales y eucariotes inferiores, aunque en estos últimos son más escasos y pequeños. Una excepción en estos genes cortados son los genes de las histonas, del interferón y ciertos polipéptidos virales, ya que son codificados por secuencias de ADN continuas. El casquete de poli A puede ser añadido a diversos exones, por lo que esta adición determina cuál exón finalmente formará parte de la proteína, una vez traducida la molécula de ARNm.

La eliminación de intrones y el empalme de exones ocurre por un complejo enzimático llamado spliceosoma (espleciosoma) en el núcleo, que consta de 4 ARNnp y proteínas. El proceso consiste en la agregación al extremo 5' del intrón y a una porción intermedia del intrón llamada zona de ramificación; después se forma un doblez en el intrón que aproxima entre sí a los exones; enseguida se rompe el intrón en su extremo 5'; y éste se une a una guanosina del sitio de ramificación, formándose un bucle que permanece momentáneamente unido al exón por su extremo 3'; en una segunda etapa se libera el bucle del exón y

los dos exones adyacentes se empalman, quedando libre el bucle recién desprendido. De esta forma el ARN maduro se conoce como ARNm.

En ocasiones no todos los exones del primer transcrito (pre-ARNm) son usados para fabricar la molécula de ARNm; por ejemplo, si un gen consta de 5 exones (1, 2, 3, 4 y 5) puede originar varias moléculas de ARNm, dependiendo de la combinación de exones utilizados; así, puede ser que un ARNm tenga los exones 1, 3, 4 y 5, otra los exones 2, 3, 4 y 5. Este *procesamiento alternativo* se debe a un empalme alternativo de los exones y es importante para la generación de moléculas como las *isoenzimas* y las *isoformas*, que son formas múltiples de una misma proteína, las cuales cumplen funciones similares, pero tienen una secuencia diferente de aminoácidos.

Control del transporte y localización del ARNm

Los ARNm se almacenan en el núcleo antes de ser exportados a través de los poros nucleares; éstos permanecen en forma inactiva por la asociación con proteínas inhibitoras que reconocen las secuencias en el extremo 3' de la RNT.

La localización del ARNm dentro del citoplasma (es decir, después de su salida del núcleo) depende aparentemente de la secuencia en el extremo 3' del RNT (RNT 3'), por medio de proteínas que reconozcan dicha secuencia. En esta localización específica se han incluido los filamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto.

Control traduccional

Este mecanismo de control determina si un ARNm será traducido o no, y, si es el caso, la frecuencia con la que será traducido.



Una molécula de ARNm puede permanecer enmascarada y almacenada en el citoplasma, si se unen a él proteínas inhibidoras de la traducción. Otra forma consiste en la fosforilación de un factor de inicio de la traducción, que disminuye la tasa de traducción de la proteína; esta inhibición seguramente depende del reconocimiento de una secuencia específica situada en el RNT 3'.

Control de la degradación de los ARNm

Este mecanismo de control determina la longevidad de las moléculas de ARNm, es decir, la supervivencia y duración del ARNm.

EL ADN que carece de la cadena de poli A's se degrada rápidamente. Para evitarlo, una proteína especial se une a la cadena de poli A-s (proteína de enlace a poli A's). Se cree que la presencia de esta cadena mantiene el casquete del extremo 5' opuesto. Al parecer, existen secuencias RNT 3' que desestabilizan la cadena de poli As e incrementan su susceptibilidad para ser degradadas por nucleasas de poli A, o bien, de endonucleasas que hidrolizan de manera directa la RNT 3', con lo que la molécula de ARNm es eliminada del citoplasma.

Control de la actividad proteínica (control postraduccional)

Los mecanismos que controlan el tiempo de supervivencia de las proteínas, una vez que son funcionales, son postraduccionales.

Existen dos mecanismos que controlan el periodo de vida de una proteína: *a)* la regla del extremo amino-terminal y *b)* la señalización por medio de la *ubiquitina*. En el primer caso, dependiendo del aminoácido situado en el extremo amino-terminal, la proteína podrá tener una "vida" más larga (mayor de 20 horas) o más corta (de cinco minutos, aproximadamente). Los aminoácidos que determinan la vida prolongada son la serina metionina, alanina, treonina valina y glicina, y los involucrados en la duración de la vida corta son la fenilalanina, leucina, ácido aspártico, lisina y arginina.

La señalización de proteínas por la ubiquitina "condena" a las proteínas que serán degradadas en un complejo proteínico llamado *proteosoma*, la ubiquitina se une covalentemente a residuos de lisina. El proteosoma tiene forma de barril, y la degradación proteolítica ocurre en el centro de esta estructura.

Bibliografía

Organización estructural del núcleo

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Alberts B. Essential cell biology. EE.UU.: Garland, 1998.
- _____. Introducción a la biología celular. 2ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2006.
- Jiménez-García LF, Segura-Valdez ML. El nucléolo. Primer Simposio Nacional de Biología Celular; 1997 junio 23-27. México (DF): UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1997:62-69.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser ChA, Krieger M, Scout MP, *et al.* Biología celular y molecular. 7ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2005.
- Vazquez-Nin GH, Echeverría-Martínez OM, Jiménez-García LF. El núcleo interfásico: morfología y función. En: Jiménez LF, Merchant H. Biología celular y molecular. México (D.F.): Prentice Hall, 2003:341-394.

Organización estructural del ADN

- Alberts B, Johnson A, Lewis j, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Alberts B. Essential cell biology. EE.UU.: Garland, 1998.
- _____. Introducción a la Biología celular. 2ª ed. México (D.F.): Médica Panamericana, 2006.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser ChA, Krieger M, Scout MP, *et al.* Biología celular y molecular. 7ª ed. México (D.F.): Médica Panamericana, 2005.



- Rout MP, Aitchison JD. The nuclear pore complex as a transport machina. J Biol Chem 2001;276:16593-16596.

Clasificación de los cromosomas

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Alberts B. Introducción a la biología celular. 2ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2006.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser ChA, Krieger M, Scout MP, *et al.* Biología celular y molecular. 7ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2005.

Regulación de la expresión génica

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Brivanlou AH, Darnell JE. Signal transduction and the control of gene expression. Science 2002;295:813-818.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser ChA, Krieger M, Scout MP, *et al.* Biología celular y molecular. 7ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2005.
- Moore MJ. Nuclear RNA turnover. Cell 2002;108:431-434.

4



Citoplasma, citoesqueleto
y movimiento celular



Capítulo 4

Citoplasma, citoesqueleto y movimiento celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda
Icela Palma Lara

Objetivos temáticos

- Aspectos bioquímicos y estructurales de la organización del citoplasma.
- Citoesqueleto y movimiento celular.
- Dinámica y movimiento.

Introducción

El citoplasma es el componente más extenso de la célula y consiste en un medio acuoso de apariencia viscosa, donde se encuentran las moléculas necesarias para el mantenimiento celular. En las células eucariontes se localiza entre el núcleo celular y la membrana plasmática; contiene los organelos y el citoesqueleto, el cual es propio de las células eucariontes y, además de soportar el volumen citoplasmático, sirve para una multitud de funciones dinámicas (figura 1). En las células, el movimiento, al igual que sus demás funciones, es como el de una maquinaria integrada por muchas piezas que deben funcionar con precisión. La célula tiene que construir todas y cada una de sus piezas y ensamblarlas después en un conjunto funcional. El movimiento dirigido es un proceso

celular fundamental para el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas, la respuesta inmune y la formación de los tejidos. El mecanismo de motilidad es ancestral, y sus componentes clave, funcionales y moleculares, han sido conservados en los protozoarios y vertebrados, desde hace mil millones de años, cuando se originaron.

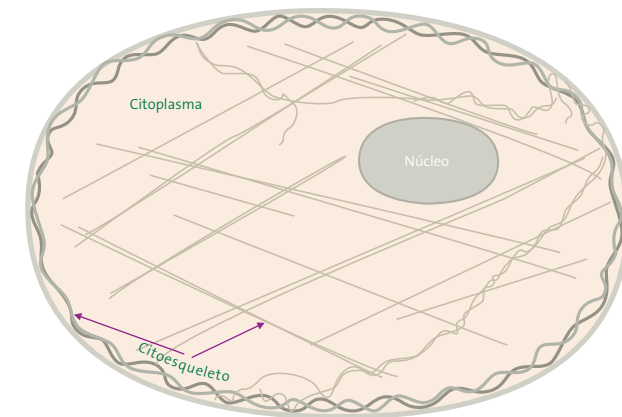


Figura 1. Representación esquemática de una célula eucarionte que muestra el núcleo y la disposición del citoesqueleto.



En este capítulo se describen los aspectos bioquímicos y estructurales de la organización del citoplasma, las características, distribución, ensamblaje e interacción de las proteínas del citoesqueleto, así como su papel funcional en el movimiento celular y en el mantenimiento de la organización espacial del citoplasma. Desde el punto de vista médico, es relevante conocer no sólo la composición del citoesqueleto, sino también sus funciones, ya que numerosas patologías pueden afectarlo. Estas alteraciones producen manifestaciones sintomáticas que pueden comprometer la vida del paciente. Asimismo, numerosos fármacos pueden actuar sobre los diferentes filamentos y proteínas, los cuales podrían evitar o retardar la continuidad de una afección (*figura 1*).

Aspectos bioquímicos y estructurales de la organización del citoplasma

El *citoplasma* o *hialoplasma* es el medio celular, sin estructura aparente, contenido en la membrana plasmática. El hialoplasma es considerado como un gel casi líquido que contiene (en disolución o suspensión) sustancias tales como enzimas e inclusiones citoplasmáticas que no forman parte de los organelos o estructuras celulares. En las bacterias, el citoplasma es un solo ambiente acuoso, lo que significa que todas las enzimas trabajan bajo condiciones iónicas similares; sin embargo, esto no quiere decir que las bacterias sean una simple “bolsa de enzimas”, pues hoy se sabe que muchas proteínas se localizan en estructuras o sitios subcelulares específicos. En las células eucariontes se presenta una mayor complejidad en la organización interna. Una célula eucarionte no tiene un ambiente interno homogéneo, ya que está dividido en compartimentos, cada uno rodeado por una membrana. Los compartimentos dentro de la

célula, delimitados por la membrana, son llamados *organelos*. A menudo, el núcleo es el organelo más prominente. Así, en el caso de las células eucariontes, el citoplasma es definido como el volumen entre el núcleo y la membrana plasmática (es decir, todo el interior, excepto el núcleo).

El término *citosol* es empleado para nombrar el ambiente acuoso del citoplasma, excluyendo todos los compartimentos delimitados por la membrana, contenidos en éste. El citosol puede ser visto como un compartimento simple que se encuentra rodeado por la membrana plasmática y está en contacto con la superficie externa de todos los organelos; sin embargo, es un compartimento especializado, y una de sus principales funciones es la síntesis de proteínas en los *polisomas* o *polirribosomas*, para uso interno de la célula, ya sea que permanezcan en el citosol, o para que los organelos las importen.

Las propiedades coloidales de la célula, como la transformación de sol a gel, las modificaciones en la viscosidad, el movimiento intracelular (ciclosis), el movimiento ameboideo, la división celular y otros procesos, dependen fundamentalmente del citosol. Éste contiene moléculas ricas en energía, como el ATP; moléculas de señalización, como el AMPc; enzimas (que constituyen 20% de las proteínas totales de la célula); actúa también como un amortiguador que regula el pH celular (7.4).

El *citosol* contiene soluciones verdaderas y coloidales; las primeras son mezclas homogéneas de sustancias y están constituidas por un soluto y un disolvente. El disolvente (el agua) es la sustancia en mayor cantidad y la que corresponde al estado físico observado, mientras que la sustancia en menor cantidad y que se disuelve en el disolvente es el soluto. Las partículas de solutos en las soluciones verdaderas son muy pequeñas y su diámetro es de 0.1 a 1 nm. Por ejemplo, los iones y los azúcares se encuentran formando soluciones verdaderas. Por su parte, las soluciones coloida-



les son heterogéneas y presentan un medio de dispersión y una sustancia o fase dispersa; estas soluciones, a su vez, pueden pasar de un estado de sol a gel. Los soles están compuestos de partículas sólidas, la sustancia dispersa contenida dentro de un líquido (el medio de dispersión). Las partículas que están dispersas muestran diámetros de 1 a 200 nm y tienen la propiedad de dispersar la luz. Por otro lado, los geles son un tipo especial de sol en el que las partículas sólidas están compuestas de moléculas muy grandes que interactúan. El resultado es que la estructura de un gel es más rígida que la de un sol. Por ejemplo, las proteínas del citosol forman soluciones coloidales que pueden favorecer el movimiento de la célula al pasar de sol a gel o viceversa. El endoplasma en estado de solución (líquido) fluye por el centro de la célula hacia un extremo de ésta mientras la parte lateral (ectoplasma) se convierte en un estado más gelificado que permite, junto con la actina (proteína del citoesqueleto), generar la fuerza necesaria para el movimiento celular. (figura 2).

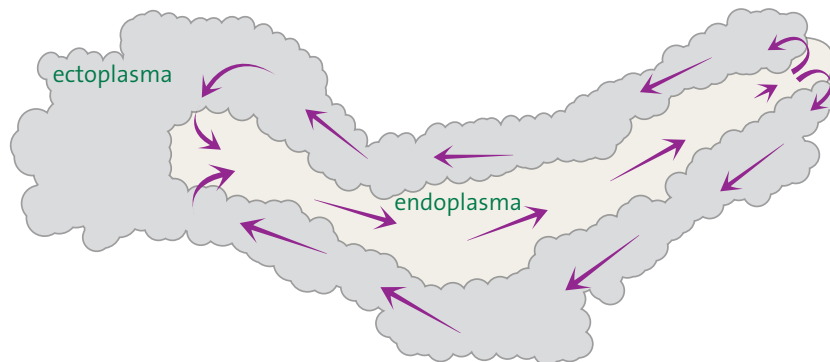


Figura 2. Organización del citosol.

El interior de un compartimento independiente (organelo) es llamado *lumen*; su ambiente acuoso difiere del citoplasma que lo rodea y en él se realizan procesos especializados, por lo que su contenido se ajusta a sus funciones.

El *retículo endoplasmático* (RE) está conformado por una serie de hojas membranosas interconectadas y que se continúan con la membrana externa de la envoltura nuclear. El lumen del RE proporciona un ambiente oxidante fundamental para una de sus funciones: el plegamiento de

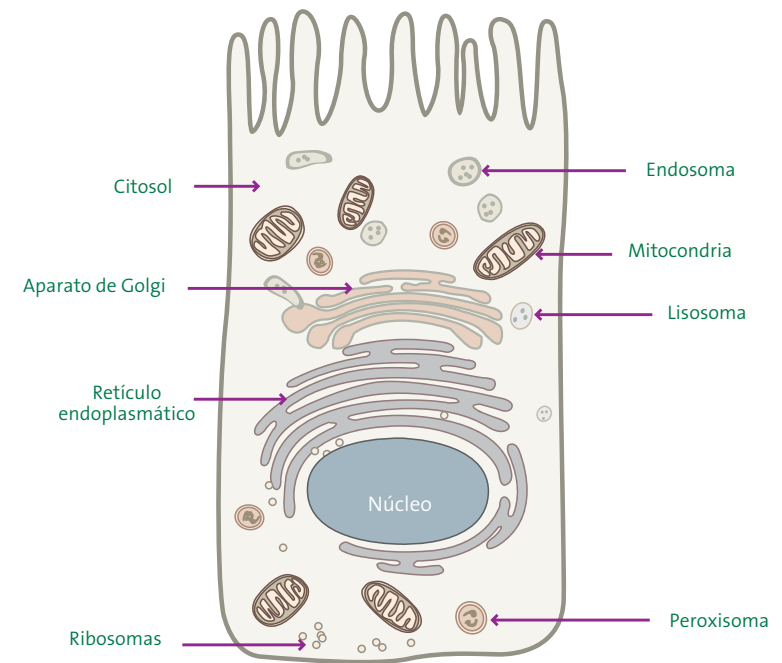


Figura 3. Estructura de la célula. Se pueden observar las estructuras contenidas en el citoplasma, conocidas como organelos.



proteínas y ensamblaje de proteínas con varias subunidades o cadenas polipeptídicas (*figura 3*).

El *aparato de Golgi* consiste en una serie de pilas de discos aplanados, cada uno delimitado por una membrana; la red trans de Golgi (o Golgi-trans) contiene los principales componentes de la *vía secretoria*: sus membranas se fragmentan, se desprenden y se fusionan moviendo su contenido y las proteínas de su membrana de compartimento a compartimento. Al final, las vesículas de secreción dejan el compartimento de Golgi-trans y se fusionan con la membrana plasmática. Las modificaciones covalentes de las proteínas que involucran la adición de pequeñas moléculas de azúcares ocurren en el RE y el aparato de Golgi (como se tratará en el capítulo 6). Otros organelos que son parte de esta red son los endosomas y lisosomas, donde ocurre la degradación de las proteínas (*figura 3*).

Las mitocondrias están involucradas en el manejo de la energía, ya que realizan las reacciones básicas que proporcionan a la célula moléculas ricas en energía, como el ATP. Finalmente, los peroxisomas son pequeños compartimentos vesiculares que contienen enzimas empleadas en varias reacciones de oxidación (*figura 3*, estos organelos se tratarán con detalle en el capítulo 7).

Citoesqueleto y movimiento celular

El nombre de *citoesqueleto* se deriva de las características estructurales de los elementos que proporcionan un soporte rígido, alrededor del cual se organiza el resto del citoplasma. Sin embargo, este concepto ha cambiado drásticamente, ya que ahora se sabe que el citoesqueleto es una estructura compleja y dinámica que se reorganiza en respuesta al medio que rodea a la célula. El citoesqueleto participa en la regulación de varias

funciones celulares, incluyendo la expresión génica, el transporte proteínico, el ciclo celular, el cambio en la morfología y movilidad de la célula, el movimiento interno de los organelos y la adhesión celular.

Las estructuras subcelulares que componen el citoesqueleto son fibras largas que se forman por la polimerización de subunidades proteínicas (*figura 4*). La forma alargada de estas estructuras les da las características esenciales para formar las partes de una maquinaria de la que se demanda fuerza mecánica. Los principales filamentos citoesqueléticos son los *microfilamentos* (8 nm de diámetro), los *microtúbulos* (25 nm de diámetro) y los *filamentos intermedios* (10 nm de diámetro) (*figura 5*). Las subunidades proteínicas de las que están compuestos son, respectivamente, actina, tubulina y una variedad de proteínas fibrosas interrelacionadas llamadas proteínas de filamentos intermedios. En una célula viva,

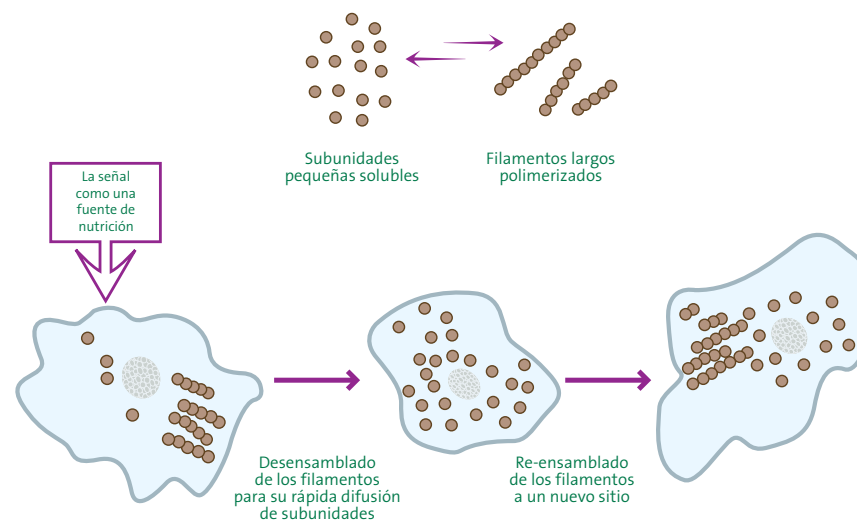


Figura 4. Representación de proteínas del citoesqueleto para la formación de filamentos por polimerización de subunidades más pequeñas en respuesta a una señal externa.



los tres tipos de filamentos del citoesqueleto están conectados unos con otros y sus funciones están coordinadas.

El citoesqueleto también contiene diferentes proteínas accesorias, las cuales, en concordancia con su afinidad y función, son conocidas como proteínas que se asocian a los microtúbulos (MAPs), proteínas que se unen a la actina (ABPs), proteínas que se asocian a filamentos intermedios (IFAPs) y proteínas que se unen a la miosina.

Microfilamentos: filamentos de actina (actina-F)

Aunque los microfilamentos se encuentran distribuidos por todo el citoplasma de una célula, la mayoría de ellos se concentra en una capa, justo

por debajo de la membrana plasmática, llamada *corteza celular* (o *córtex*) (figura 5a). En las células, los filamentos de actina pueden formar estructuras estables y estructuras lábiles. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y con los cambios de forma de la célula. También participan en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula, en respuesta a diversas señales extracelulares; son esenciales para algunas actividades contráctiles y controlan las interacciones celulares, la adhesión molecular y el transporte intracelular.

Estructura y composición

El principal constituyente molecular de los microfilamentos es la *actina*. Esta proteína ha sido altamente conservada durante el curso de la evolución, está presente en todas las células eucariontes y es una proteína globular con un peso molecular de 42 000 daltons (42 kDa), es decir, que tiene aproximadamente 420 aminoácidos que forman una cadena lineal o polipéptido. Su nombre se deriva del griego y significa *rayo*. Es una proteína ácida, pues contiene un elevado porcentaje de aminoácidos y una carga eléctrica negativa. Cada molécula de actina posee un sitio para unir Mg^{2+} , el cual forma un complejo con una molécula de ATP o ADP (figura 6).

La actina fue extraída y purificada por primera vez del músculo esquelético donde forma los filamentos delgados de las sarcómeras (que forman las unidades morfológicas y fisiológicas de la contracción). También es la proteína contráctil principal del músculo liso y se encuentra presente en una gran variedad de células no musculares. En los diferentes tipos de células de un organismo y en ocasiones dentro de una misma célula existen varias formas de actina. Las diferencias se deben principalmente a sustituciones de uno o varios aminoácidos que no alteran las propieda-

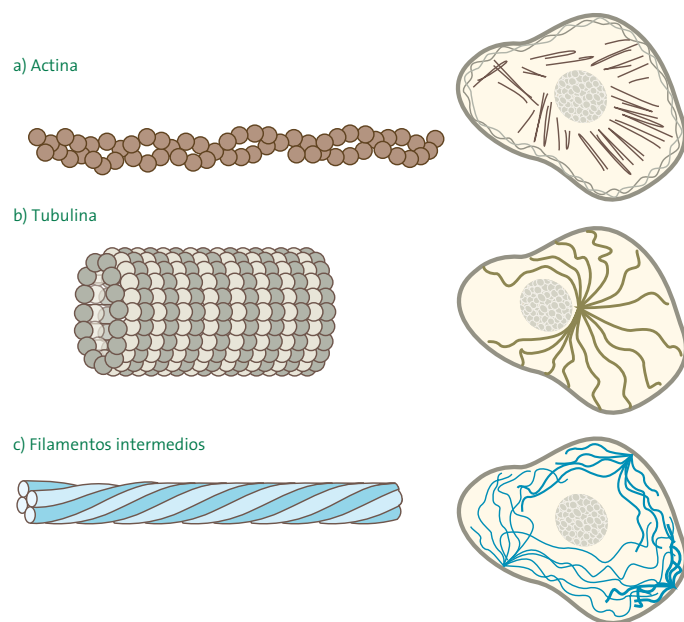


Figura 5. Esquema de los principales componentes del citoesqueleto. Se muestra la estructura de: a) actina, b) tubulina y c) filamentos intermedios, así como su localización dentro de la célula.

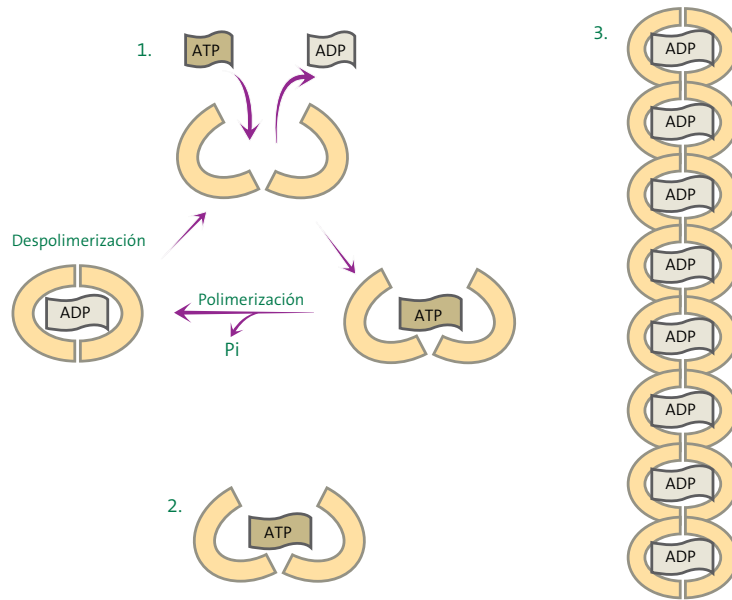


Figura 6. Polimerización de la actina. 1) y 2) los monómeros de actina deben enlazarse a una molécula de ATP antes de polimerizarse. 3) El ATP unido al monómero de actina se hidroliza a ADP con la liberación de un fosfato inorgánico (Pi) poco tiempo después de incorporarse al filamento naciente de actina (actina-F).

des funcionales de la proteína. Esto significa que en un mismo organismo pueden existir diferentes *isoformas de actina*. En los mamíferos y en las aves existen seis isoformas de actinas, clasificadas, según su patrón de expresión, en cuatro actinas musculares (α -esquelética, α -cardíaca, α -vascular y γ -entérica) y dos actinas no musculares o citoplasmáticas (β -actina y γ -actina). Ambos tipos de actina (muscular y no muscular) son codificados por genes diferentes. La β -actina es la principal isoforma de las actinas citoplasmáticas y está expresada en la mayoría de las células eucarióticas no musculares. Las actinas musculares son tejido-específicas y están funcionalmente relacionadas con la contracción muscular. En

cambio, las actinas citoplasmáticas están expresadas en todos los tipos celulares y participan en una gran variedad de funciones. Evidentemente, las isoformas de actina no sólo se expresan de modo diferencial en los distintos tipos celulares, sino también pueden coexistir dentro de la misma célula y dispersarse en diferentes regiones.

En presencia de ATP, Ca^{2+} y una mínima concentración de Na^+ y K^+ la actina aislada del músculo esquelético se despolimeriza en subunidades polipeptídicas *globulares* llamadas *actina-G* (42 kDa). La polimerización en *filamentos de actina* (*actina-F*) ocurre en presencia de Mg^{2+} y altas concentraciones de Na^+ y K^+ . El alargamiento de los filamentos de actina ocurre por la adición de subunidades de actina-G a uno de sus extremos. Los monómeros de actina-G se unen fuertemente a una molécula de ATP, el cual es lentamente hidrolizado a ADP después de la polimerización. Aunque el proceso de polimerización de actina no requiere energía, la hidrólisis del ATP permite a los filamentos de actina crecer por el alargamiento de uno de sus extremos [llamado extremo (+)], debido a la incorporación de monómeros de actina-ATP y, concurrentemente, acortar el extremo opuesto [llamado extremo (-)], por la liberación de monómeros de actina-ADP, proceso dinámico también llamado *intercambio rotatorio* o *treadmilling*. Cada microfilamento está formado por dos hebras de estos filamentos, estrechamente enlazadas en una doble hélice, con un diámetro de 6-8 nm (por lo común referidos como de 7 nm) y dos extremos diferentes. Los extremos de los microfilamentos son diferentes por tener velocidades de elongación distintas: el extremo (+) crece al menos cinco veces más rápido que el extremo (-). Esta diferencia de velocidad se debe a que las subunidades de actina siempre se acomodan de una misma manera: el sitio de unión al ATP está expuesto al citosol, mientras que el sitio contrario está en contacto con el filamento de actina. Por otra parte, la polaridad



extremo (+) o barbado



extremo (-) o punteado

Figura 7. Representación esquemática del extremo más (+) o barbado, donde se lleva a cabo la asociación de monómeros de actina, y el extremo menos (-) o punteado (o puntiagudo), donde se presenta la disociación de estos monómeros.

de la actina-F puede establecerse por su incubación con un fragmento específico de miosina (S1), el cual decora a los filamentos en una forma de *cabeza de flecha*. Es común hablar de "extremo punteado" y "extremo barbado", de acuerdo con la configuración de los fragmentos S1 unidos a los filamentos de actina. Con esta terminología usada para describir la polimerización de los filamentos de actina, la asociación neta toma lugar en el extremo barbado (extremo (+)), y la disociación ocurre en el extremo punteado (extremo (-)) (*figura 7*).

En condiciones de estado estacionario, cuando la concentración de monómeros de actina de ambos extremos desciende a concentraciones

críticas, el número de moléculas de actina adicionadas al extremo (+) balancea el número de moléculas, que se disocia del extremo (-), y esto da como resultado el *equilibrio dinámico* llamado *treadmilling*.

Los filamentos de actina son más delgados, más flexibles, y normalmente más cortos que los microtúbulos.

Proteínas que se unen a la actina

Los filamentos de actina interaccionan con otras moléculas para poder funcionar. Su interacción va a depender del tipo de célula en la que se encuentren y de las funciones que ésta lleve a cabo.

Existen cinco sitios principales en los que las proteínas de unión a la actina pueden llevar a cabo su efecto. Éstas se pueden unir a los monómeros, al extremo punteado del filamento, al extremo barbado, a los lados del filamento o entre dos filamentos para servir como moléculas de entrecruzamiento. Además de estas cinco formas de interacción, dichas proteínas pueden ser sensitivas o insensitivas al calcio.

Más de 50 proteínas, que se unen a la actina y afectan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina o el entrecruzamiento de los filamentos uno con otro, con otros componentes filamentosos del citoesqueleto o con la membrana plasmática, han sido descubiertas en el citosol de las células. Algunas, *in vitro*, por ejemplo, regulan la viscosidad de la actina purificada al formar puentes entre los filamentos; otras forman haces de éstos, provocando la rigidez de los mismos; otras forman conexiones a distancia entre haces o paquetes aislados, y otras más se unen a los filamentos aislados y regulan su polimerización rompiendo el filamento o estabilizándolo. Entre las proteínas asociadas a la actina se pueden citar a la *gelsolina*, la *tropomiosina*, la *severina*, la *fimbrina*, la *vellosina* y, desde luego, la *miosina*, que junto con la actina puede convertir la energía química del ATP en movimiento contráctil en muchos tipos de



células. Hace tiempo se pensaba que la actina y la miosina eran proteínas exclusivas de las células musculares. Ahora se sabe que también son proteínas estructurales en las células no musculares.

El citoesqueleto de actina es remodelado en respuesta a señales ambientales que estimulan la división celular, su diferenciación o locomoción. Para que el citoesqueleto de actina provoque la motilidad y los cambios de forma de las células, los mecanismos reguladores necesarios son: a) la inhibición de la polimerización espontánea de la poza de monómeros de actina; b) de la enucleación rápida de nuevos filamentos de actina, los filamentos de actina; c) el control del largo de los filamentos de actina y d) la prolongación de los filamentos preexistentes de actina. Las proteínas que se unen a la actina, reguladas por señales intracelulares, son las que median entre estos mecanismos. Colectivamente han sido llamadas *proteínas que se unen a la actina* (ABPs) y se clasifican de acuerdo con su sitio de unión a la actina o a su función:

1. Las proteínas que se unen a los monómeros de actina e inhiben la polimerización son: *profilinas*, *timosina-β4*, *fragmina* y el *factor despolimerizador actina* (ADF: *actin-depolymerizing-factor*). La profilina y la fragmina son sensibles al calcio, la primera en muchas células se encuentra asociada a la membrana plasmática.

Para la elongación rápida de los microfilamentos, en respuesta a las señales extracelulares que marcan el arreglo y localización de los mismos, la célula contiene una poza de monómeros de actina G, que puede ser usada. La velocidad de elongación de los filamentos de actina depende de la concentración de los monómeros disponibles para la polimerización. Para generar una rápida elongación la concentración de monómeros de actina disponible debe ser más grande que la *concen-*

tración crítica. Las proteínas de unión a monómeros de actina son las que regulan la velocidad de crecimiento del filamento.

La timosina-β4 forma complejos 1:1 con los monómeros de actina, con lo cual se inhibe la polimerización espontánea de los monómeros de actina y se previene la adición de los mismos a los filamentos existentes. Esta proteína se une con alta afinidad a los monómeros de actina-ATP, de tal forma que la poza de actina no polimerizada está constituida principalmente de actina-ATP (*figura 8a*).

La profilina también forma complejos 1:1 con los monómeros de actina; sin embargo, a diferencia de la timosina-β4, el complejo puede asociarse al extremo barbado de los filamentos de actina, disociándose de ésta para unirse a otro monómero de actina (*figura 8b*). Otra propiedad importante de la profilina es que puede catalizar el intercambio del nucleótido unido al monómero de actina, convirtiendo los monómeros de actina-ADP

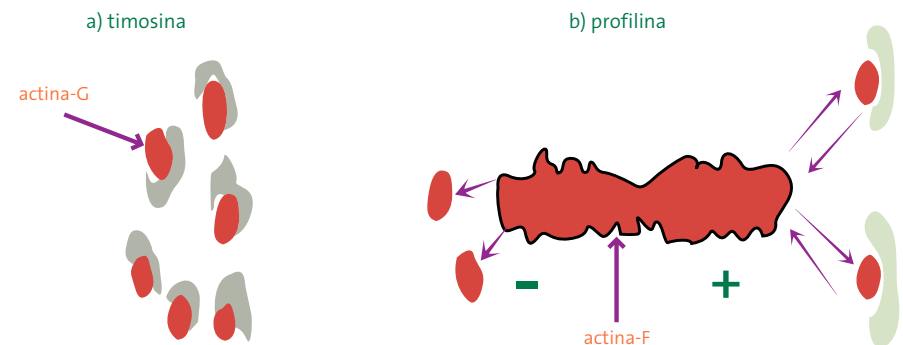


Figura 8. Proteínas que se unen a los monómeros de actina para inhibir su polimerización. a) La timosina se une a la actina G. b) La profilina se une a la actina F y G.



a actina-ATP, lo que permite mantener una poza grande de estos últimos para el crecimiento rápido del filamento.

2. Las proteínas de enucleación permiten a la célula controlar el tiempo y lugar de la formación de *novi* de los filamentos de actina. El *complejo Arp2/3* y las *forminas* enuclean filamentos *in vivo*.

In vitro la enucleación es el proceso más lento de los pasos de la polimerización de un nuevo filamento de actina, y es un punto importante en el control de la regulación de la polimerización de la actina celular. Las proteínas que facilitan la formación de *novi* de los filamentos son llamadas proteínas de enucleación.

El complejo Arp2/3 es un complejo proteínico macromolecular que está formado de Arp2, Arp3 y 5 proteínas adicionales. Aunque Arp2 y Arp3 son proteínas relacionadas con la actina, carecen de la habilidad para polimerizar en filamentos. Se cree que la Arp2 y Arp3 se asocian como un complejo que mimetiza un dímero estable, con un extremo barbado expuesto, con lo que se forma un núcleo estable para que se unan los monómeros de actina. Conforme el nuevo filamento se alarga en el extremo barbado, el complejo Arp2/3 permanece asociado con la punta del extremo. La enucleación por el complejo Arp2/3 puede ocurrir en la membrana plasmática. El nuevo filamento "hijo" enucleado crece por su extremo barbado formando una ramificación en un ángulo de 70° sobre un filamento "madre" preexistente (figura 9a).

Varias proteínas activan la formación del complejo Arp2/3 en la membrana en respuesta a las vías de transducción de señal, lo cual es importante para la protrusión de la membrana por

la actina. Estas proteínas son activadas por proteínas G pequeñas, entre las que se incluyen Scar (receptor supresor del AMPc), WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) y WAVE (del inglés *WASP family verproline-homologous protein*). Esas proteínas requieren de un filamento de actina preexistente para activar el complejo Arp2/3.

Por otra parte, las forminas son una familia de proteínas estructuralmente conservadas, cuyo nombre responde al descubrimiento de la participación del gen en la *deformidad* de las extremidades en el ratón (*limb deformity*). Éstas se caracterizan por permanecer asociadas al extremo barbado durante la elongación del microfilamento, protegiéndolo contra las proteínas de cubrimiento e incrementando así la velocidad de elongación, por su asociación directa con la profilina (figuras 9b y 10). Así, las forminas enuclean nuevos filamentos sin la necesidad de unirse a un filamento pre-existente, regulando el ensamblaje de fi-

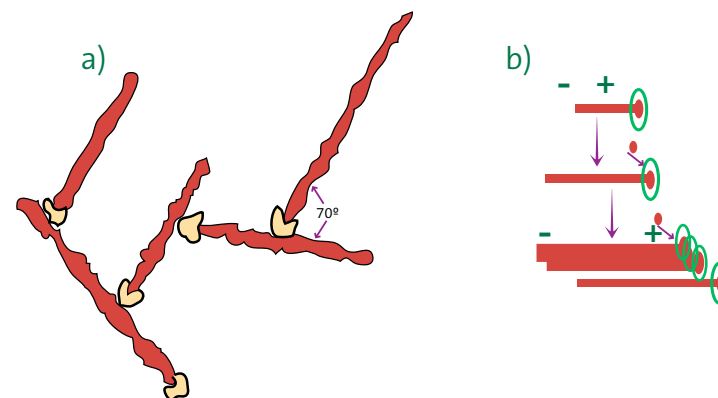


Figura 9. Formación de redes de filamentos de actina a partir de proteínas de enucleación conocidas como complejo Arp2/3 y forminas.

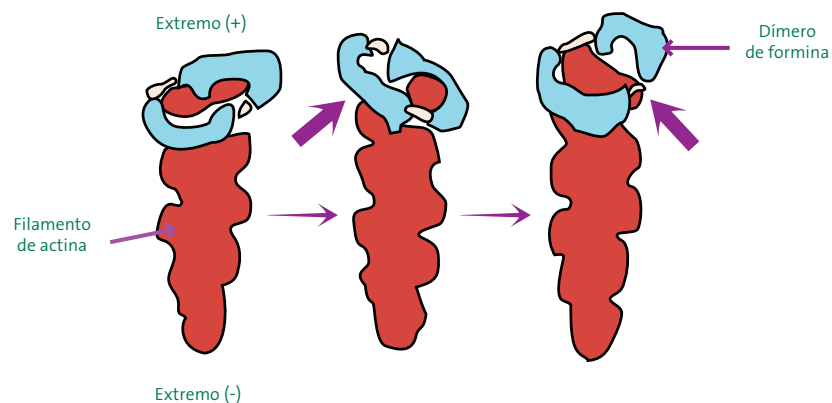


Figura 10. Esquema de la unión de la formina al extremo (+) del filamento de actina.

lamentos no ramificados, en lugar de las redes creadas por el complejo Arp2/3.

3. Las proteínas de cubrimiento o de caperuza (*capping*) inhiben la elongación de los filamentos de actina, uniéndose a su extremo barbado, o bien, al punteado. Las proteínas que cubren el extremo barbado limitan el largo de los filamentos de actina por prevenir su elongación, mientras que las proteínas que cubren el extremo punteado evitan su despolimerización.

Entre las primeras se incluyen las *capping* (también llamadas *CapZ*), EPS8 y miembros de la superfamilia de la *gelsolina* (figuras 11a y b). Ambos tipos de proteínas inhiben la elongación al prevenir la adición de monómeros, y su actividad es regulada por fosforilaciones de lípidos específicos de la membrana plasmática. El lípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) disocia estas proteínas, del extremo barbado de los filamentos de actina, proporcionando, por lo tanto, un mecanismo para evitar el *capping* de los filamentos

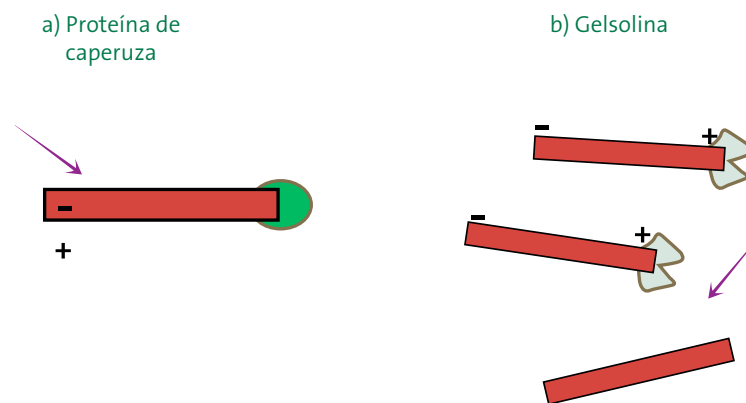


Figura 11. Proteínas que cubren el extremo + se incluyen a las llamadas a) caperuza (*capping*) y b) gelsolina. Ambas inhiben la elongación del filamento de actina.

en la membrana plasmática. El PIP₂ se localiza en la cara interna de la membrana plasmática y sus niveles se modulan en respuesta a señales mediadas por receptores acoplados a proteínas G. La regulación del destape regulado de los filamentos permite la elongación de estos filamentos hacia la membrana celular, un proceso clave para la migración celular y la protrusión de la membrana.

Por otra parte, las proteínas de la familia de la *tropomodulina* son proteínas que se expresan ampliamente en todas las células, y se unen a los filamentos de actina con gran afinidad en presencia de tropomiosina. Las tropomodulinas ayudan a regular, tanto el largo de los filamentos de actina en el músculo esquelético, como el ensamblaje dinámico de éstos en los eritrocitos y células epiteliales.

4. Las proteínas de corte y despolimerización regulan la dinámica de los filamentos de actina. Las proteínas reguladoras de actina,



miembros de la familia del factor de despolimerización *cofilina/actina* (ADF), se unen a los filamentos de actina y aceleran su desensamblaje por dos vías: incrementando la velocidad de disociación de las subunidades en los extremos de los filamentos, o fragmentando (cortando) los filamentos. Esto último también incrementa el número total de extremos disponibles para la elongación. La unión de las proteínas cofilina/ADF es cooperativa. Por microscopía electrónica se ha observado que la *cofilina* incrementa el porcentaje de enrollamiento helicoidal de las dos hebras de los filamentos, lo cual ejerce un estiramiento físico y ayuda a disociar a las subunidades y romper los filamentos (figura 12). La gelsolina (90 kDa) manifiesta esta actividad en presencia de Ca^{2+} . La *fragmina* y *severina* (45 kDa) son proteínas cortadoras y de caperuza en presencia de Ca^{2+} .

5. Las proteínas entrecruzadoras organizan a los microfilamentos en paquetes o redes tridimensionales. Los filamentos de actina en los paquetes están arreglados paralelamente, mientras que los filamentos en las redes se entrecruzan y están arreglados ortogonalmente. Ambas estructuras proporcionan fuerza mecánica a la célula y pueden empujar hacia adelante a la membrana conforme crece.

Los paquetes y redes están formados por la interacción entre los filamentos de actina y las proteínas entrecruzadoras, las cuales pueden interaccionar con dos filamentos a la vez, ya que poseen dos sitios de unión para los filamentos. Este tipo de proteínas puede dividirse en tres grupos. Algunas proteínas entrecruzadoras de filamentos son miembros de la familia de

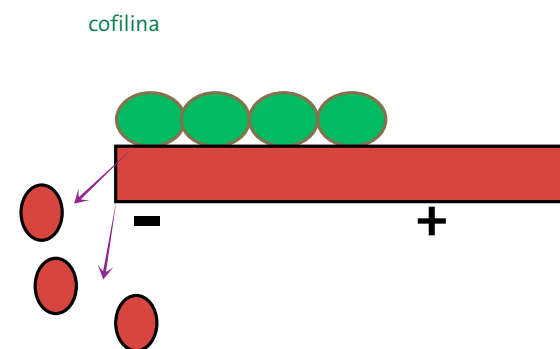


Figura 12. La cofilina es una proteína que regula la dinámica de los filamentos de actina aumentando su desensamblaje, ya sea incrementando la velocidad de disociación de las subunidades o cortando los filamentos.

proteínas con dominios de unión a actina (ABD, por sus siglas en inglés); son proteínas del grupo III e incluyen a la *fimbrina*, *α -actinina*, *espectrina*, *filamina* y la *ABP120* (figura 13). Muchas proteínas de la familia ABD forman homo o heterodímeros, pues cada molécula posee dos ABD y puede unir y entrecruzar dos filamentos diferentes. El tipo de arreglo formado depende de la organización geométrica y de la distancia entre los dominios. Por ejemplo, los dos ABD en un monómero de fimbriina están muy cercanos, lo que permite a esta proteína formar paquetes compactos como los encontrados en el centro de las microvellosidades. En contraste, los ABD de los dímeros de α -actinina, filamina, espectrina y las distrofina están más separados, por lo que estas proteínas forman paquetes laxos y redes de actina.

Otra clase de proteínas entrecruza los filamentos de actina de forma distinta a la familia de ABD; entre ellas se incluyen la

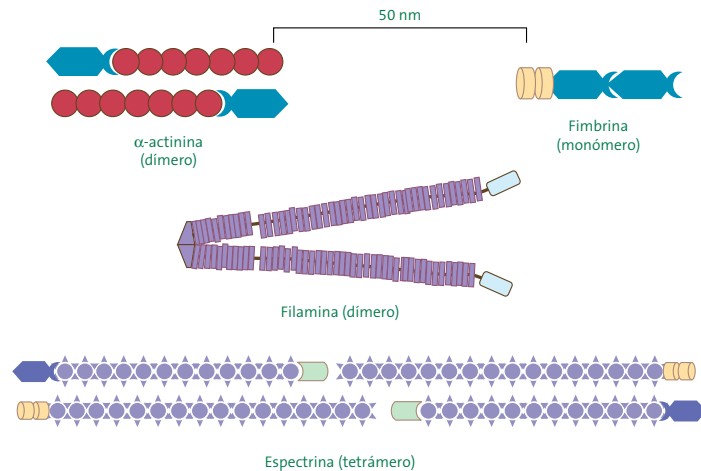


Figura 13. Las proteínas que permiten el entrecruzamiento de dos filamentos de actina a la vez pertenecen a la familia de las proteínas con dominio de unión a la actina (ABD). Éstas incluyen la α -actinina, fimbrina, filamina y espectrina.

fascina y la *villina*, las cuales pertenecen al grupo I y II, respectivamente. La *fascina* organiza los filamentos en paquetes compactos, como los encontrados en los filopodios de los conos de crecimiento de las neuronas. Tanto en la *villina* como en la *fimbrina* los dominios que se unen a la actina están muy cercanos y ambas proteínas participan en el entrecruzamiento de los microfilamentos en las microvellosidades.

En los eritrocitos, la *espectrina* (220-260 kDa) une los lados de los filamentos de actina a la cara interna de la membrana plasmática a través de una proteína conectora (*ankirina*), para formar un citoesqueleto submembranal complejo. En las células musculares las *distrofinas* conectan a los microfilamentos corticales entre sí y con proteínas integrales de la membrana.

Las células no eritroides, como las neuronas, células exocrinas y células epiteliales polarizadas, contienen proteínas homólogas a la *ankirina* y la *espectrina* (referida como *fodrina*) en dominios específicos de la membrana. En la punta de las microvellosidades, los extremos barbados del paquete central de filamentos de actina están conectados a la cara interna de la membrana plasmática a través de una placa densa de material no identificado y por puentes de un complejo-calmodulina (110 kDa).

6. La *proteína motora* de los microfilamentos es la miosina. La superfamilia de las miosinas consta de al menos dieciocho clases, algunas de ellas con múltiples isoformas. Su nombre se deriva de la voz *músculo*, ya que es en los tejidos musculares donde se encuentra en gran abundancia. A diferencia de la actina, las miosinas variaron mucho durante la evolución, puesto que la secuencia de aminoácidos, aunque algo similar, sí es diferente en los distintos tipos de células. Hay varios genes para las diferentes miosinas y, como en el caso de la actina, no todos se expresan en las mismas células. Todas las miosinas caracterizadas, con excepción de la *miosina tipo VI*, se mueven hacia el extremo barbado del filamento. Los tipos y miembros de las miosinas expresadas en una determinada célula u organismo varían considerablemente. Éstas tienen en común tres dominios: el de la cabeza, o dominio motor; el dominio regulador, y el de la cola. Los dos primeros participan en el movimiento, mientras que la función del dominio de la cola es participar en el ensamblaje de la miosina o en la unión de ésta con otros componentes de la célula para su transporte (*figura 14*).

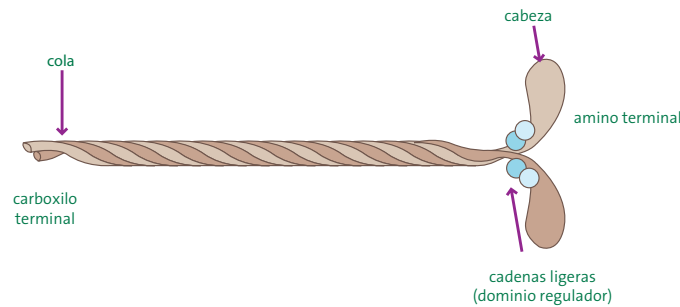


Figura 14. Esquema de la miosina (tipo II), proteína motora de los microfilamentos. Esta proteína tiene tres dominios: la cabeza o dominio motor, dominio regulador y la cola.

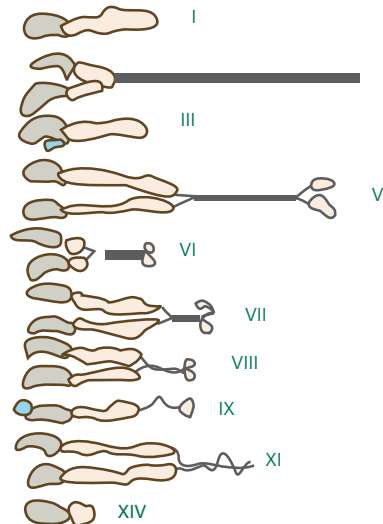


Figura 15. La superfamilia de las proteínas motoras tipo miosina se agrupan en cuatro grandes grupos. miosinas musculares o de contracción celular (tipo II); miosinas transportadoras (tipo V transporta organelos para la pigmentación) (tipo I, VI, IX y XI transporta vesículas de fagocitosis y endocitosis); Miosinas reguladoras de polaridad y forma (tipo I, III, VI, VII, IX, XV, XVI).

Las miosinas caracterizadas se reúnen en cuatro grandes grupos (*figura 15*):

- *Las miosinas musculares o de contracción celular* (familia de las *miosinas tipo II*) generan la fuerza contráctil del músculo esquelético, cardíaco y liso. También son responsables de la constricción del anillo contráctil durante la citocinesis, de la migración celular y de todos los eventos contráctiles de las células.
- *Las miosinas transportadoras de vesículas* mueven a éstas a través del citosol, empleando a los microfilamentos. Algunas de ellas juegan papeles esenciales en el transporte a corta distancia y distribución de las vesículas o de los organelos. Por ejemplo, las *miosinas V* transportan los organelos que contienen los pigmentos que dan el color a la piel y el pelo, mientras que las miosinas I, VI, IX y X participan en la formación y transporte de las vesículas fagocitadas y endocitadas.
- *Las miosinas reguladoras de la forma y polaridad celular* son requeridas para la formación y dinámica de las especializaciones de superficie celular ricas en actina, como los *lamelipodios*, *estereocilios* y *seudópodos*. Por ejemplo, algunas de las isoformas de *miosina tipo I* se unen a la membrana con el citoesqueleto de actina y proporcionan retracción a las protrusiones de membrana ricas en actina. La *miosina tipo VII* proporciona un puente contráctil entre el citoesqueleto de actina y las uniones extracelulares.
- *Las miosinas participan también en la traducción de señal y vías de percepción sensorial* a través de su asociación con



proteínas de señalización. Por ejemplo, la miosina I regula la actividad de algunos canales de calcio; la miosina III interactúa con moléculas de señalización en los fotoreceptores del ojo; se cree que la miosina IX es un regulador de la proteína Rho y que la miosina XVI es capaz de localizar en regiones celulares específicas a las fosfatasas. En la percepción sensorial, las mutaciones en las regiones codificadoras de las miosinas VI, VII y XV en las células ciliadas sensoriales del oído, provocan la pérdida de la audición, debido a la ruptura de las estructuras que contienen actina.

Estructuralmente, el *dominio motor* (80 kDa) de la miosina contiene los sitios de unión para la actina y el ATP, y es responsable de convertir la energía química de hidrólisis del ATP a trabajo mecánico. Este dominio motor catalítico está altamente conservado entre todos los miembros de la superfamilia de las miosinas.

El *dominio regulador* es una región que une las proteínas conocidas como cadenas ligeras (ya que tienen un peso molecular menor que la cadena pesada de la miosina) (figura 14). Muchas de las cadenas ligeras son calmodulina o proteínas semejantes a la calmodulina. Las modificaciones de las cadenas ligeras por fosforilación o por la unión de calcio regulan la actividad ATPasa de algunas miosinas.

En general, las miosinas tienen una estructura alargada, con un dominio motor consistente en un centro con una conformación en hoja β rodeado por α hélices. Cuando el ATP se une a su sitio de unión, altera tanto la conformación del sitio de unión para la actina como la del dominio regulador. Con ello, en el sitio de

unión para la actina se expone una hendidura en el extremo de la molécula, lo que baja la afinidad de la miosina por la actina.

El dominio regulador se extiende desde el dominio motor como una larga α hélice y juega un papel mecánico crucial en la función de la miosina, actuando como un brazo de palanca para la generación de fuerza. Los cambios de conformación en el sitio de unión al nucleótido, determinados por la unión de ATP, ADP-Pi o ADP, se transmiten del dominio regulador al motor. Estos cambios de conformación causan la rotación del brazo de palanca, de lo que resulta una fuerza generadora de un *golpe de poder*. Las cadenas ligeras estabilizan estructuralmente el dominio regulador, permitiendo que actúe como un brazo de palanca rígido.

Por otra parte, el *dominio de la cola* de la miosina es responsable de unir la miosina a otras proteínas y lípidos de la célula, o de que se asocie a otras moléculas de miosina. Por lo anterior, la secuencia y estructura del dominio de la cola es altamente divergente entre la superfamilia de las miosinas. Es decir, la cola especifica la naturaleza de la carga que se va a transportar (proteínas o lípidos) y permite que algunas miosinas formen dímeros u oligomericen en filamentos, así que en esta última forma tendrá dos o más dominios motores catalíticos. Por ejemplo, la combinación de varias miosinas tipo II produce un filamento grueso que, visto en el microscopio electrónico, tiene un diámetro de aproximadamente 30 nm. La parte de la molécula de miosina que interacciona con la actina (*fragmento S1*) se puede desprender del resto de la molécula, y ya separada puede seguir interaccionando con los filamentos de actina para formar complejos que, observados al microscopio electrónico, tienen

la apariencia de puntas de flecha. Esta unión es completamente específica de la actina.

El acoplamiento de la hidrólisis del ATP con la generación de cambios de conformación permite moverse a la miosina junto con su carga a lo largo de un filamento de actina.

En ausencia de ATP, la miosina se une fuertemente a la actina en una forma llamada el *complejo de rigor*, que se explica a continuación después de la muerte, los niveles de ATP disminuyen, y el músculo se vuelve rígido debido a esta fuerte unión entre la actina y la miosina (o actomiosina), resultado del *rigor mortis*.

Durante el ciclo de hidrólisis del ATP la afinidad de la miosina por la actina cambia y los intermediarios bioquímicos pueden ser definidos de acuerdo con su afinidad por los filamentos de actina. Así, la miosina unida a ATP o ADP-Pi presenta un estado de “unión débil” o “pregeneradora de fuerza”, donde se pega y despegas de los filamentos de actina. En este estado, si el filamento de actina es empujado sobre la miosina, ésta se deslizará; la miosina girará a su estado pregolpe de poder, encrestándose a sí misma para el paso generador de fuerza (figura 16).

La miosina acoplada a ADP o sin nucleótido se encontrará unida fuertemente a un sitio específico de las subunidades de actina del filamento, será el intermediario “portador de fuerza” y podrá llevar a cabo el “golpe de bateo”. Si un filamento de actina fuese empujado, la miosina –fuertemente unida a éste– puede resistir el movimiento y actuar de manera efectiva como un anclaje del filamento.

Por otra parte, la actividad generadora de fuerza y localización celular de las miosinas está regulada por su fosforilación y

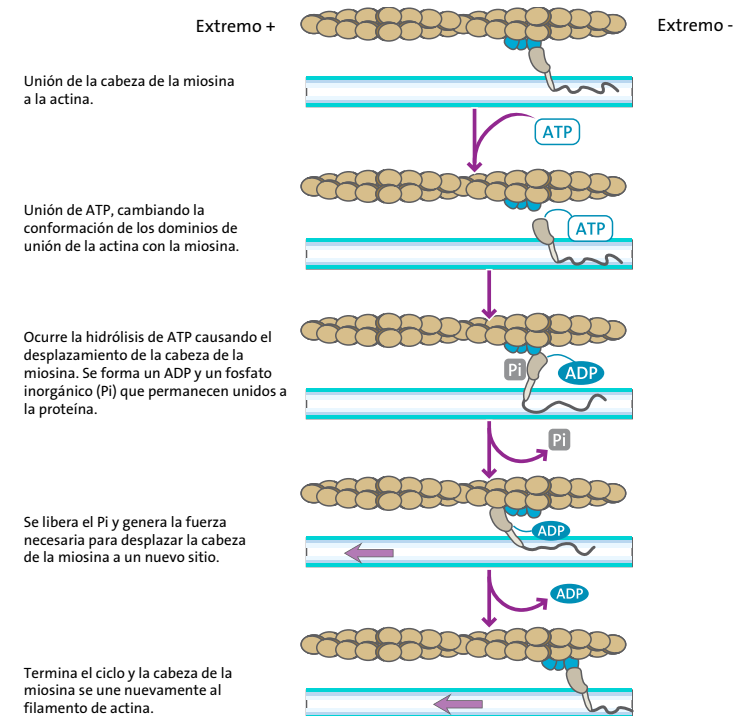


Figura 16. Esquema de la secuencia de eventos que llevan a la contracción muscular.

por su interacción con proteínas que se unen a la miosina. Dos de estas últimas son la *tropomiosina* y la *troponina*, expresadas en el músculo estriado. En algunas miosinas la fosforilación se lleva a cabo en las cadenas ligeras unidas al dominio regulador.

Estructuras formadas por arreglos de actina-F en las células animales

Una gran variedad de procesos de movimiento celular son esenciales a través del ciclo de vida de las células eucariontes. Desde los estadios



tempranos del desarrollo, el movimiento celular es fundamental para la generación del organismo. Las células musculares primarias migran al sitio donde el limbo será formado; las células endoteliales forman la pared de los vasos sanguíneos, las neuronas migran a su posición apropiada y envían los axones y dendritas para encontrar las células blanco. También en el organismo adulto la motilidad es crucial a menudo como una respuesta a situaciones patológicas. Las células inmunes de vertebrados invaden el tejido infectado para eliminar el agente infeccioso. Los fibroblastos que rodean una herida migran hasta hacer contacto uno con otro. Las células se mueven en respuesta a señales del medio que las rodea. El sistema de microfilamentos es considerado la maquinaria de la migración celular.

Para migrar, la célula se sirve de los arreglos dinámicos del citoesqueleto de actina para formar estructuras que protruyan o para generar fuerzas intracelulares que conduzcan al desplazamiento celular (figura 17). Típicamente dos rasgos celulares se asocian con la migración celular: los *lamelipodios*, que son largas hojas semejantes a velos y que contienen una gran cantidad de microfilamentos ramificados y entrecruzados, y los *filopodios*, que son estructuras largas delgadas, que a menudo se proyectan más allá del borde de los lamelipodios y poseen paquetes paralelos de microfilamentos. Para que una célula se mueva de un lugar a otro, necesita apoyarse en un sitio nuevo y retraer su parte trasera. El nuevo sitio de unión o contacto focal, que constituye una unión física entre el sustrato y el citoesqueleto de actina, se forma por detrás de la punta que avanza y, mientras éstos maduran en focos de adhesión, empujan a la célula hacia adelante. Subsecuentemente, los sitios de adhesión en la parte trasera de la célula son liberados, permitiendo que la célula empuje su trasero hacia la dirección de movimiento.

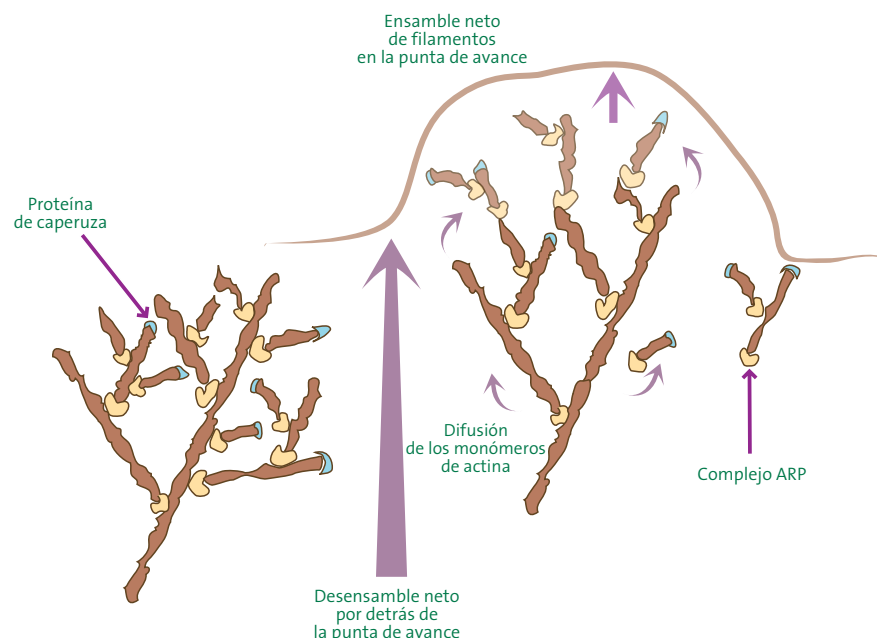


Figura 17. Arreglo de los filamentos de actina para la generación de fuerza intracelular que conducen al desplazamiento celular. En el lamelipodio los microfilamentos de actina se ramifican, se entrecruzan e inician el ensamblaje de la actina por un extremo, mientras que por el otro se desensambla para el avance.

Los lamelipodios y los filopodios se forman por la polimerización de los monómeros de actina globular (actina-G) y proteínas de unión a actina.

En una célula en reposo, es poco o no necesario cambiar los filamentos de actina. Por lo tanto, el extremo (+) es bloqueado, y los monómeros de actina de las pozas (o almacenes) forman un complejo con las proteínas secuestradoras o inhibidoras de la polimerización. La enucleación es uno de los determinantes principales de la motilidad celular.

La actina es muy abundante en el citoplasma de muchas células animales; comprende 5% o más del total de las proteínas presentes. Los

filamentos de actina están generalmente organizados dentro de varias estructuras discretas. Las principales estructuras son: 1) filopodios, que son protuberancias en forma de dedo, dispuestas en un haz apretado de microfilamentos en dirección de una protuberancia. Este tipo de estructuras se encuentra principalmente en las células móviles o en los conos de las neuronas en crecimiento; 2) lamelipodios, son protuberancias en forma de malla que se localizan en los bordes de los fibroblastos en cultivo y en muchas células móviles, y 3) fibras de estrés, son haces de filamentos de actina que atraviesan la célula y se unen a algunas proteínas de matriz extracelular mediante otras proteínas (figura 18).

Las estructuras de los microfilamentos toman uno de los cuatro patrones principales de arreglos posibles: 1) redes tridimensionales de filamentos, 2) paquetes paralelos de filamentos con la misma polaridad, 3) redes submembranales de actina-espectrina (*fodrina*) y (4) paquetes paralelos de filamentos con polaridades alternantes (figura 19).

Esta diversidad de arreglos es determinada por la interacción de muchas ABPs, así como por los cambios en las concentraciones de moléculas de señalización intracelular como el Ca^{2+} y el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), y por estrés mecánico.

- **Redes tridimensionales.** Están hechas de una malla de filamentos que cruzan en diferentes ángulos y distancias. En los puntos de contacto las ABPs entrecruzadoras como la *filamina*, forman uniones flexibles entre los microfilamentos; la corteza submembranal de muchos tipos de células animales presenta redes complejas de actina-F. Los filamentos de actina se unen por medio de proteínas a la cara interna de la membrana plasmática y por lo tanto proporcionan una red flexible para la bica-

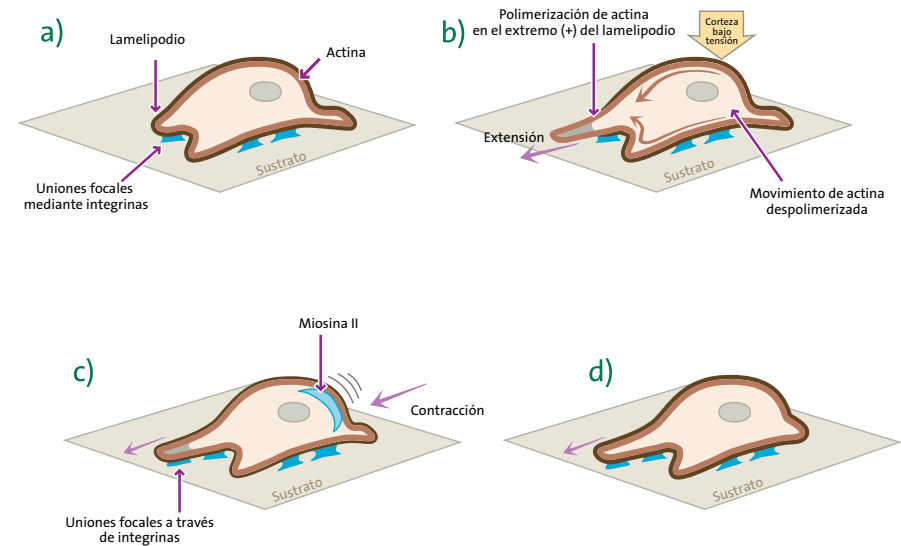


Figura 18. Representación esquemática de las fuerzas generadas para el desplazamiento de una célula sobre el sustrato: a y b) la polimerización de la actina depende de la extensión del lamelipodio; c) el cuerpo celular se desplaza hacia adelante sobre el contacto adherente (integrinas) gracias a la extensión del lamelipodio y a la contracción del borde posterior de la célula; d) la célula se aparta de su contacto posterior y se inicia de nuevo el ciclo.

pa lipídica. En el eritrocito, la *espectrina* está unida a la porción citoplasmática de una proteína transmembranal, llamada *banda 3*, a través de puentes de *ankirina*.

- **Migración celular.** Muchas células necesitan desplazarse a diferentes partes de su hábitat, y en los organismos multicelulares algunas se mueven de un órgano a otro. Éste sería el caso de los neutrófilos y macrófagos que se desplazan al tejido dañado o infectado en respuesta a los estímulos, quimiotáxicos de la inflamación, de las células embrionarias que se reorganizan para

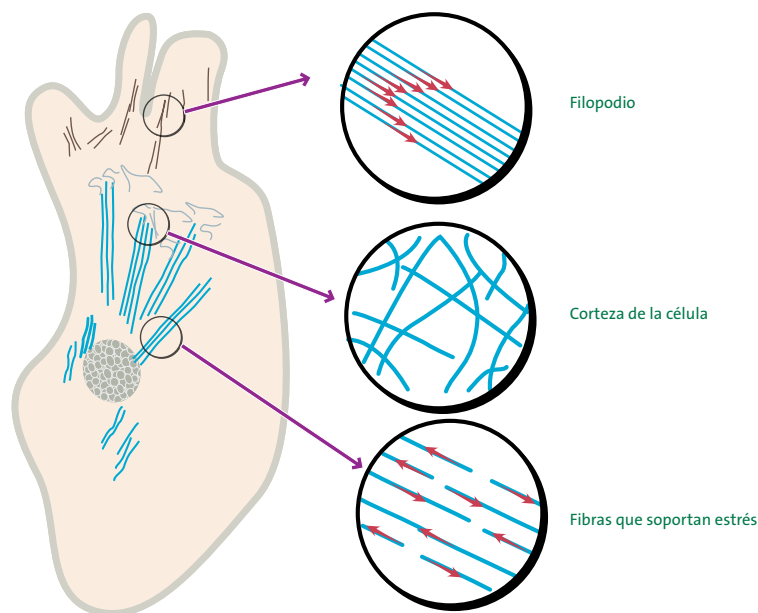


Figura 19. Los patrones de arreglo de los microfilamentos pueden formar redes tridimensionales de filamentos (corteza de la célula), paquetes paralelos de filamentos con la misma polaridad (filopodios), paquetes paralelos de filamentos con polaridades alternantes (fibras de estrés).

formar órganos, o de las células cancerosas para formar metástasis. Como se indicó, la locomoción de las células es acompañada por extensiones de la superficie celular en forma de hojas ondulatorias llamadas *lamelipodios*. De manera particular en los lamelipodios, se ha descrito una transición en la consistencia del citoplasma, denominada gel-sol, donde el estado más rígido corresponde al *gel* y el líquido al *sol*. El mecanismo del movimiento reside principalmente en la organización de la actina en el *citoplasma cortical* (también llamado *córtex*) o *ectoplasma*. Esta

banda de citoplasma periférico, localizado justamente debajo de la membrana celular, es particularmente transparente y sufre cambios notorios en su consistencia, precisamente cuando se forma un lamelipodio. Cuando se encuentra en un estado gelatinoso rígido es capaz de soportar grandes presiones. Al cambiar a la condición líquida, este citoplasma cortical se expande hacia donde se está desplazando la célula. Mientras la punta del lamelipodio se adhiere al sustrato, en el resto del mismo se produce un movimiento semejante a un oleaje, llamado de plegamiento (*ruffling*), que ocasiona que el citoplasma fluya a la punta del lamelipodio llevando a la célula hacia adelante. Periódicamente, la forma de pera que adquiere la cola de la célula se despegue y es empujada al cuerpo de la célula.

- **Locomoción de los fibroblastos.** La locomoción se inicia con la extensión de un lemipodio en el borde de avance de la célula, de tal forma que la célula empieza a moverse hacia adelante. Al mismo tiempo, las placas de adhesión anclan la superficie de la célula al sustrato y el plegamiento de la corteza se desarrolla en la región caudal. Esta última región permanecerá unida temporalmente al sustrato y poco después se acortará para formar una fibra de retracción, la cual será despegada y llevada al cuerpo de la célula. *In vivo*, los fibroblastos son células estacionarias, excepto durante la cicatrización de una herida; normalmente éstos se adhieren a las fibrillas de colágena y mantienen una tracción sobre ellas.

Las *fibras de estrés* son paquetes paralelos de filamentos de actina que se desarrollan en el citoplasma de los fibroblastos a partir de la red de actina subcortical en respuesta a una tensión



mecánica. Estas fibras por lo general unen la membrana plasmática a la matriz extracelular, en contactos focales, a través de glucoproteínas transmembranales. Así, las fibras de estrés indirectamente unen la cara interna de la membrana plasmática a través ensambles moleculares de proteínas de unión a la actina, las cuales incluyen a las proteínas α -actinina, vinculina y talina.

La fibronectina es una glucoproteína de la familia de las integrinas que sirve como un enlace transmembranal al unir la talina del lado citoplasmático y la fibronectina en el lado externo de la membrana. El empuje de las fibras de estrés a las estructuras de adhesión puede ser producido por el ensamblaje bipolar de moléculas de miosina no muscular, y ocasionar el deslizamiento de los filamentos de actina con polaridad opuesta.

- **Citocinesis.** La citocinesis se inicia con la relajación astral de la corteza celular, seguida por la acumulación de filamentos de actina y moléculas de miosina en una banda ecuatorial circunferencial para finalmente formar el *anillo contráctil*. Este último constriñe al citoplasma, produciendo un *surco de rompimiento* circunferencial (figura 20).
- **Fagocitosis.** Es un proceso donde las partículas sólidas son ingeridas por los leucocitos (neutrófilos y macrófagos) o por protozoarios. Inicialmente, ocurre una unión fuerte entre receptores de membrana y ligandos, localizados respectivamente en la superficie de la membrana plasmática y la partícula sólida. Las ondulaciones de los lamelipodios se extienden de la superficie de la célula para engullir la partícula. Por debajo del sitio de contacto, los filamentos de actina cortical se organizan en paquetes. En pocos minutos, los extremos de los lamelipodios

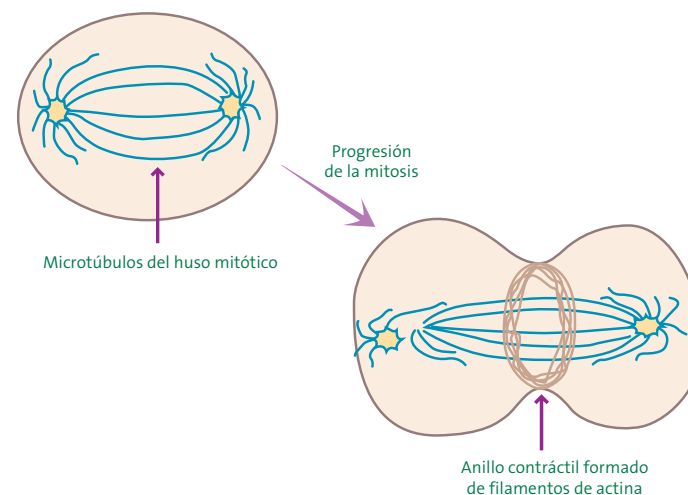


Figura 20. Organización de la actina durante la citocinesis para la formación del anillo contráctil que contribuye a la división celular.

se fusionan y la partícula es invaginada dentro de una vesícula fagocítica limitada por la membrana. Esta última se fusiona con un lisosoma formando un fagosoma, donde se produce la digestión de la partícula por la acción de las enzimas lisosomales.

- **Cono de crecimiento neuronal.** Su formación involucra la expansión móvil del citoplasma en la punta de una neurita (axón o dendrita) y puede ser observado tanto en el embrión en desarrollo como en las neuronas que crecen en un cultivo. Diferentes tipos de células nerviosas muestran variaciones en la morfología y el tamaño en sus conos de crecimiento. Sólo los conos de crecimiento que sean capaces de alcanzar un blanco se transformarán en una sinapsis; de lo contrario, sufrirán una degeneración.
- **Paquetes paralelos de filamentos de actina con polaridad uniforme.** Las microvellosidades de las células epiteliales del



intestino (enterocitos) contienen paquetes de filamentos de actina cubiertos por la membrana plasmática y unidos a ella mediante un complejo formado por una proteína de 110-kDa y *calmodulina*. A su vez, los filamentos de actina están unidos unos a otros por medio de *fimbrina* (68 kDa) y *villina* (95 kDa). Los paquetes de actina que parten de la raíz de las microvellosidades se dispersan horizontalmente formando una red filamentos por debajo de las microvellosidades: *la red terminal*, en la cual varias proteínas citoesqueléticas, *espectrina* (fodrina), *miosina*, *actinina* y *tropomiosina* están presentes. La actina en la red terminal también forma un anillo periférico, el cual está asociado con la membrana plasmática en las superficies laterales de los enterocitos (*figura 21*).

- **Paquetes de filamentos de actina con polaridad opuesta.** Estos paquetes están mejor ejemplificados por las miofibrillas de las sarcomeras de las células del músculo esquelético y cardíaco, las cuales son estructuras estables altamente organizadas. Las sarcomeras son unidades periódicas repetitivas que consisten en arreglos de filamentos de actina paralelos. El extremo barbado de los filamentos de actina de cada arreglo está unido por medio de α -actinina a las porciones transversas llamadas discos Z. El extremo punteado de los filamentos de actina está orientado hacia la línea media de las sarcómeras. La región central de la sarcómera contiene filamentos gruesos de miosina, los cuales se interdigitan con los filamentos de actina, para deslizarse a lo largo de éstos durante la contracción muscular, de tal forma que la sarcómera se acorta. Es decir, las cabezas de los filamentos gruesos de miosina forman puentes cruzados con los filamentos

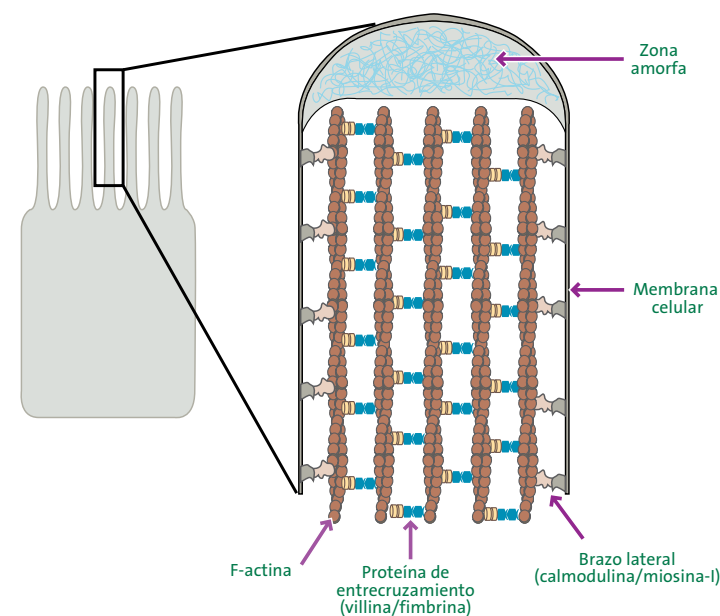


Figura 21. Esquema de la organización de las microvellosidades de una célula epitelial. Los filamentos de actina están cubiertos por la membrana plasmática y unida a ella por un complejo proteico formado por *calmodulina*. Se observan las proteínas de unión entre los filamentos de actina, como son la *villina* y la *fimbrina*.

delgados de actina, y la fuerza de contracción generada en la sarcómera se da por la formación cíclica y disociación de complejos entre la actina y las cabezas de miosina. La hidrólisis del ATP maneja la asociación y disociación cíclica de la actina y la miosina.

La contracción muscular es iniciada por la señal de una fibra nerviosa motora, la cual dispara un potencial de acción que se propaga a lo largo de la membrana plasmática hacia el sistema de túbulos T y el retículo endoplasmático, donde ocurre una liberación de Ca^{2+} en el citoplasma. Las proteínas accesorias



estrechamente asociadas con la actina (troponina T, I y C), junto con la tropomiosina, median la acción del calcio. Otras proteínas accesorias (titina, nebulina, miomesina, etc.) sirven para proporcionar estabilidad y elasticidad a la miofibrilla (*figura 16*).

Drogas que actúan sobre los microfilamentos

Las *citocalasinas* son productos sintetizados por hongos que impiden la polimerización de la actina, ya que se unen al extremo (+) de los microfilamentos. Las *faloidinas* son toxinas aisladas del hongo *Amanita*, que se unen muy fuertemente a los lados de los filamentos de actina y los estabilizan, impidiendo su despolimerización. La citocalasina es de gran utilidad para el estudio del movimiento celular, mientras que la faloidina se emplea, como derivado fluorescente, para marcar los filamentos de actina.

Agentes infecciosos

Listeria monocytogenes, una bacteria que provoca una forma aguda de envenenamiento alimentario, penetra por fagocitosis en la célula; entonces secreta enzimas que rompen la membrana del fagosoma y se libera en el citosol de la célula huésped. Una vez en el citosol, no solamente crece y se divide, sino que se desplaza hacia las células adyacentes movilizándolo el sistema de motilidad basado en los filamentos de actina de la célula huésped. Mediante la nucleación de los filamentos de actina en su parte trasera, la bacteria se desplaza por el citosol a una velocidad de 10 μm por minuto o más, dejando tras ella una cola de filamentos de actina (como la cola de un cohete). Cuando colisiona con la membrana plasmática de la célula huésped, se desplaza hacia el exterior induciendo la formación de una larga y fina microespiná, en cuyo extremo se sitúa la bacteria. El ensamblaje se induce por una proteína específica de la superficie de la bacteria

que actúa indirectamente secuestrando las proteínas de la célula huésped, incluida la *profilina*.

Microtúbulos

Los microtúbulos están presentes en todas las células eucariontes, desde los protozoarios hasta las células de los animales superiores (*figura 5b*) y plantas, pero se encuentran ausentes en los eritrocitos de los mamíferos y en procariontes. Los microtúbulos participan en un gran número de funciones celulares, incluyendo el mantenimiento de la polaridad y forma celular, mitosis, citocinesis, posicionamiento de organelos, transporte intracelular a dominios específicos, transporte axoplasmático y locomoción celular.

Estructura y función de los microtúbulos

Los microtúbulos son los filamentos del citoesqueleto más largos; tienen un diámetro de aproximadamente 25 nm, una pared con un grosor aproximado de 5 nm y un lumen central de cerca de 15 nm (*figura 22*). Constan de *tubulina* y proteínas asociadas. La tubulina es un heterodímero de 100 kDa, está compuesta de α -tubulina y β -tubulina. La α -tubulina es un polipéptido globular que contiene 451 residuos de aminoácidos, mientras que la β -tubulina, la cual es más corta, contiene 445 residuos de aminoácidos. Estas dos especies moleculares de tubulina comparten entre sí 40% de los residuos de aminoácidos.

Existe una familia heterogénea de genes de ambos tipos de tubulina, lo que permite la regulación diferencial de estas proteínas por múltiples programas de expresión de genes durante el desarrollo y la diferenciación. Se ha postulado que en el ámbito celular la expresión de los genes de tubulina puede ser regulada por: 1) la expresión selectiva de alguna familia génica y no de otras; 2) la integración de la síntesis de α y β -tubulinas, y 3) el establecimiento de los niveles apropiados de síntesis de α - y β -tubulina



durante el desarrollo, diferenciación y en el ciclo celular. La tubulina surge muy tempranamente durante el curso de la evolución de los eucariontes unicelulares y proporciona la maquinaria para el reparto de cromosomas en la mitosis, locomoción celular y el mantenimiento de la forma.

Ensamblaje de los microtúbulos

Cuando los heterodímeros de la tubulina son ensamblados en los microtúbulos, estos forman *protofilamentos* con la subunidad de β -tubulina de una molécula de tubulina unida covalentemente con la subunidad α de la próxima. La pared de los microtúbulos está formada por 13 protofilamentos arreglados lado a lado formando un cilindro alrededor de un lumen vacío (figura 22). El arreglo de subunidades dentro de un microtúbulo

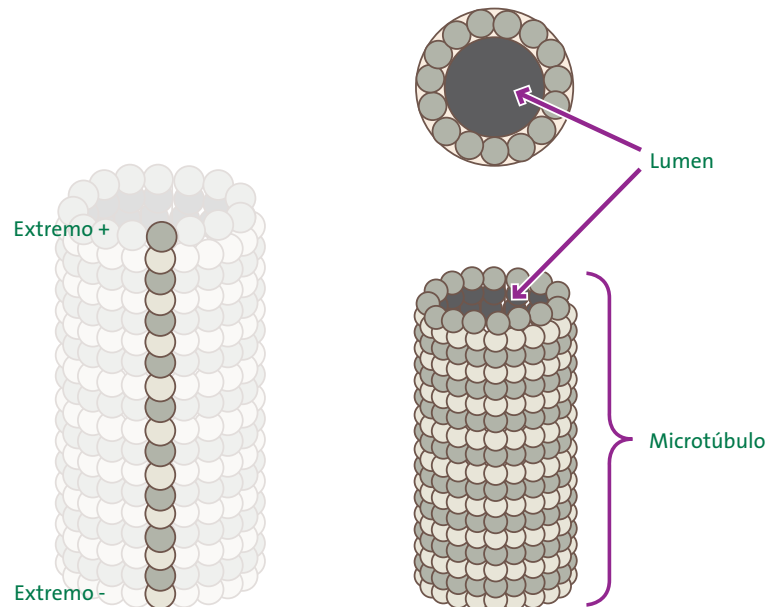


Figura 22. Organización de los monómeros de α -tubulina y β -tubulina para la formación del microtúbulo.

crea en él dos extremos diferentes (figura 22). Ello se debe a que dentro de cada protofilamento todos los heterodímeros de tubulina tienen la misma orientación, y a que en cada microtúbulo todos los protofilamentos corren en la misma dirección. Así, una cubierta de β -tubulina es la expuesta en un extremo del microtúbulo (llamado extremo más) mientras que en el extremo opuesto es un anillo de α -tubulina (llamado extremo menos). Esta organización da a los microtúbulos dos propiedades muy importantes: *a)* que sus dos extremos sean estructuralmente diferentes y puedan comportarse diferencialmente y *b)* que cada microtúbulo tenga una polaridad —una direccionalidad inherente— y esté orientado hacia una u otra dirección. Esta polaridad está presente a lo largo de todo el microtúbulo, no sólo en sus extremos, lo que le permite actuar como pista para los motores moleculares. Por ejemplo, en un fibroblasto o cualquier otro tipo de célula con un arreglo radial de microtúbulos, estos estarán arreglados con sus extremos más cerca de la periferia.

Por otra parte, la incorporación de los heterodímeros de tubulina en los microtúbulos estimula a la β -tubulina para hidrolizar el GTP a GDP. Así, el centro de un microtúbulo en crecimiento estará compuesto de GDP-tubulinas; por lo tanto, el estatus GTP o GDP de las tubulinas en la punta del microtúbulo determina su estructura, y ésta a su vez condiciona que un microtúbulo se acorte o se alargue. En el caso del extremo más del microtúbulo, es el GTP asociado a la β -tubulina el que se encuentra expuesto y esto dificulta que se acorte.

Los microtúbulos pueden formar estructuras estables como el axonema de los cilios y flagelos, o estructuras transitorias como las fibras del huso mitótico. Los microtúbulos son ensamblados de pozas de dímeros solubles de tubulina del citosol, por un fenómeno de polimerización y elongación unidireccional. El proceso es complejo y es regulado por mu-



chos factores como la concentración iónica, proteínas asociadas a microtúbulos y por los centros organizadores de microtúbulos (COMs).

Los dímeros de tubulina unen dos moléculas de GTP, la unión de los dímeros al extremo de los microtúbulos produce la hidrólisis del GTP a GDP. Aunque el proceso de polimerización no requiere energía, el proceso de hidrólisis incrementa la velocidad de polimerización.

Los microtúbulos son estructuras extraordinariamente dinámicas, constantemente se alargan o acortan por la adición o pérdida de subunidades de tubulina. Es posible que las células necesiten la dinámica de los microtúbulos para fácilmente adaptarse a nuevos propósitos. Así, la dinámica de los microtúbulos puede ser empleada por la célula para buscar un espacio intracelular, reorganizarse y generar fuerzas. Estas propiedades hacen de los microtúbulos un citoesqueleto dinámico adaptable a un amplio rango de funciones celulares.

Durante la evolución, la dinámica de los microtúbulos podría haber sido seleccionada debido a la capacidad de generar fuerza y causar movimiento. Tal movimiento es posible si un objeto es capaz de sujetarse a la punta de un microtúbulo en crecimiento o en acortamiento, y le permite ser empujado o jalado conforme el microtúbulo cambia de longitud. El movimiento acoplado al acortamiento de microtúbulos usa la energía almacenada en la hidrólisis del GTP a GDP que ocurre cuando polimerizan. Sin embargo, muchos movimientos en las células son generados por las proteínas motoras y no por el crecimiento o acortamiento de los microtúbulos, pero es interesante especular que la dinámica de los microtúbulos podría haber evolucionado primero, ya que permite la organización rápida del citoesqueleto en respuesta a una señal, así como buscar blancos en el citoplasma y generar fuerzas. La velocidad de elongación del microtúbulo en su extremo más es considerablemente mayor que en su extremo menos.

Funciones de los centros organizadores de microtúbulos

Los *centros organizadores de microtúbulos* (MTOC) sirven para nuclear (iniciar la generación de un microtúbulo a partir de un grupo pequeño de moléculas de tubulina), estabilizar y ordenar la disposición de los microtúbulos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Dos grandes grupos de MTOC han sido identificados morfológicamente:

1. MTOC formados por un gran arreglo regular de microtúbulos paralelos, como el visto en centríolos y cuerpos basales.
2. MTOC con forma de estructuras esféricas semejantes a anillos constituidos de materia amorfa electrodensa.

Los MTOC de ambos tipos inician la enucleación rápida de microtúbulos *in vitro*, aun a bajas concentraciones de tubulina. Todos los centrosomas enuclean los microtúbulos que crecen con su extremo más hacia el frente. Los centrosomas enuclean un arreglo astral de microtúbulos que radian en todas direcciones. Los cuerpos basales inician el arreglo paralelo de los microtúbulos que se encuentran en el axonema. Las estructuras proximales de los cuerpos basales y de los centríolos son idénticas. En algunas especies, puede haber la interconversión entre centríolos y cuerpos basales, mientras que en otras los cuerpos basales deberán surgir de nuevo.

Las células dan comienzo al ensamblaje de microtúbulos empleando una estructura específica, el centro organizador de microtúbulos (MTOC), que funciona para enuclear a los microtúbulos. Los MTOC también organizan los microtúbulos en una célula, ya que a menudo permanecen asociados con el extremo menos de los microtúbulos que nuclean, y así determinan su posición y orientación.

En las células animales el MTOC más común es el *centrosoma* (figura 23), el cual está compuesto de un par de *centríolos* rodeados por la



matriz pericentriolar. Los centriolos son estructuras pequeñas en forma de barril y están organizados en ángulo recto, uno con otro, en el centro del centrosoma. Los centriolos están contruidos de estructuras de microtúbulos inusuales llamadas tripletes de microtúbulos, nueve de los cuales están dispuestos simétricamente para formar la pared del barril. Cada triplete de microtúbulos contiene un microtúbulo completo (el tubo A) y dos microtúbulos parciales (los tubos B y C). Además de la α - y β -tubulina, los centriolos contienen otros dos miembros de la superfamilia de proteínas de tubulinas, δ y ϵ -tubulina. Las tubulinas no son los únicos componentes de los centriolos y la matriz pericentriolar; al menos 100 tipos diferentes de proteínas forman estas estructuras.

La matriz está compuesta parcialmente de γ -tubulina, otro miembro de la superfamilia de tubulinas. La γ -tubulina se encuentra con otras proteínas en un complejo llamado el anillo complejo de tubulina (γ TuRC) (figura 24).

Los γ TuRC del material pericentriolar unen a la α - y β -tubulina y son los componentes del centrosoma que nuclea a los microtúbulos.

La nucleación de los microtúbulos por los γ TuRC establece la orientación de los microtúbulos en muchas células. Puesto que los γ TuRC se asocian sólo con los extremos menos (-) de los microtúbulos, los extremos más (+) de los microtúbulos nucleados por un centrosoma dan hacia la parte externa de éste.

Las células animales motiles (por ejemplo, la célula espermática) contienen un segundo y más especializado MTOC: el cuerpo basal. Los cuerpos basales sirven como moldes para el ensamblaje del axonema: que es un paquete complejo de microtúbulos que forma el centro de cilios y flagelos, y es responsable de su movimiento. Los cuerpos basales estructuralmente son muy semejantes a los centriolos, contienen los mismos nueve tripletes de los microtúbulos arreglados en forma de barril.

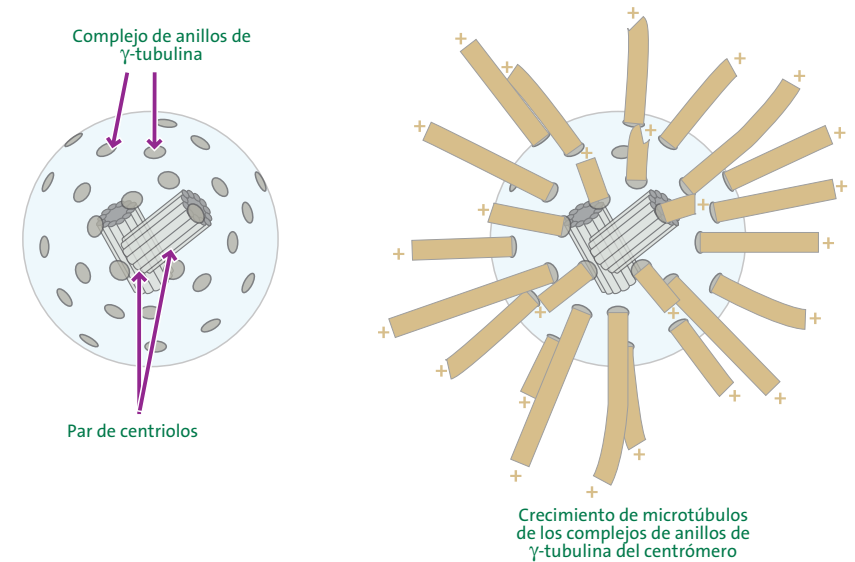


Figura 23. Esquema del centrosoma o centro organizador de microtúbulos (COMs). Consiste en una matriz amorfa que contiene complejos de anillos de γ -tubulina que permite el crecimiento de microtúbulos y un par de centriolos. En el segundo esquema se observa el crecimiento de los microtúbulos por el extremo más, mientras el extremo menos permanece anclado a los anillos de γ -tubulina.

De hecho, en algunas células el cuerpo basal puede convertirse en centriolos. Sin embargo, a diferencia de los centriolos, el cuerpo basal no necesita actuar en pares y nuclea microtúbulos directamente en lugar de una matriz pericentriolar. Durante la formación de un cilio o de un flagelo, los microtúbulos crecen directamente del triplete de microtúbulos dentro del cuerpo basal. El cuerpo basal permanece unido al extremo menos de los microtúbulos formados, y está presente en la base de cilios y flagelos en función.

No todas las células emplean a los centrosomas para nuclea microtúbulos, pero todas las células eucariontes poseen un MTOC más; en



los hongos, el equivalente de los centrosomas es una estructura llamada *huso polar del cuerpo*, la cual está embebida en la envoltura nuclear. Muchos tipos de células animales diferenciadas, incluyendo las neuronas, células epiteliales y células musculares poseen arreglos de microtúbulos que no están anclados a los centrosomas, lo que sugiere que otros MTOC, más pequeños, pueden estar posicionados dentro de la célula para crear arreglos especializados de microtúbulos. Por ejemplo, las células epiteliales poseen un número de sitios de enucleación localizados cerca del extremo apical de la célula. Los extremos más crecen de los MTOC apicales hacia el extremo basal de la célula. Todos los MTOC de plantas, animales u hongos contienen γ -tubulina, lo que indica que todos los MTOC emplean un mecanismo similar para enuclear los microtúbulos.

Proteínas asociadas a los microtúbulos

Las células usan el citoesqueleto de microtúbulos para una amplia variedad de funciones, y de acuerdo con éstas requieren, bien microtúbulos estables, o bien, microtúbulos dinámicos. Para esta diferenciación, las células emplean las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP), algunas de las cuales modifican la inestabilidad dinámica al incrementar o disminuir la incorporación o sustracción de tubulina en los extremos de los microtúbulos, mientras que otras funcionan como puentes entre los lados o las puntas de los microtúbulos y la membrana de vesículas o alguna otra estructura.

En otras palabras, las MAP pueden unir los microtúbulos y llevar un gran número de funciones, incluyendo la promoción de su ensamblaje, construcción, generación de fuerzas químico-mecánicas y el transporte de vesículas y organelos.

En las neuronas han sido identificados dos tipos principales de MAP:

1. MAP fibrosas, incluyendo MAP2 (270 kDa) y tau (50-68 kDa), que sirven para regular el ensamblaje y empaquetamiento de los microtúbulos.
2. MAP generadoras de fuerzas, en las que se incluye la *cinicina* (110-13 kDa), *dineína* (1200-1900 kDa) y *dinamina* (100 kDa). Éstas son ATPasa mecanoquímicas, y existen evidencias de que en el cerebro la dineína y la dinamina entrecruzan los microtúbulos en paquetes.

En los diferentes tipos celulares, las MAP varían en número y cantidad relativa: MAP2 se encuentra principalmente en las dendritas, mientras que tau se restringe al axón. Esta última proteína es un componente de las marañas observadas en la enfermedad de Alzheimer.

Tanto MAP2 como tau poseen dos regiones funcionales separadas, una de ellas es el sitio de unión de los microtúbulos que sirve para nuclear el ensamblaje y controlar la velocidad de elongación de éstos (por disminuir la velocidad de ensamblaje). El segundo dominio funcional compartido por ambas proteínas es una secuencia corta en α -hélice en el extremo C-terminal, que por interacciones entre ella misma puede entrecruzar a los microtúbulos en paquetes, por lo cual posiblemente sea la responsable de la organización de los microtúbulos en arreglos paralelos densos de axones y dendritas.

Varias proteínas unen a los microtúbulos sólo en su extremo (+). Estas MAP son referidas como puntas (+). Un tipo de puntas (+), encontrada en muchas clases diferentes de células, es CLIP-170, cuya función es estabilizar a los microtúbulos al promover su rescate o unir los endosomas a los microtúbulos.

Por otra parte, las células pueden incrementar también la velocidad de movimiento de los microtúbulos, como ocurre durante la mitosis. Ello



se debe a los MAP que hacen a los microtúbulos menos estables. Existen tres formas generales en las que los desestabilizadores trabajan: rompiendo la cubierta de GTP para estimular la catástrofe de los microtúbulos; cortando los microtúbulos en pedazos para producir más extremos que puedan acortarse, o uniéndose a las subunidades de tubulina libre para disminuir la cantidad de tubulina disponible para polimerizar.

Los microtúbulos pueden ser cortados por una proteína llamada *katanina*, la cual se une a sus paredes y los fragmenta entre las subunidades de tubulina. Son varias moléculas de katanina las que deben unirse a un microtúbulo e hidrolizar ATP para poder romperlos. Por ejemplo, la katanina es requerida para el ensamblaje del huso mitótico.

Otro ejemplo de proteína desestabilizadora de microtúbulos, que lo hace a través del rompimiento de la cubierta de GTP, es la *cinesina* (o *quinesina*) asociada a los centromeros mitóticos (MCAK, por sus siglas en inglés). La MCAK es un miembro de los motores moleculares de la superfamilia de cinesinas, pero a diferencia de muchos motores moleculares, no transporta carga; en su lugar, se une a los extremos de los microtúbulos y desestabiliza la estructura de su punta para con ello favorecer la formación de protofilamentos, lo que provoca que la pared del microtúbulo se doble.

La actividad de las MAP es regulada reversiblemente por fosforilación y desfosforilación. Por ejemplo, la fosforilación de la proteína tau disminuye su afinidad por los microtúbulos y, por lo tanto, reduce la estabilización de éstos.

La fosforilación de MAP2 es catalizada por cinasas como la AMPc-kinasa dependiente de calcio-calmodulina, y al hacerlo disminuye su habilidad para unirse a tubulina y, en consecuencia, para estabilizar los microtúbulos. Además, la fosforilación de MAP2 (y de muchas otras proteínas) depende del AMPc, el cual puede dispararse por diversas hormo-

nas, neurotransmisores o la luz (en las células sensitivas a la luz). En ciertas estructuras, como en el axonema, los microtúbulos pueden sufrir un tipo de estabilización más permanente, resultado de una maduración postraducción de las subunidades de α -tubulina; estas modificaciones también pueden cambiar la dinámica de ensamblaje de los microtúbulos, por alterar las propiedades de unión de la α -tubulina a las MPA.

Una de las principales funciones de los microtúbulos es servir como rieles para el movimiento de material de un lugar a otro de la célula. Los cargueros que mueven las cargas sobre estos rieles intracelulares son llamadas *proteínas motoras*. Los motores moleculares son proteínas que se unen a los microtúbulos y usan ciclos repetidos de hidrólisis de ATP para generar un movimiento continuo a lo largo de esas estructuras. Estos motores liberan vesículas de secreción a la membrana plasmática, transportan vesículas internalizadas como los endosomas y desplazan a las mitocondrias y al retículo endoplasmático por el citoplasma de la célula. Un ejemplo espectacular y muy visible del trabajo de los motores moleculares es el movimiento coordinado de los gránulos pigmentarios en las células de algunos peces o de la piel de algunas especies de anfibios. En respuesta a las hormonas o señales del sistema nervioso, los motores moleculares dependientes de microtúbulos colectan sucesivamente estas vesículas en el centro de la célula o las dispersan en el citoplasma, permitiendo que el animal cambie de color y evite a los depredadores.

Además del movimiento de diversas membranas internas, los motores mueven a los cromosomas durante la mitosis y posicionan el huso en la célula. También los motores generan el movimiento de cilios y de flagelos, permitiendo que las células especializadas, como el espermatozoide, naden, y las células estacionarias muevan el material sobre su su-



perficie. Algunos virus secuestran los motores de la célula y los emplean para transportarse al núcleo de ésta.

Los motores moleculares también pueden rehacer y organizar el sistema de caminos por el cual corren.

Son dos las familias de motores moleculares que las células poseen para desplazarse sobre los microtúbulos: las *cinesinas*, que generalmente se mueven hacia el extremo más del microtúbulo, y las *dineínas*, que se mueven hacia el extremo menos (*figura 24*). Así, los motores que se mueven hacia el extremo menos del microtúbulo transportan su carga hacia el centro de la célula (hacia el núcleo o al aparato de Golgi), mientras que los motores con dirección al extremo más desplazan su carga a los bordes de la célula (hacia la membrana plasmática).

La carga desplazada por la dineína o la kinesina pueden ser los propios microtúbulos, por lo que frecuentemente estas proteínas motoras tienen un papel importante en la organización y reorganización de los microtúbulos dentro de la célula. En el caso de que un microtúbulo se encuentre anclado (por ejemplo al centrosoma), los motores pueden desplazarse y transportar una carga a lo largo de éste. Si la situación es al revés, y la proteína motora es la que está anclada (por ejemplo a la corteza de la célula), ésta mueve a los microtúbulos, ayudando en este caso a reorganizar su arreglo. Cuando es el propio microtúbulo el que es desplazado, su polaridad es importante, ya que determina la dirección de su propio movimiento.

Las proteínas motoras consisten de un par de dominios globulares grandes idénticos unidos al extremo de un dominio en forma de vara, que generalmente dan a la proteína una forma larga y delgada (40-100 nm). Muchas proteínas motoras también poseen un par de dominios pequeños en el otro extremo. Los dominios globulares grandes contienen tanto

el sitio de unión al microtúbulo como el sitio de unión al ATP y son referidos como los dominios de *cabeza* o *motor*. Éstas son las únicas partes necesarias para generar fuerza; los otros dominios permiten que la fuerza que se genere sea usada para un propósito específico dentro de la célula. Por otra parte, las proteínas motoras son únicas, ya que poseen un “pie” extra que se extiende de la cabeza globular. En el caso de la dineína, es la punta del pie la que se une a los microtúbulos. El dominio del extremo opuesto a las dos cabezas de una proteína motora es llamado *la cola*; aquí es donde se une la carga que se va a transportar, por ejemplo, alguna vesícula.

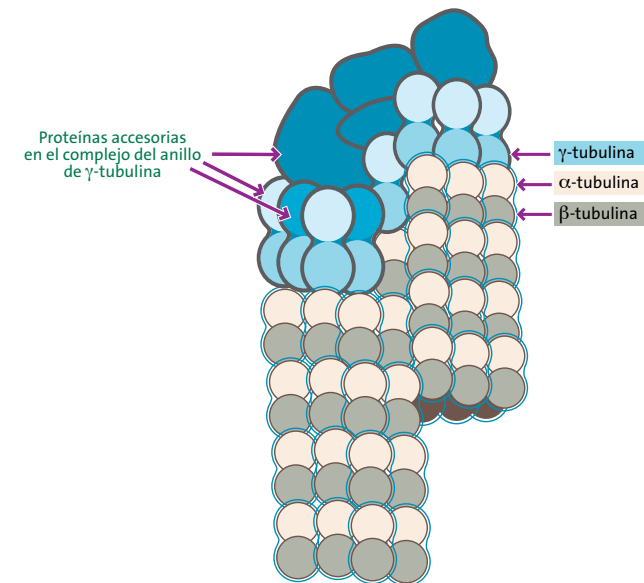


Figura 24. Modelo de polimerización de la tubulina a través de la nucleación por el complejo de anillo de la γ -tubulina.



Básicamente, una proteína motora sencilla contiene polipéptidos de diferentes tamaños. Muchas de ellas pueden contener un dímero del polipéptido más grande, al cual se le da el nombre de *cadena pesada*. Una gran proporción de la longitud de las dos cadenas pesadas está conectada por interacciones *cola con cola*, lo cual le da la forma de vara a la región central de la proteína. Las regiones en cada extremo de la porción central forman el dominio de la cabeza y de la cola, respectivamente. En cada tipo de proteína motora, uno o dos diferentes polipéptidos más pequeños —llamados *cadenas ligeras*— están asociados a cada una de las cadenas pesadas, y a menudo sirven para regular la función motora de las proteínas.

La familia de las cinesinas es bastante grande; en el ser humano existen alrededor de 45 diferentes proteínas motoras de este tipo. La superfamilia de cinesinas puede dividirse en tres amplios grupos, de acuerdo con la posición del motor dentro de la cadena pesada. La primera cinesina identificada tiene su dominio motor cerca del extremo N-terminal. Esta cinesina “convencional” mueve vesículas hacia el extremo más del microtúbulo. Otros miembros de la superfamilia tienen el dominio motor cerca del extremo C-terminal de la cadena pesada. Este tipo de cinesinas se mueven hacia el extremo menos de los microtúbulos. Sólo unas pocas cinesinas tienen el dominio motor cerca de la mitad de la cadena pesada (por ejemplo, la MCAK) y, en lugar de proporcionar movimiento, regulan la dinámica de los microtúbulos, empleando para ello la energía de hidrólisis del ATP, con el fin de debilitar la estructura en el extremo del microtúbulo.

Por otra parte, las colas de algunas cinesinas pueden asociarse para formar un motor bipolar con cuatro cabezas, con lo cual quedan los dominios motores en direcciones opuestas para que las proteínas unan dos microtúbulos a la vez y los deslicen uno sobre otro; esto último es importante durante la mitosis. Tal actividad es fundamental para la formación

del huso mitótico y la citocinesis. Claramente, la única carga de este tipo de proteínas motoras de microtúbulos es la misma, y su función es estrictamente el reacomodo del citoesqueleto de éstos.

Comparada con la cinesina, la familia de la dineína es relativamente pequeña. La dineína sólo se mueve hacia el extremo menos de los microtúbulos. Todas las células contienen una sola forma citoplasmática de dineína, la cual funciona como transportadora de carga y durante la mitosis. La dineína citoplasmática es un dímero de dos cadenas pesadas idénticas, que proporcionan a cada molécula dos dominios de motor. El otro miembro de la familia de dineínas, las del axonema, se encuentra específicamente en los cilios y flagelos; en contraste con la dineína citoplasmática, éstas se encuentran formadas por heterodímeros o heterotetrámeros de las distintas cadenas pesadas.

Tanto la dineína como la MAP2 interactúan en los mismos sitios de unión de los microtúbulos, localizados en el extremo C-terminal de la α - y β -tubulinas. Además, la MAP2 inhibe la actividad ATPasa de la dineína y, por lo tanto, previene el deslizamiento de los microtúbulos. Así, la MAP2 y otras MAP fibrosas pueden ser reguladoras *in vivo* de la motilidad basada en microtúbulos.

Las proteínas motoras utilizan el ATP como combustible para poder moverse. El principal requerimiento básico para una proteína motora es que sufra un gran cambio de conformación al pasar el ATP unido a ADP. Esto es acompañado por cambios en el dominio motor y las partes vecinas de la molécula, que son análogas a la forma en que movemos los brazos y las piernas. Tanto para las proteínas motoras como para nuestras extremidades, un cambio pequeño de la forma en un lugar es amplificado para producir un cambio mayor de la forma o posición en otro lugar. En las proteínas motoras, el dominio motor de la cabeza sufre cambios pequeños en la región en la que une el ATP (sitio de unión al nucleótido)



como resultado de la hidrólisis del ATP a ADP. Estos cambios dentro del sitio de unión al nucleótido son amplificados en otra parte de la molécula, moviéndose una de las cabezas hacia adelante.

Los motores moleculares y los peatones también comparten el requerimiento de ser capaces de dejar la superficie sobre la cual se encuentran; de otra forma, ninguno podrá desplazarse. Para despegarse de un microtúbulo, una proteína motora debe disminuir su afinidad por éste. El qué tan fuerte esté una proteína motora unida a un microtúbulo lo determina el nucleótido que ocupe su sitio de unión específico para éste. Para la cinesina, la unión al microtúbulo es más fuerte cuando es el ATP el que se encuentra unido. Por lo tanto, los que regulan la fuerza de unión de la proteína a los microtúbulos son la hidrólisis del ATP y la liberación del nucleótido. Ya que la hidrólisis del ATP también causa un cambio de forma en el dominio motor de la cabeza, el ciclo unión, la hidrólisis y la liberación del nucleótido coordina los cambios en la cabeza de la proteína motora y, en consecuencia, su unión a los microtúbulos. Esto permite a los motores dar un “paso” a lo largo del microtúbulo por cada ATP hidrolizado —un ciclo de unión al microtúbulo, cambio de conformación y liberación.

Los motores con dos cabezas pueden moverse cabeza sobre cabeza, de tal forma que una cabeza pasa sobre la otra por cada paso que dé. Este tipo de movimiento es análogo a la forma en la que caminamos, es decir, a cada paso un pie se mueve hacia adelante del otro. El mecanismo alternativo que pueden tener los dominios motores es moverse como gusanos: una de las cabezas se arrastra primero hacia adelante y después la otra, repitiéndose el ciclo. El primer mecanismo es el más común en los motores de dos cabezas.

Para la habilidad de caminar de la cinesina es esencial un dominio pequeño llamado *cuello de conexión*, que conecta el dominio de la cabeza de la cinesina con su dominio cola-cola. El cuello de conexión es la parte de

la molécula de cinesina cuya función es amplificar los pequeños cambios en la estructura del sitio de unión al nucleótido para que ésta pueda dar pasos de tamaño significativo.

Tanto la cinesina como la dineína caminan a lo largo del microtúbulo dando pasos de 8 nm.

Las células necesitan mover cargas diferentes a sitios específicos de localización en el citoplasma. La especificidad es adquirida por sitios adaptadores y proteínas motoras. La unión de la carga a la proteína correcta es mediada por el dominio de cola de la misma. En la gran familia de cinesinas, los dominios en cola son muy diferentes entre ellas y cada uno se distingue como una proteína motora única. Los dominios motores son mucho más similares y no contribuyen a la especificidad de la carga. De esta forma, el dominio en la cabeza es la maquinaria común a todos los cargadores, y el dominio de cola son los remolques cargados con un grupo único de carga selecta.

En general, el dominio en la cola del motor no une la carga en forma directa. Típicamente es una proteína adaptadora la que une una proteína de la membrana de una vesícula a uno de los extremos de la cola del motor, y la cola del motor, al otro extremo, conectando indirectamente el motor a la vesícula. El adaptador mejor caracterizado es el *complejo dinactina*, un complejo de siete polipéptidos y un filamento corto compuesto de *Arp1* (una proteína estrechamente relacionada con la actina).

Otras cargas incluyen algunos ARNm y partículas virales, aunque las últimas claramente no son cargas normales para las células.

Por otra parte, la posición de los organelos dentro de la célula y la forma de ésta a menudo tienen una definida asimetría intencional.

La organización asimétrica de una célula principalmente depende del arreglo, del cambio dinámico y del movimiento de las proteínas motoras



a lo largo de los microtúbulos. Sin embargo, los microfilamentos y los filamentos intermedios también participan en la organización de la arquitectura interna de una célula, de tal forma que cada uno de los tres sistemas de filamentos interactúa y controla el comportamiento de los otros dos.

En las células los microtúbulos se ensamblan y desensamblan por la inestabilidad dinámica que presentan, la cual se refiere al crecimiento de algunos microtúbulos y el acortamiento de otros, de manera simultánea. En las células vivas, el extremo más de los microtúbulos es mucho más dinámico.

Las células en interfase poseen dos poblaciones de microtúbulos que difieren en la velocidad de movimiento. Una de estas poblaciones es dinámica y cambia rápidamente (en minutos), mientras que la otra consta de microtúbulos bastante más estables, que por lo común tardan una hora o más en desestabilizarse y no crecen o se acortan de sus extremos más, lo que sugiere que estos extremos se encuentran cubiertos.

Los microtúbulos estables son considerablemente más abundantes en las células no mitóticas diferenciadas, como las musculares, epiteliales o las neuronas.

Los microtúbulos pueden ser liberados de los centrosomas, aunque la velocidad en que esto ocurra dependerá del tipo celular y el estado fisiológico de la célula. Se ha observado que la liberación de los microtúbulos del centrosoma ocasiona que sus extremos más y menos estén libres en el citoplasma. Por ejemplo, en los fibroblastos, los microtúbulos libres rápidamente se desensamblan, y sólo aquellos que se encuentren anclados a los centrosomas persisten. Por otra parte, en las células epiteliales y en las neuronas, el extremo (-) de los microtúbulos es estable, por lo que los microtúbulos libres pueden persistir en el citoplasma. Más aún, estos microtúbulos pueden ser transportados y organizados por

proteínas motoras, permitiendo a las células organizar a los microtúbulos en otros patrones diferentes de los arreglos radiales que se observan en los fibroblastos.

Morfología y función de estructuras microtubulares especiales

Los microtúbulos participan en una amplia variedad de funciones celulares. Por ejemplo, las células en interfase a menudo contienen cientos de largos microtúbulos que corren a través de todo el citoplasma y conectan un extremo de la célula con otro (*figura 25*). En general, cuando los microtúbulos se despolimerizan, las células pierden su forma y se vuelven redondas (como pelotas). La organización interna de las células también se altera: el aparato de Golgi, presente normalmente como una única estructura localizada cerca del núcleo, se fragmenta en pedazos y se dispersa en todo el citoplasma. El retículo endoplasmático; –normalmente una red que se extiende a través del citoplasma– se colapsa alrededor del núcleo, ya que éste se conecta con la envoltura nuclear. Todos estos cambios se revierten cuando los microtúbulos se vuelven a polimerizar.

Cilios y flagelos

Cada una de estas estructuras está compuesta por un gran paquete de microtúbulos cubiertos por la membrana plasmática. A través de las interacciones entre los microtúbulos dentro del paquete, la estructura se dobla, lo cual les permite que golpeen de atrás hacia adelante, y con ello desplacen el fluido sobre la superficie de la célula. Para una célula estacionaria dentro de un gran grupo de células, como en un epitelio, esto da lugar a que los fluidos y objetos sean movidos sobre la superficie del tejido. En una célula individual o libre, que no forma parte de un organismo pluricelular, la misma célula es propulsada a través del fluido (es decir, nada). Cilios y flagelos se encuentran en un gran número de or-

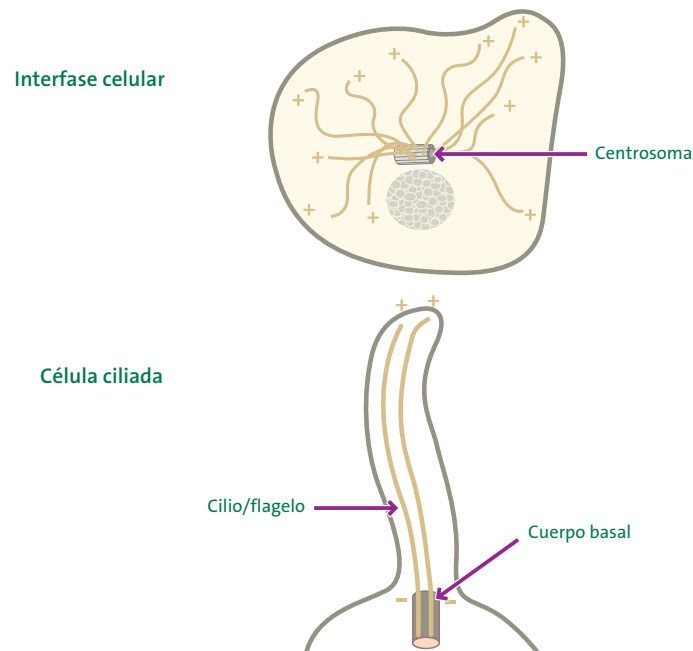


Figura 25. La función de los microtúbulos en células en interfase es la conexión de un extremo de la célula con otro. Los microtúbulos participan en la formación de cilios y flagelos importantes para el desplazamiento de fluidos sobre la superficie de la célula.

ganismos unicelulares, como el *Paramecium* y *Chlamydomonas* (un alga verde) también en el espermatozoide de muchas células eucariontes. En los mamíferos, los cilios cubren el dominio apical de algunos tipos de células epiteliales y baten sincrónicamente, creando ondas de movimiento ciliar que se mueve a través de la superficie del tejido. En la tráquea este movimiento es usado para la limpiar el moco y restos celulares del tracto respiratorio; en el oviducto para el transporte del huevo del ovario al útero; y en el cerebro para que circule el fluido cerebro-espinal (o líquido ceforraquídeo).

Los cilios y los flagelos comparten la misma estructura general y se mueven por un mecanismo similar, sin embargo, difieren en varios aspectos. De manera significativa hay diferencias en el largo, en el número de cada uno por célula y en el patrón de movimiento o batido que generan. Los cilios son cortos (10-15 μm) y a menudo más de 100 por célula. Cada cilio genera fuerza al doblarse cerca de su base. La parte externa del cilio permanece tirante y el doblamiento en la base lo mueve en una forma que recuerda el golpe de un remo en el agua. Esto es seguido por un golpe de recuperación, durante el cual el doblamiento del cilio se propaga de la base a la punta, preparando al cilio para el próximo movimiento de golpeo. Los flagelos son usualmente más grandes (10-200 μm) que los cilios y típicamente sólo existe uno por célula. Los flagelos también generan fuerza por doblamiento; una onda en forma de S es propagada de la base a la punta del flagelo (figura 26).

El patrón de batido tanto de cilios y flagelos comparte un mecanismo fundamental basado en la generación de doblamiento de la estructura. Los flagelos pueden continuar batiendo si son removidos de la célula, demostrando que el movimiento es generado exclusivamente dentro de la estructura. Inclusive pueden seguir moviéndose aún cuando se les retira la membrana plasmática, en presencia de ATP.

El centro de cilios y flagelos es una estructura altamente ordenada compuesta de al menos 250 tipos de polipéptidos diferentes. Esta estructura es llamada *axonema*, compuesta de un paquete de microtúbulos que recorren toda la estructura. Arreglados en la periferia y formando un círculo están nueve “dobletes de microtúbulos”, cada uno compuesto de un microtúbulo convencional de 13 protofilamentos (llamado túbulo A) con un segundo, microtúbulo incompleto de 11 protofilamentos (llamado túbulo B) unido a la pared del primero. En el centro del anillo de do-

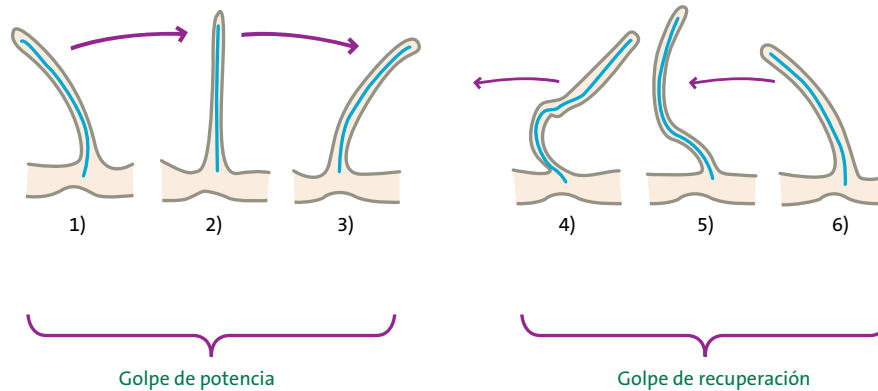


Figura 26. Patrón de movimientos de cilios y flagelos. El mecanismo general se basa en el doblamiento de su base, que genera una fuerza conocida como “golpe de potencia”. Su parte externa permanece tirante hasta el siguiente movimiento llamado golpe de recuperación, durante el cual el doblamiento del cilio se propaga hasta la punta, preparando al cilio para el próximo movimiento de golpeo.

bletes de microtúbulos están dos microtúbulos convencionales con 13 protofilamentos (“el par central”), llamados también *singuletes*. Este arreglo característico de microtúbulos dentro del axonema es descrito como “9+2”. Todos los microtúbulos tienen la misma polaridad, orientados con su extremo más a la punta del flagelo y en extremo menos a su base. Una variedad de proteínas une y estabiliza los microtúbulos (*figura 27*).

Los microtúbulos en el axonema están interconectados a todo lo largo por varios tipos de puentes. Las proteínas que forman estas conexiones son esenciales para la organización de los microtúbulos en una sola unidad coherente, permitiéndoles que se muevan y coordinar su movimiento. Los dobletes de microtúbulos adyacentes están conectados alrededor de la circunferencia del axonema por una proteína llamada *nexina*. Los dobletes de microtúbulos también están conectados al par de

microtúbulos centrales por un complejo de polipéptidos que forman *rayos radiales* con visibles cabezas. Estas últimas están arregladas alrededor de la hoja interna, una estructura que rodea los dos microtúbulos centrales. La fuerza es generada en el axonema por la *dineína* axonemal (también llamada ciliar o flagelar) que conecta los dobletes de microtúbulos adyacentes; el dominio en “cola” une al túbulo A de uno de los dobletes y el dominio de “cabeza” al túbulo B del próximo. Las diferentes conexiones formadas por la nexina, los rayos radiales y las dineínas ocurren a todo lo largo de la longitud del axonema pero con diferente periodicidad.

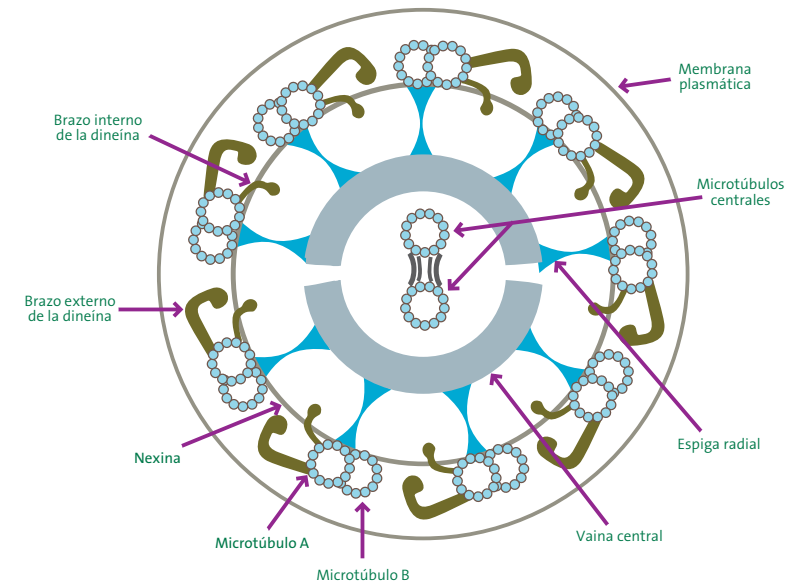


Figura 27. Esquema de la estructura que conforma a los cilios y flagelos llamada axonema. Está compuesta por nueve dobletes de microtúbulos, cada uno compuesto por microtúbulo convencional completo formado por 13 protofilamentos (microtúbulo A) y otro incompleto (microtúbulo B). También posee un doblete central, proteínas de unión y proteínas motoras.



El axonema contiene más de una forma de dineína, éstas son más largas y están compuestas de polipéptidos diferentes a las de las dineínas citoplasmáticas. Las distintas formas constan de uno, dos o tres dominios motores y se observan en varios lugares del axonema. Los dobletes de microtúbulos adyacentes están conectados por dos grupos de moléculas de dineína, llamados brazos internos y externos. En los brazos externos las dineínas tienen dos o tres cabezas, mientras que en los brazos internos éstas presentan una o dos.

En el axonema intacto, la dineína no puede deslizarse sobre los dobletes externos; además, éstos están conectados por los puentes de nexina. En su lugar, la fuerza generada por la dineína es convertida en un movimiento de doblamiento de los microtúbulos.

Los cilios y los flagelos generan un movimiento de bateo propagado por el doblamiento de los microtúbulos en el axonema. El doblamiento se inicia en la base del cilio o del flagelo y se propaga distalmente hacia la punta; éste se produce debido a que en cualquier instante las dineínas pueden estar activadas sólo en una región pequeña del axonema; pero en disposición de propagar el doblamiento, éstas son activadas secuencialmente tanto a lo largo como alrededor de la circunferencia del axonema y, por otra parte, están reguladas por el par central de microtúbulos y los rayos radiales; varias cinasas y fosfatasa se localizan en estas dos últimas estructuras. Se cree que la rotación del par central activa una red de moléculas de transducción de señal local que estimulan a las dineínas cercanas.

En la base de un flagelo está una estructura llamada *cuerpo basal* (o quinetosoma). Los cuerpos basales tienen la misma estructura que los centríolos y sirven para anclar el axonema.

Por otra parte, aunque muchos de los cilios son estructuras móviles, existe una forma relacionada no móvil que desempeña una función muy

diferente. Los cilios primarios son cilios no móviles encontrados en casi todas las células de vertebrados, con excepción de las células de la sangre. A diferencia del caso de los cilios móviles, típicamente las células sólo contienen un cilio primario. El axonema de un cilio primario carece del par central de microtúbulos, y por lo tanto es referido como “9+0”. El segmento externo de los bastoncillos del ojo, como una extensión sensitiva de luz, puede ser un ejemplo extremo de una propiedad que está muy extendida entre los cilios primarios. Justamente se ha empezado a considerar una posible función general para los cilios primarios como dispositivos sensoriales; otros tipos celulares, que poseen cilios primarios más modestos a los de los bastoncillos, de manera específica mantienen varios tipos de receptores localizados en éstos. Posiblemente, la localización de los receptores en los cilios primarios puede convertirlos en una clase de antenas que puedan detectar cambios en el ambiente extracelular y liberar esta información al cuerpo de la célula.

Existen algunas enfermedades raras provocadas por mutaciones que dejan a los cilios y flagelos sin movimiento. Generalmente, los pacientes con estas mutaciones genéticas sufren de infecciones respiratorias frecuentes porque sus cilios no móviles son incapaces de transportar fuera del tracto respiratorio el moco y los agentes patógenos atrapados e irritantes. Los pacientes masculinos son a menudo estériles porque sus espermatozoides no se mueven, además en este tipo de pacientes la asimetría normal derecha-izquierda de los órganos internos está invertida.

También el interior de las extensiones de las neuronas (dendritas y axones) contiene paquetes de microtúbulos orientados en forma paralela, cuya función es acarrear un gran número de vesículas y otro tipo de material en dos direcciones: hacia y desde las sinapsis. A diferencia de otros microtúbulos, éstos son estables, ya que son esenciales para la

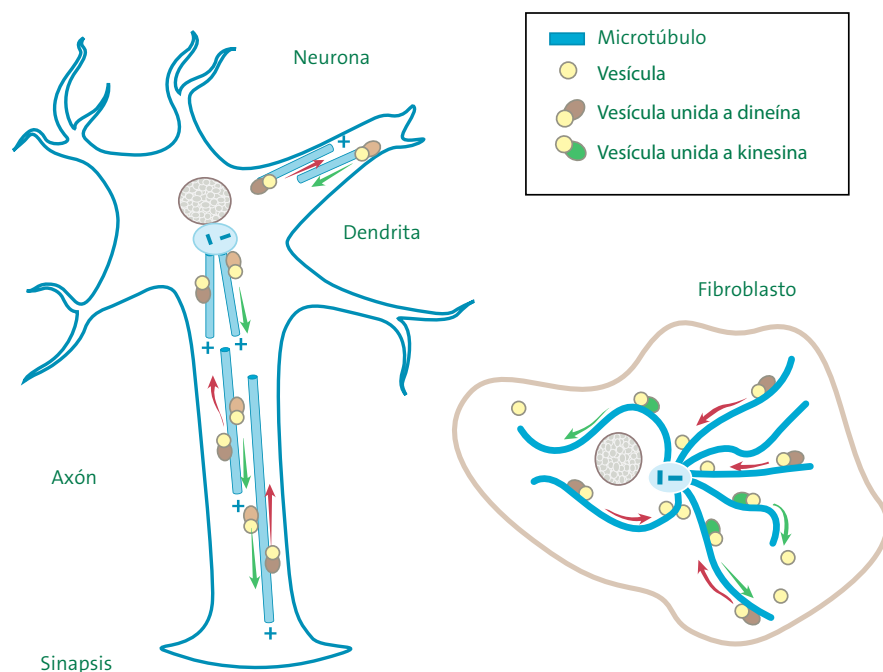


Figura 28. Disposición de paquetes de microtúbulos en extensiones de neuronas (dendritas y axones) y fibroblastos. Los microtúbulos de las neuronas se encuentran orientados en forma paralela, cuya función es el transporte de vesículas y otro material desde y hacia la sinapsis. Al igual que en la neurona, la función de los microtúbulos en el fibroblasto es el transporte de vesículas, diversas moléculas y sustratos, con la diferencia de que la disposición de sus microtúbulos es hacia y desde el centrosoma.

estructura de la célula. Por ejemplo, para la formación de las sinapsis en las neuronas en desarrollo, cada una extiende de su cuerpo proyecciones delgadas que serán las futuras dendritas y axones. En la punta de cada proyección hay una región móvil muy activa llamada cono de crecimiento, que contiene microtúbulos cuya función es muy parecida a la del movimiento celular (figura 28).

Por otra parte, la habilidad de los microtúbulos dinámicos para buscar el interior de una célula se ejemplifica durante la formación del huso mitótico, la cual requiere que los microtúbulos, que se originan de los centrosomas, encuentren los cinetocoros, que son las regiones de los cromosomas donde los microtúbulos se conectan al huso mitótico, y conecten en ellos el extremo más. A escala celular, los cinetocoros son pequeños y el centrosoma se encuentra alejado a una distancia significativa. Es la inestabilidad dinámica de los microtúbulos lo que permite a los centrosomas y cinetocoros conectarse apropiadamente uno con otro. Ello se debe a que los centrosomas nucleas (o polimerizan) microtúbulos en todas direcciones, prácticamente tocan con la punta de un gran número de microtúbulos en crecimiento en todo el volumen citoplasmático, estos microtúbulos se llaman *asteres*. Así, mientras los microtúbulos que no tocan un cinetocoro rápidamente se alejan y liberan las subunidades de tubulina para ensamblarse nuevamente, los escasos microtúbulos que tocan un cinetocoro se estabilizan, estableciendo la conexión entre los polos y los cromosomas. Aunque sólo sea una pequeña fracción de microtúbulos los que encuentren un cinetocoro, su rápido y continuo ensamblaje y desensamblaje, ocasionados por su inestabilidad dinámica, permite que todos los cinetocoros sean localizados y conectados al centrosoma en pocos minutos. Cada cinetocoro es conectado por aproximadamente 40 microtúbulos en un corto periodo. Este mecanismo del huso en formación de “búsqueda y captura” tiene la ventaja de no requerir de una posición precisa entre los centrosomas y los cinetocoros (figura 29).

A menudo las células tienen que polarizar su citoplasma en respuesta a las señales detectadas por la membrana plasmática, como el contacto con otra célula. Si la señal estabiliza los microtúbulos, éstos pueden servir como vías para el transporte de vesículas, lo cual favorecerá el tránsito de las mismas hacia esa región de la célula.

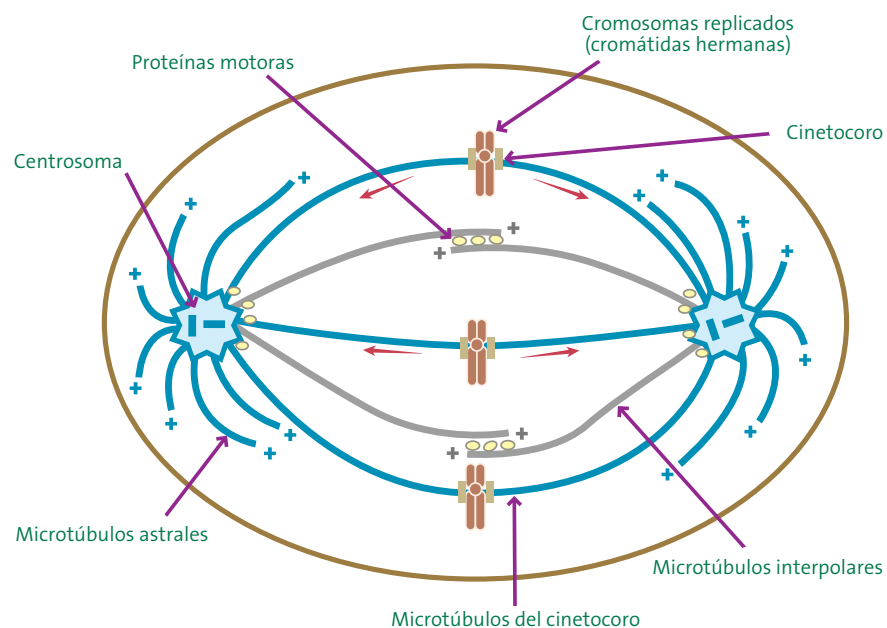


Figura 29. Formación del huso mitótico. Los microtúbulos que constituyen al huso se originan de los centrosomas y algunos se conectan a los cinetocoros de los cromosomas, mientras que otros permanecen inestables ensamblando y desensamblando unidades de tubulina.

Interacción entre microtúbulos y microfilamentos

Muchas funciones celulares dinámicas requieren de la cooperación entre diferentes filamentos del citoesqueleto. Por ejemplo, los microtúbulos trabajan con los filamentos de actina para mover a la célula sobre un sustrato o para dividir a una célula en dos.

En las células que se desplazan sobre una superficie, normalmente los filamentos de actina son muy abundantes en el frente de la célula, donde su polimerización maneja el movimiento. Ahí, los microtúbulos funcionan como directores, determinando en dónde la actina deberá

ensamblarse y en dónde deberá contraerse. De esta forma, la actina es empleada para proporcionar fuerza, mientras que los microtúbulos lo son para organizar o controlar hacia dónde actuarán estas fuerzas. Operando en conjunto, la actina y los microtúbulos generan fuerzas en el lugar y tiempo correctos para las funciones celulares específicas.

La unión física entre actina y microtúbulos puede ocurrir a través de proteínas motoras. En este caso el puente es la dinamina, que permite que un polímero empuje al otro.

Adicionalmente, la unión de los microtúbulos a los filamentos de actina en crecimiento también puede guiarlos a sitios específicos dentro de las células. Por ejemplo, en las células en movimiento algunos microtúbulos crecen hacia los contactos focales, dirigiéndose hacia las adhesiones, en las orillas de la célula, con lo que pueden liberar una señal que cause que alguna adhesión se rompa, liberando con ello selectivamente la parte trasera de la célula del sustrato; es decir, pueden señalar de manera específica las adhesiones en la periferia de la célula para que se desensamblen de forma tal que los microtúbulos participen directamente en el movimiento de ésta.

Si bien la organización de los filamentos de actina en las células es controlada principalmente por un número pequeño de proteínas G, el ensamblaje o desensamblaje de los microtúbulos puede controlar a estas proteínas G, ya sea encendiéndolas o apagándolas.

Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios forman una red tanto en el citoplasma como en el núcleo, y están presentes en casi todas las células de los animales (figura 5c). La función esencial de los filamentos intermedios es participar en la organización de las células de los tejidos, donde son requeridos para



el correcto funcionamiento de éstos y de los órganos. Algunos tipos de filamentos intermedios se adhieren a las células al formar parte de las uniones de anclaje, importantes para la formación de los tejidos.

Una gran familia de genes con varias subfamilias codifica las proteínas de filamentos intermedios. Bajo condiciones fisiológicas normales, estas proteínas forman un sistema complejo de filamentos que pueden representar más de 80% de las proteínas de la célula. Los filamentos intermedios tienen una distribución subcelular que es distinta a la de los filamentos de actina y de los microtúbulos. En muchas células los filamentos intermedios pueden presentar un diámetro intermedio entre los filamentos gruesos de miosina II y los filamentos delgados de actina. Con un diámetro de 10 nm en promedio, éstos son más gruesos que los filamentos de actina (~8 nm) y más delgados que los microtúbulos (~25 nm).

Todas las proteínas de filamentos intermedios comparten una estructura molecular similar y son ensamblados en filamentos que tienen gran fuerza de tensión y una apariencia similar cuando son observados al microscopio electrónico.

Además, las proteínas de filamentos intermedios son expresadas en patrones específicos de diferenciación de tejido. Es decir, la expresión de los genes de filamentos intermedios es altamente tejido-específico, por lo que es muy probable que todas estas proteínas proporcionen propiedades ligeramente diferentes a las células de los tejidos. Los distintos requerimientos de ingeniería en las células de los tejidos —rigidez, plasticidad o velocidad de ensamblaje o desensamblaje de su sistema de reforzamiento— pueden ser la razón de que muchos genes diferentes hayan surgido a través de la evolución para la codificación de este tipo de proteínas.

Tipos de proteínas de filamentos intermedios

Basados en la secuencia de homología del ADN y la de aminoácidos de las proteínas, la familia de proteínas de filamentos intermedios está dividida en seis grupos. Sin embargo, todas las proteínas de filamentos intermedios tienen una estructura similar y siguen los mismos principios de organización, y todas ellas se ensamblan en filamentos de aproximadamente 10 nm de diámetro.

Las proteínas de filamentos intermedios son moléculas largas, con un prolongado dominio α -hélice en forma de vara flanqueado por una cabeza (extremo N-terminal) y una cola (extremo C-terminal) (figura 30). El dominio en forma de vara tiene cuatro segmentos en α -hélice (1A, 1B, 2A y 2B), separados por secciones que las unen (L1, L12 y L2).

En varias proteínas de filamentos intermedios los extremos (cabeza y cola) son mucho más variables que el dominio en vara, tanto en la longitud como en la secuencia de aminoácidos. Además, en muchas de las proteínas de filamentos intermedios los extremos contienen sitios de fosforilación, importantes para su ensamblaje y desensamblaje. El dominio de la cabeza, en todos los tipos de proteínas de filamentos intermedios, es esencial para el ensamblaje.

Los seis grupos de la superfamilia de filamentos intermedios son referidos como tipos I-VI. Las proteínas de tipo I y II son las queratinas, las cuales son expresadas en los epitelios y en el ser humano existen de 54 a 70 genes de donde provienen. El grupo III contiene cuatro proteínas estrechamente relacionadas, cada una de las cuales es tejido-específica: *desmina*, *vimentina*, *proteína ácida fibrilar glial* (GAFAP) y *periferina*. El grupo IV contiene siete proteínas relacionadas con los neurofilamentos, y el tipo V, las relacionadas con las láminas nucleares (evolutivamente el grupo más viejo de genes de filamentos intermedios). En las proteínas del

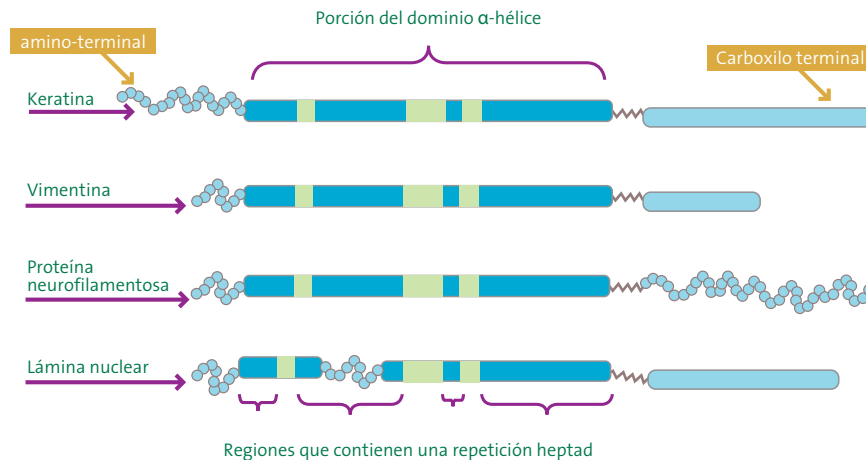


Figura 30. Se esquematizan algunas proteínas que forman los filamentos intermedios. Se identifican seis grupos que, aunque tienen una estructura similar, todos ellos siguen el mismo principio de organización. Poseen un dominio α -hélice, un extremo N-terminal (cabeza) y un extremo C-terminal (cola).

grupo VI se incluyen dos proteínas filamentosas divergentes presentes en el cristalino de los ojos.

Adicionalmente, algunas proteínas de filamentos intermedios son expresadas durante el proceso de inflamación o por daño celular. Los filamentos intermedios son probablemente los mejores marcadores disponibles de la diferenciación celular y de los tejidos.

Tipos de queratinas

Existen 28 tipos de *queratinas* I y 26 tipos de queratinas II. Las queratinas, llamadas algunas veces *citoqueratinas*, en los tejidos epiteliales son coexpresadas (o expresadas al mismo tiempo) como pares tipo I/tipo II. Cada tipo de queratina I es coexpresada con una compañera específica de queratina tipo II y cada par de queratinas es característico e indicativo de diferen-

ciación y especialización de un tipo particular de célula epitelial. Además, en las células epiteliales la expresión específica de las proteínas de filamentos intermedios depende de su localización y de su estado fisiológico.

El grupo de queratinas estructurales consta de un gran número de proteínas de filamentos intermedios expresadas solamente en o alrededor de estructuras especializadas fuertes y apéndices como el pelo y las uñas. Por ejemplo, son las células del pelo o tricocitos los que pueden formar estas estructuras, también como las queratinas especializadas hechas por estas mismas células epiteliales.

Filamentos intermedios de tejido nervioso, muscular y conjuntivo

Las proteínas tipo III son la desmina, vimentina, proteína ácida fibrilar glial (GAFAP) y periferina, las cuales son expresadas diferencialmente en las células del tejido conjuntivo, células musculares, células nerviosas y algunas otras células diferenciadas.

La desmina es esencial para la función de las células musculares de todos los tipos (estriado, cardíaco y liso); como las queratinas en los epitelios, las desminas proporcionan resistencia física indispensable en las células de los tejidos. Los filamentos de desmina corren entre puntos de anclaje de los aparatos de contracción (por ejemplo, de los sarcómeros en el músculo estriado), que son el foco principal de estrés mecánico en las células musculares.

La expresión de vimentina es típica en las células que funcionan como células solitarias o en grupos celulares laxamente asociados u hojas celulares. Durante el desarrollo, la vimentina es expresada después de las queratinas, y persiste en el tejido conectivo y mesenquimatoso del adulto, desde fibroblastos hasta células hematopoyéticas y células epiteliales de la pared de los vasos sanguíneos.



En el sistema nervioso los astrocitos y células de la glía son células no neuronales requeridas para el crecimiento, diferenciación y regeneración de las neuronas. Todas las células de la astroglia expresan GAFAP, la cual solamente es expresada en conjunto, ya sea de la vimentina o la proteína *nestina tipo IV*. Esta coexpresión protege a las células de las consecuencias fatales de mutaciones o escisiones de algunos de los genes.

Por otra parte, la periferina es expresada predominantemente en el sistema nervioso periférico. Durante el crecimiento axonal, éstos inicialmente expresan periferina y vimentina, las cuales son superexpresadas a través del triplete de proteínas de neurofilamentos (NF-L, NF-M y NF-H). Sin embargo, la periferina también se expresa rápidamente cuando hay un daño en los nervios.

Laminas nucleares

Las *laminas* son proteínas intranucleares que forman una red estable de filamentos a lo largo de la superficie interna de la membrana nuclear (*figura 31*), donde interactúa con un grupo de proteínas especializadas, incluyendo proteínas asociadas a las laminas y el receptor de la lamina B, para con esto ensamblar y mantener el funcionamiento de ambiente nuclear. Existen tres genes de laminas (LMN) en mamíferos (LMNA, LMNB1 y LMNB2) que codifican seis proteínas: el gen LMNA da origen a las laminas A, C1 y C2 (colectivamente llamadas laminas tipo A), LMNB1 codifica las laminas B1, B2 y B3. Las laminas tipo B son expresadas en todos los tipos celulares iniciando desde el embrión temprano, mientras que las laminas tipo A se restringen a los tipos celulares más diferenciados. Las laminas C2 y B3, y sus contrapartes en otros vertebrados, se restringen a las células germinales.

Proteínas de filamentos intermedios del cristalino

Las células del cristalino contienen dos proteínas de filamentos intermedios poco frecuentes que se coensamblan en forma de perlas cuando son

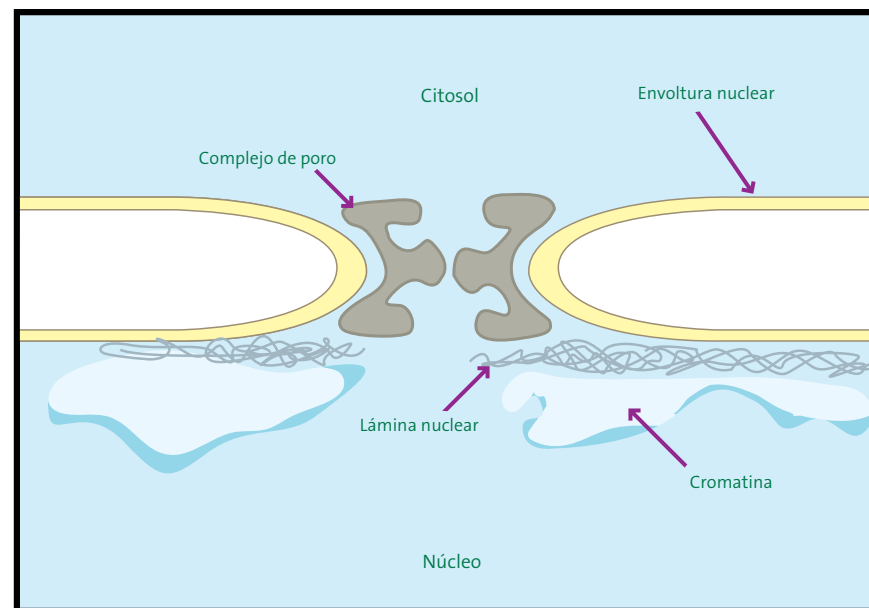


Figura 31. Ubicación de la lámina nuclear compuesta por filamentos intermedios específicamente las lamininas, que interactúan con un grupo de proteínas especializadas.

vistos al microscopio electrónico. Estas proteínas son *CP49* o *pakinina* y *filensina*, las cuales son categorizadas como proteína tipo IV. Las proteínas del cristalino requieren propiedades inusuales por varias razones: primera, éstas deberán permitir que el cristalino del ojo se desarrolle con una gran claridad óptica. Además, ya que las células del cristalino tienen una larga vida, estas estructuras poliméricas deben poseer una excepcional estabilidad bioquímica para evitar la degradación proteolítica y los cambios acompañantes con el tiempo de la conformación de las proteínas, que pudieran conducir a cambios en las propiedades físicas u ópticas del cristalino y perder la función.



Ensamblaje de las proteínas de filamentos intermedios

El primer estadio de ensamblaje de los filamentos intermedios es la formación de un dímero mediante la interacción de las α -hélice del dominio en vara que posee cada uno de sus monómeros. Para ser estable en el citoplasma, el dominio en vara debe formar una estructura cola-cola con la α -hélice de otra proteína de filamentos intermedios, ya que esto ayuda a que las regiones hidrófobas queden secuestradas entre las dos hélices; a menudo este arreglo es referido como *zíper de leucina*. El dímero cola-cola de 45 nm de largo es el bloque de construcción de los filamentos intermedios de 10 nm de ancho (*figura 32*).

Los filamentos intermedios son polímeros de varias hebras sin polaridad en los extremos. Para formarlos, los dímeros rápidamente forman tetrameros antiparalelos (cabeza con cola y viceversa) escalonados a la mitad; los tetrameros podrían ser considerados las unidades estables más pequeñas de este tipo de filamentos. En contraste, los filamentos de las lamina nucleares se ensamblan como dímeros antiparalelos extremo-extremo formando hebras, en las cuales los dímeros no se asocian lateralmente en tetrameros, como las proteínas del citoplasma.

A diferencia de la situación de los microtúbulos, en los filamentos intermedios no existen evidencias de algún centro organizador que de manera preferente dispare su ensamblaje en las células.

El análisis biofísico de los filamentos intermedios ha mostrado que éstos son mucho más resistentes al estiramiento que los microtúbulos o los filamentos de actina. Por otra parte, la medición del estiramiento de los filamentos intermedios de queratina ha mostrado su alta fuerza de tensión, gran capacidad de elasticidad y su deformación plástica irreversible de los filamentos en extensión. En contraste con los microtúbulos y filamentos de actina, los filamentos intermedios muestran una resistencia

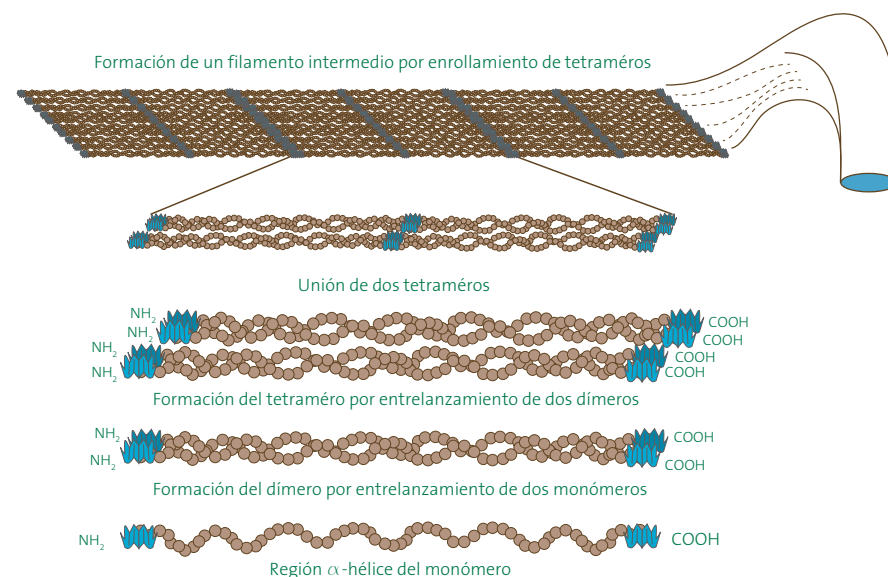


Figura 32. Ensamblaje de las proteínas de filamentos intermedios.

Modificado de Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts, WP. The cytoskeleton: The molecular biology of the cell. 5° ed. Nueva York (EE.UU.) Garland Science, 2008: 965-1052.

incrementada a la deformación conforme más tensión es aplicada (una propiedad llamada resistencia a la tensión) (*figura 33*).

Bibliografía

- Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts, WP. The cytoskeleton: The molecular biology of the cell. 5° ed. Nueva York (EE.UU.) Garland Science, 2008: 965-1052.
- DePianto D, Coulombe PA. Intermediate filaments and tissue repair. Exp Cell Res 2004; 301(1): 68-76.
- Lewin B, Cassimeris L, Lingappa VR, Plopper G. The cytoskeleton: Cells. Ontario (Canadá). Jones and Bartlett, 2007: 316-437.

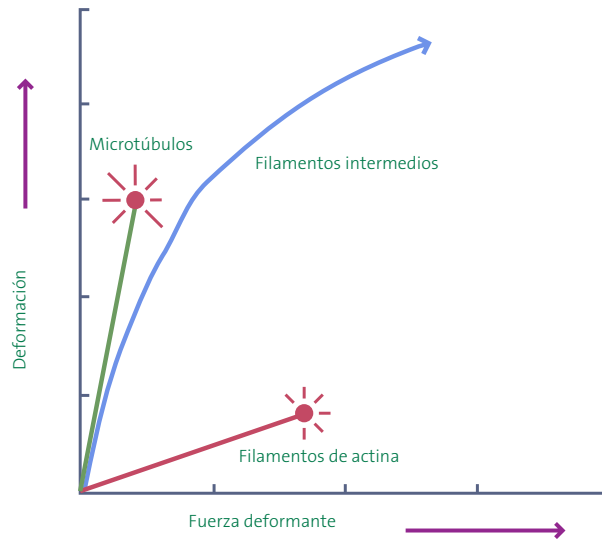


Figura 33. Propiedades mecánicas de los microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina. En esta gráfica se muestra como los microtúbulos son más sensibles a la deformación que a la ruptura, mientras los filamentos de actina se deforman menos pero son más débiles. Los filamentos intermedios muestran una resistencia incrementada a la deformación (resistencia de tensión). Modificado de Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts, WP. The cytoskeleton: The molecular biology of the cell. 5° ed. Nueva York (EE.UU.). Garland Science, 2008: 965-1052.

- Paavilainen VO, Bertling E, Flack S, Lappalainen P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. Trends in Cell Biol 2004; 14(7): 386-394.
- Wear MA, Coper JA. Capping proteins: new insight into mechanism and regulation. Trends in Biochem. Science 2004; 29(8): 418-428.
- Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. Regulation of microtubules in cell migration. Trends in Cell Biol 2005; 15(2); 76-83.
- Wittmann T, Desai A. Microtubule cytoskeleton: a new twist at the end. Current Biol 2005; 15(4):126-129.

5



Matriz extracelular



Capítulo 5

Matriz extracelular

Santiago René Anzaldúa Arce
Olivia Rodríguez Morales

Objetivos temáticos

- Composición y diversidad estructural.
- Interacción célula-matriz extracelular.

Introducción

Las células en los tejidos conectivos están embebidas en una matriz extracelular (MEC) que no sólo sirve para enlazar célula con célula, sino que también influye en su sobrevivencia, desarrollo, forma, polaridad y conducta.

La MEC está constituida por un complejo de polisacáridos y proteínas de naturaleza muy diversa que ocupan el *espacio intercelular* o *extracelular*; los componentes moleculares son secretados y organizados por las células adyacentes. La MEC es particularmente preponderante en el tejido conjuntivo, uno de los cuatro tejidos básicos del organismo, que se caracteriza porque las células que la constituyen se encuentran separadas entre sí por abundante espacio extracelular.

Desde el punto de vista estructural, el tejido conjuntivo tiene tres componentes: *células*, *fibras* y *sustancia fundamental amorfa*; las dos últimas constituyen la MEC (*figura 1*). Las fibras más relevantes se clasifican en

tres grupos: fibras colágenas, fibras reticulares (que son una variedad de fibras colágenas con características tintoriales especiales) y fibras elásticas. Dentro de los componentes de la sustancia fundamental se encuentran los *proteoglucanos* y los *glucosaminoglucanos* (un grupo de polisacáridos); un conjunto de glucoproteínas adhesivas, entre las que destacan la fibronectina, la laminina y la vitronectina, y finalmente, *proteínas mediadoras de adhesión celular*. Un componente fundamental de la MEC es el

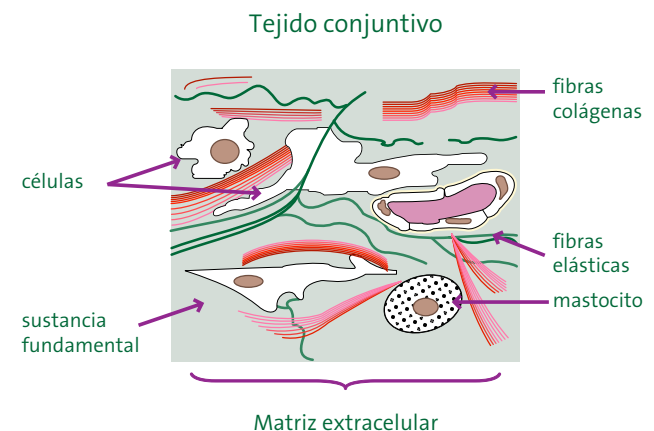


Figura 1. Componentes estructurales de la matriz extracelular (MEC).



agua, el cual queda incluido entre los componentes de la sustancia fundamental; una de las funciones más importantes de esta estructura es conservar el agua presente en los tejidos, llamada en conjunto líquido tisular. Los componentes de la matriz, principalmente las glucoproteínas, tienen propiedades de fijar o adsorber con firmeza las moléculas de agua, evitando con ello la deshidratación.

Junto con la matriz extracelular se estudiarán las membranas basales, que son estructuras que delimitan y unen el tejido epitelial al tejido conjuntivo; hablaremos también de su importancia y funciones.

La unión de la MEC a la célula requiere de proteínas mediadoras de la adhesión celular transmembranales que actúan como receptores de la matriz, a la cual enlazan con el citoesqueleto de la célula. En este capítulo estudiaremos también los principales receptores sobre las células animales para la unión de la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular, que incluyen a las colágenas, las *fibronectinas* y las *lamininas*, así como a las *integrinas*, las *cadherinas*, los *distroglicanos*, entre otros.

Composición y diversidad estructural

La MEC está formada por un complejo de moléculas de naturaleza muy heterogénea que son secretadas, mantenidas y reguladas por las células adyacentes.

Los diversos componentes de la MEC se pueden clasificar en tres grandes grupos: 1) *glucosaminoglucanos* y *proteoglucanos*; 2) *proteínas estructurales* o *fibrilares* (como las fibras de colágena y elastina); 3) *proteínas de adhesión* (como la fibronectina y la laminina), y 4) *moléculas mediadoras de la adhesión celular*.

Las principales características de la MEC son:

- Los componentes moleculares ocupan los espacios existentes entre las células, es decir, el espacio intercelular o extracelular.
- Los componentes moleculares se encuentran altamente organizados estructural y funcionalmente; sin embargo, no tienen una forma definida al ocupar los espacios existentes entre las células, por lo que en conjunto es una estructura amorfa que interconecta a las células y, a su vez, las células determinan la composición y rearrreglo de los elementos estructurales de la MEC.
- Es particularmente abundante en el tejido conjuntivo. La composición y las propiedades dependerán de las funciones específicas del tejido conjuntivo del que se trate, como por ejemplo la matriz ósea, la cartilaginosa, la dermis de la piel.
- Es el producto local producido y mantenido de manera específica por las células locales y las que son ensambladas y reguladas fuera de ellas; esto conlleva diversos mecanismos determinados por la función del tejido y las necesidades fisiológicas del organismo, y también implica el establecimiento de múltiples señales intercelulares y diversos mecanismos de interacción entre las células y la MEC.
- Formando parte de la MEC se encuentran las membranas basales, que delimitan a las células con la MEC; estas estructuras son características del tejido epitelial, pero también rodean las células musculares, o bien, están en el tejido nervioso y en células del tejido conjuntivo, como los adipocitos.

Glucosaminoglucanos

Los glucosaminoglucanos (GAG) son una variedad de cadenas de *heteropolisacáridos* ("heteros" = diferente) no ramificados, constituidos por más



de un tipo de monosacárido, que en general son derivados (se forman por la sustitución, adición o modificación de uno o más de los grupos funcionales de los monosacáridos simples). Estos monosacáridos se organizan en unidades disacáridas formadas por un *ácido urónico* y una *hexosamina*. Los ácidos urónicos pueden ser el ácido glucurónico, o bien, el ácido idurónico, mientras que las hexosaminas pueden ser la N-acetilglucosamina o la N-acetilgalactosamina.

Las unidades disacáridas se repiten entre 80 y 200 veces para formar una molécula de GAG.

La mayor parte de los GAG tiene hexosaminas sulfatadas. Estos sulfatos, así como los grupos carboxilos que los acompañan, son compuestos aniónicos, ya que tienen cargas negativas que se encuentran expuestas en las moléculas, por lo que atraen con facilidad diversos cationes, como el sodio (Na^+), los cuales se rodean de moléculas de agua. El agua contribuye a dar a la MEC gran resistencia a la compresión. La única molécula de GAG no sulfatada es el *ácido hialurónico* o *hialuronano*. Las GAG son moléculas alargadas que ocupan un gran volumen y están altamente hidratadas, por lo que oponen una fuerte resistencia a la compresión y dan soporte mecánico a los tejidos. Estas moléculas llenan la mayor parte del espacio extracelular.

Las cadenas de glucosaminoglucanos se unen covalentemente a una proteína central, o eje, y así constituyen una macromolécula de *proteoglucano*; el conjunto de estas moléculas adquiere la apariencia de un cepillo (como los que se emplean para limpiar biberones). Tanto el ácido hialurónico como la heparina no se unen en forma covalente a las proteínas (*figura 2*).

Existen seis tipos principales de GAG, en su mayoría sulfatados; éstos son:

- *condroitín 4 sulfato* y *condroitín 6 sulfato*
- *heparán sulfato*
- *heparina*
- *dermatán sulfato*
- *queratán sulfato*
- *ácido hialurónico* (único GAG que no se une a proteínas)

Los heteropolisacáridos se distinguen entre sí por la composición de sus unidades disacáridas, el enlace glucosídico y la localización y cantidad de los sulfatos, o bien, su ausencia.

Las principales características bioquímicas y su localización en el organismo se resumen en el *cuadro 1*.

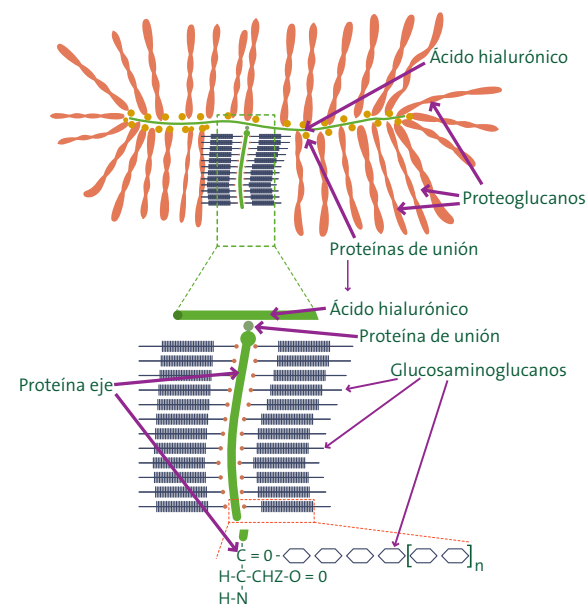


Figura 2. Disposición de proteoglucanos, glucosaminoglucanos y ácido hialurónico.



Cuadro 1

Composición bioquímica y localización de los diferentes tipos de glucosaminoglucanos

Glucosaminoglucano	Unidad disacárida repetida		Enlace	Localización
	Hexosamina	Ac. urónico*		
Condroitín 4 sulfato	N-acetilgalactosamina	Glucuronato	β 1,3 y β 1,4	Cartílago, hueso, córnea y vasos sanguíneos.
Condroitín 6 sulfato	N-acetilgalactosamina	Glucuronato	β 1,3 y β 1,4	Cartílago, cordón umbilical (gelatina de Wharton) y vasos sanguíneos.
Dermatán sulfato	N-acetilgalactosamina	Iduronato (+++)	α 1,3	Piel, vasos sanguíneos y válvulas cardíacas.
		Glucuronato		
Queratán sulfato	N-acetilglucosamina	Galactosa**	β 1,3 y β 1,4	Disco intervertebral, cartílago y córnea.
Heparán sulfato	N-acetilgalactosamina	Glucuronato (+++) o iduronato	α/β 1,4 y α 1,4	Lámina basal, pulmón y cartílago.
Heparina	N-acetilglucosamina	Iduronato (90%)	α/β 1,4 y α 1,4	Gránulos de células cebadas.
		Glucuronato (10%)		Pulmón, piel e hígado.
Ácido Hialurónico***	N-acetilglucosamina	Glucuronato	β 1,3 y β 1,4.	Tejido conjuntivo en general, abundante en dermis, líquido sinovial y cartílago.

* Se encuentran en forma ionizada en el pH de los tejidos.

** No es un ácido urónico, es una hexosa.

*** Único GAG no sulfatado.

El *condroitín sulfato* es el más abundante de los GAG; es un componente fundamental del cartílago, de ahí su nombre (*condros* = cartílago), aunque también se encuentra en otros tejidos.

El *queratán sulfato* puede ser identificado en la córnea, tejido óseo y cartilaginoso.

El *heparán sulfato* y la *heparina* cumplen funciones antitrombóticas o anticoagulantes, ya que la heparina es un secuestrador o quelante de

calcio, el cual es muy importante en la coagulación sanguínea. La heparina fue descubierta en el hígado (*hepatos* = hígado); se encuentra en los gránulos intracitoplasmáticos de las células cebadas o mastocitos y basófilos, por lo que es un GAG intracelular. En estas células la heparina participa de manera determinante en las reacciones alérgicas. Se encuentra principalmente en el hígado, en el pulmón y en las paredes de las arterias, ya que es común observar células cebadas en su proximidad. Cuando existe



de manera anormal una respuesta alérgica desmedida, conocida como choque anafiláctico, se afectan de manera preferencial algunos órganos. En la mayor parte de las especies domésticas el órgano de choque es el pulmón; sin embargo, en los perros es el hígado; esto es relevante porque las manifestaciones clínicas en cada una de estas especies varía. En condiciones normales, la heparina cumple funciones anticoagulantes. La proteína de los proteoglucanos de heparina es única en su tipo, pues está formada exclusivamente por residuos de glicina y serina. Las unidades disacáridas que la forman son: la glucosamina y el glucuronato (forma ionizada del ácido glucurónico), o bien, el iduronato (forma ionizada del ácido idurónico), unidos por enlaces α , en lugar de β como otros GAG.

La longitud del dermatán es el doble de la del condroitín sulfato. Éste es un GAG muy importante en la dermis de la piel.

El ácido hialurónico o hialuronano, de acuerdo con la nueva terminología, es una macromolécula que puede tener hasta 25 000 unidades disacáridas que no se unen covalentemente a ninguna proteína eje; más bien, debido a la longitud de la molécula de ácido hialurónico, las proteínas de los proteoglucanos se unen a éste mediante las proteínas de enlace con las hexosaminas del hialuronano. Su nombre se deriva del griego *hyalos*, que significa vidrio, pues se identificó por primera vez en el humor vítreo del ojo. La palabra “hialino” es un término histológico que se refiere a que la estructura que la constituye es hialina o translúcida, pues en los sitios donde existe en abundancia, que es el tejido conjuntivo laxo areolar, no puede observarse al microscopio fotónico, y el sitio que ocupan estas moléculas dan la apariencia de espacios vacíos; por esta razón, también se le conoce como *cemento intercelular*. Se encuentra en elevadas concentraciones en el líquido sinovial de las articulaciones, donde cumple funciones de lubricación y amortiguamiento físico; además, en el humor vítreo

del ojo y, como ya se ha mencionado, en el tejido conjuntivo laxo areolar, que es sumamente abundante en el organismo. El hialuronano participa en la homeostasis y biomecánica de los tejidos conjuntivos; asimismo, en la señalización intercelular para la migración y proliferación celular. También contribuye a la integridad estructural de la matriz extracelular. Después de que es sintetizado por la célula en la membrana plasmática, sufre un proceso de elongación por la enzima *hialuronato sintetasa* (Has). Una vez que es secretado e hidratado ocupa un gran volumen, por lo que en el organismo se utiliza para promover cambios de forma durante el desarrollo embrionario o para generar espacios a través de los cuales las células del corazón, de la córnea y de otros órganos puedan migrar.

El ácido hialurónico puede ser degradado por la *hialuronidasa*; esta enzima es secretada por algunas células del organismo, como es el caso del espermatozoide durante el proceso de la fecundación, a lo que se ha llamado “reacción acrosomal”; también es producida por microorganismos patógenos que infectan el organismo, como la bacteria *Staphylococcus aureus*, caso que se conoce como *factor de difusión*, ya que la hialuronidasa permite la penetración rápida de la bacteria dentro del organismo y constituye un factor de virulencia para este patógeno.

Los niveles elevados de hialuronano se relacionan con diversos tipos de cáncer humano posiblemente porque promueve los procesos de diferenciación, proliferación, migración celular, angiogénesis e invasión. Se sabe que la Has induce el crecimiento de diversos sarcomas y el cáncer de próstata; y por el contrario, si se alteran las interacciones endógenas del hialuronano, se inhibe la metástasis (crecimiento e invasión celular de varios tipos de tumores *in vivo*).

La mayor parte de los GAG son sintetizados dentro de la célula y después son secretados por exocitosis, pero el hialuronano se elabora en la



superficie celular gracias a un complejo enzimático situado en la membrana plasmática.

Proteoglucanos

Son macromoléculas abundantes en la MEC de los tejidos animales, o bien, en la superficie celular. Los proteoglucanos están formados por los GAG unidos covalentemente a las proteínas *eje*, o centros proteínicos; tienen pesos moleculares que van desde los 50 kDa hasta los tres millones de unidades Dalton.

Es importante hacer la distinción entre las glucoproteínas y los proteoglucanos. Las primeras contienen entre 1 y 60% de carbohidratos ramificados, mientras que los segundos contienen hasta 95% de cadenas lineales de los GAG unidos covalentemente a la proteína central.

Los centros proteínicos se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y los GAG se unen covalentemente a través de un tetrasacárido de unión, formado por: ácido glucurónico, dos moléculas de galactosa y una molécula de *xilosa*; este tetrasacárido se une a residuos de serina o asparagina de la proteína *eje* en el aparato de Golgi, donde además de la sulfatación (por sulfotransferasas) ocurre la epimerización, y en el cual se pueden convertir las moléculas de glucuronato en iduronato.

Los proteoglucanos son moléculas muy heterogéneas, ya que la secuencia de los aminoácidos de la proteína central, la variedad y número de los GAG y los patrones de sulfatación de éstos puede variar enormemente de una molécula a otra.

Las principales funciones de los proteoglucanos en el organismo son: actuar como geles porosos selectivos que permitan filtrar y regular la migración de moléculas; actuar como componentes estructurales de la membrana basal (en particular el proteoglucano llamado perlecano) y del cartílago; participar en las interacciones célula-célula; actuar como recep-

tores en la transducción de señales y, finalmente, unir y regular la actividad de diversas enzimas proteolíticas y de sus inhibidores. Los proteoglucanos ocupan un gran volumen, por lo que oponen gran resistencia a la compresión y dificultan o retrasan el movimiento de microorganismos, o de células metastásicas que, en este último caso, producen metaloproteinasas que degradan la MEC y pueden distribuirse a través de los vasos linfáticos o sanguíneos con mayor facilidad.

Los proteoglucanos son secretados por diversos tipos celulares, entre ellos, las células epiteliales; éstos presentan diversas funciones reguladoras sobre las enzimas proteolíticas a las que se unen. Entre éstas funciones se encuentran: limitar el campo de acción de la enzima al inmovilizarla; generar un almacén de enzimas que pueden ser liberadas posteriormente; bloquear estéricamente la acción de las enzimas; proteger a las enzimas de la acción degradativa de otras enzimas reguladoras, con lo que se prolonga la acción bioquímica de estas moléculas y, por último, concentrar las enzimas para una exposición más adecuada a los receptores de superficie respectivos.

Existen seis clases principales de proteoglucanos (*figura 3*):

- *agrecano*
- *perlecano*
- *decorina*
- *glipicanos*
- *sindecano*
- *betaglucano*

Las cuatro primeras son proteoglucanos secretados y presentes en la MEC, mientras que las dos últimas son proteoglucanos y están unidas a la membrana plasmática y adosadas a la superficie celular.

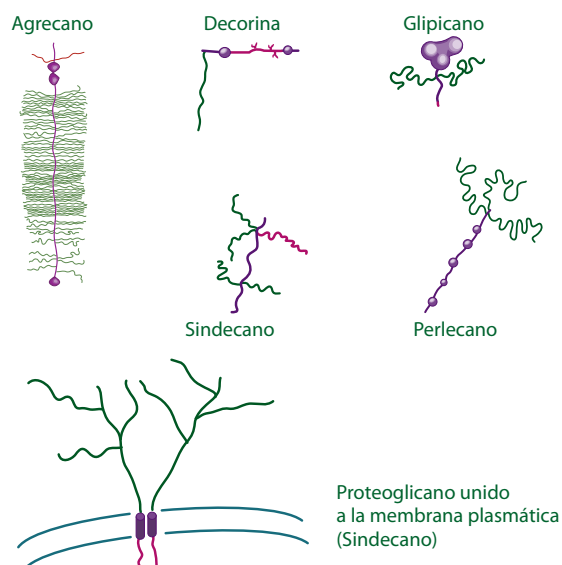


Figura 3. Diversos tipos de proteoglucanos.

Las neuronas y las células gliales (células que, entre otras funciones, participan en la nutrición y protección de las neuronas) secretan proteoglucanos como la agrina, la cual, junto con otros componentes de la MEC, regula la diferenciación, maduración y plasticidad de las uniones sinápticas.

El *agrecano* es el principal componente del cartílago, forma grandes agregados con el hialuronano y participa en el soporte mecánico de la matriz cartilaginosa. Esta matriz tiene la propiedad de permitir la difusión de nutrientes hacia las células, por lo que no requiere de un sistema de conductos, como en el caso de la matriz ósea.

La *decorina* es un proteoglucano secretado por los fibroblastos, que se caracteriza por tener una sola cadena de GAG. Se encuentra en el tejido cartilaginoso, en los tendones y en la piel. Parece tener un papel

relevante en los procesos de fibrillogénesis de colágena, así como en el mantenimiento de la integridad, a nivel molecular, de los tendones y de la dermis. Puede unirse a fibras colágenas tipo I y al factor del crecimiento transformante- β (TGF- β).

El tejido cartilaginoso contiene diversos proteoglucanos, entre los que se encuentran no sólo el *agrecano* y la *decorina*, sino también el *biglicano*, la *fibromodulina* y el *lumicano*.

Existen algunos otros proteoglucanos relevantes para la medicina, como son los *glipicanos*, que actúan durante el desarrollo embrionario, regulando diversos mecanismos de señalización y formación de gradientes de morfógenos y factores de crecimiento; una deficiencia en la expresión de los *glipicanos* causa retardo o defectos del crecimiento, o bien, sobrecrecimiento; así, en las células cancerosas que presentan alteraciones en la expresión de estas moléculas, los *glipicanos* parecen ser esenciales para el desarrollo del tumor, por lo que pueden utilizarse como marcadores de tumores y deben ser considerados como moléculas blanco en la inmunoterapia.

Los *sindecanos* son proteoglucanos de la superficie de células adherentes que se unen a moléculas de adhesión celular, como la *fibronectina* o la *laminina*, por lo que sirven para fijar las células a la MEC. Estos proteoglucanos tienen un dominio extracelular al que se unen los GAG, los cuales son generalmente de diferente naturaleza. Los *sindecanos* sequestran y exponen o presentan diversos factores de crecimiento (como el factor de crecimiento de fibroblastos o FGF) y en general a moléculas de señalización intercelular con sus receptores, por lo que actúan como correceptores; además, presentan un dominio intracelular que puede interactuar con los microfilamentos de actina, o bien, con moléculas intracelulares con funciones reguladoras. Los *sindecanos* participan en la regeneración tisular y la diferenciación celular.



En el hipotálamo los sindecanos participan en la regulación del comportamiento alimentario de los animales; así, después del consumo de alimentos, los sindecanos y en particular la cadenas de heparán sulfato del dominio extracelular sufren proteólisis, separándose de la proteína eje; estos GAG impiden que ciertos péptidos llamados *péptidos antisecreción* se unan a sus receptores respectivos en la superficie de la membrana, con lo que se evita la actividad de estos péptidos. Los sindecanos modulan el comportamiento alimentario de los animales en respuesta al ayuno.

Los *betaglicanos* se ubican en la MEC y en la superficie celular, son proteoglucanos que presentan una gran afinidad por el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), es decir, actúa como un *coreceptor* y participa en los mecanismos de transducción de la señalización de esta molécula, por lo que puede ser utilizada para antagonizar la actividad del TGF- β en los tumores. El tratamiento con betaglicano puede suprimir el crecimiento y la metástasis tumoral.

El *perlecano* es el principal proteoglucano de la lámina basal, de la cual se hablará más adelante.

Un ejemplo relevante de correlaciones clínicas con respecto a la participación de los proteoglucanos es la respuesta inflamatoria, en la que los proteoglucanos mantienen adheridos a la superficie de los vasos sanguíneos un conjunto de compuestos llamado *quimioquinas* (o *quimioquinas*), las cuales actúan como factores quimiotácticos que atraen leucocitos hacia las regiones inflamadas.

Se debe mantener un constante equilibrio entre la síntesis, el desgaste y la remodelación de los componentes de la MEC; esto se regula mediante moléculas que estimulan su producción, como son los factores de crecimiento o las moléculas que favorecen su degradación; por

ejemplo, las *metaloproteinasas*, que son endopeptidasas dependientes de zinc, y las *serinoproteasas*, que tienen en su sitio activo al aminoácido serina. Los sustratos principales para los dos grupos de enzimas son: las *colágenas*, la *fibronectina* y la *laminina*.

La actividad proteolítica de estas enzimas favorece la migración celular al destruir la MEC de las células, con lo que pueden desengancharse y facilitar su progresión; asimismo, tienen la capacidad de descubrir regiones de las proteínas degradadas que faciliten la adhesión celular, o bien, crear un camino a través del cual se abran paso; también liberan señales extracelulares que estimulan la migración celular.

En el caso del cáncer, debido al crecimiento de la masa tumoral y el proceso de invasión de los tejidos (metástasis), las células cancerosas producen *metaloproteinasas* que favorecen la degradación de la MEC y facilitan la migración celular; para evitar lo anterior se han ideado diversas estrategias antineoplásicas, como el bloqueo de la síntesis de las *metaloproteinasas* a nivel de la transcripción, el bloqueo de la activación de los zimógenos, o bien, la inhibición de la acción enzimática de las enzimas activas.

La actividad de estas enzimas está regulada por tres mecanismos: la activación local, la presencia de receptores de superficie y la secreción de moléculas inhibitoras.

Las enzimas pueden secretarse localmente o estar asociadas a la membrana plasmática; en estos casos son secretadas como *zimógenos* (formas inactivas de las enzimas), que generalmente se activan mediante un corte proteolítico de un segmento de la molécula. La activación puede llevarse a cabo por otras proteasas o por otras metaloproteinasas.

Finalmente, la secreción de moléculas inhibitoras como las *serpinas* (que inhiben a las serinoproteasas) y los *inhibidores tisulares de proteasas* posiblemente sean secretados por células periféricas al área degradada,



para limitar el proceso degradativo, o bien, para proteger las proteínas de superficie celular, implicadas en los procesos de migración o adhesión.

Los receptores de superficie pueden ubicarse en regiones específicas de la célula –por ejemplo, en el extremo celular–, para permitir el crecimiento del axón en las neuronas; también pueden tener una participación importante en la metástasis de las células cancerosas.

Cuando existen defectos hereditarios en estos mecanismos degradativos se presentan las llamadas *mucopolisacaridosis* (ya que a los glucosaminoglucanos también se les conoce como mucopolisacáridos).

Proteínas fibrosas de la MEC

Colágenas

Las colágenas son una familia de proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales multicelulares. Son secretadas por células del tejido conectivo, así como por una variedad de otros tipos celulares. Debido a que forman parte del principal componente de la piel y los huesos, son las proteínas más abundantes en los mamíferos, pues constituyen 25% del total de su masa proteínica.

La particularidad primaria de una molécula típica de colágena es su longitud, su rigidez, su estructura trihelicoidal en la que tres cadenas polipeptídicas de colágena, llamadas *cadena α* se enrollan una con otra en una superhélice (o triple hélice) que da la apariencia de una cuerda. Las colágenas son extremadamente ricas en residuos de prolina y glicina. Ambos aminoácidos son importantes en la formación de la triple hélice: la prolina, debido a su estructura de anillo, estabiliza la conformación helicoidal en cada cadena α , mientras que la glicina está regularmente espaciada cada tres residuos, a través de la región central de la cadena α . Ya que es el más pequeño de los aminoácidos (con sólo un átomo de hi-

drógeno en su cadena lateral), la glicina permite que las cadenas α que formarán la triple hélice se empaqueten estrechamente una con la otra para dar lugar a la superhélice de colágena final.

Se han identificado cerca de 25 tipos de cadenas α de colágena, cada una codificada por un gen individual. Las distintas combinaciones de estos genes se ven expresadas en los diferentes tejidos y, aunque en principio podrían ser ensamblados más de 10 000 tipos de moléculas de colágena de triple cadena a partir de las diferentes combinaciones de estas 25 cadenas α , sólo se han encontrado 20 tipos de moléculas de colágena en los tejidos. Los principales tipos de colágena encontrados en los tejidos conectivos, llamadas colágenas fibrilares o colágenas formadoras de fibrillas, son los tipo I, II, III, V y XI, de los cuales el tipo I es la principal colágena de la piel y el hueso y, por lo tanto, la más común y abundante.

Las colágenas tipo IX y XII son también llamadas colágenas asociadas a fibrillas, y se cree que se unen lateralmente con las fibras colágenas II y I respectivamente. Los tipos IV y VII son colágenas formadoras de redes.

También existe cierta cantidad de proteínas “parecidas a las colágenas”, en donde se incluyen las del tipo XVII, las cuales tienen un dominio transmembranal y se encuentran en los hemidesmosomas; asimismo, la colágena tipo XVIII produce un péptido llamado endostatina que inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos y, por lo tanto, está siendo investigado como una droga anticancerosa. En el *cuadro 2* se describen algunos tipos de colágena discutidos en este capítulo.

La biogénesis de las fibras de colágena ocurre primero con la síntesis de cadenas polipeptídicas individuales de colágena, en los ribosomas unidos a membranas, y después estas cadenas son translocadas dentro del lumen del RER como precursores más grandes, llamados *cadena pro-α*. En el lumen del RER, las *prolinas* y las *lisinas* seleccionadas son *hidroxila-*



Cuadro 2

Algunos tipos de colágenas y sus propiedades

Nombre	Tipo	Forma polimerizada	Distribución Tisular
Formadora de fibrillas (fibrilar)	I	Fibrilar	Hueso, piel, tendones, ligamentos, córneas, órganos internos (90% de la colágena del cuerpo)
	II	Fibrilar	Cartílago, discos intervertebrales, notocordo, humor vítreo del ojo
	III	Fibrilar	Piel, vasos sanguíneos, órganos internos
	V	Fibrilar (con el tipo I)	Como la del tipo I
	XI	Fibrilar (con el tipo I)	Como la del tipo II
Asociada a fibrillas	IX	Asociación lateral con fibrillas tipo II	Cartílago
	XII	Asociación lateral con algunas fibrillas tipo I	Tendones, ligamentos, algunos otros tejidos
Formadora de redes	IV	Red semejante a una hoja	Lámina basal
	VII	Fibrillas de anclaje	Epitelio escamoso estratificado
Transmembranales	XVII	No conocida	Hemidesmosomas
Otras	XVIII	No conocida	Lámina basal alrededor de los vasos sanguíneos

Aquí sólo se muestran 11 tipos de colágenas, pero han sido identificados cerca de 20 tipos diferentes y aproximadamente 25 tipos de cadenas α .

das, donde también algunas de las hidroxilisinas son *glucosiladas*. Cada cadena pro- α se combina con otras dos para formar la molécula triple helicoidal unida por puentes de hidrógeno, conocida como procolágena.

En las colágenas son comunes las *hidroxilisinas* y las *hidroxiprolinas*, aminoácidos modificados que se forman por enzimas que actúan después de que la lisina y la prolina han sido incorporadas dentro de las moléculas de procolágena. Se cree que los grupos hidroxilos de estos aminoácidos forman puentes de hidrógeno entre las cadenas y ayudan a estabilizar la triple hélice. En ciertas condiciones en donde se previene la hidroxilación de la prolina, tales como una deficiencia de *ácido ascórbico* (vitamina C), se tienen serias consecuencias, como la enfermedad conoci-

da como escorbuto (ver más adelante en implicaciones clínicas). En enfermedades como ésta los tejidos afectados tienen una tasa de degradación y de reemplazo de la colágena relativamente rápida. En muchos otros tejidos adultos, sin embargo, se sabe que el recambio de colágena (y de otras macromoléculas de la MEC) es muy lento. En hueso, para tomar un ejemplo extremo, las moléculas de colágena persisten por aproximadamente diez años antes de que sean degradadas y reemplazadas. Por el contrario, la mayoría de las proteínas celulares tiene vida media de horas o días.

Después de la secreción, los propéptidos de las *moléculas de procolágena* son removidos por enzimas proteolíticas específicas fuera de la



célula. Esto convierte a las moléculas de procolágena en *moléculas de colágena*, las cuales se ensamblan en el espacio extracelular para formar fibrillas de colágena mucho más grandes.

En la biogénesis de las fibras de colágena, que implica varios pasos en su síntesis y ensamblaje, no es de sorprender que existan muchas enfermedades genéticas en el humano y los animales, las cuales afectan la formación de estas fibras (ver más adelante en implicaciones clínicas).

Las fibras de colágena resisten fuerzas de tensión, tienen varios diámetros y están organizadas en diferentes sentidos en los distintos tejidos. En la piel de los mamíferos, por ejemplo, están dispuestas en un patrón semejante a un tejido de mimbre, de tal manera que resiste el estrés mecánico de tensión en múltiples direcciones. En los tendones, están organizadas en mechones paralelos alineados a lo largo del eje principal del tendón. En el hueso maduro y en la córnea, están arregladas en capas ordenadas que asemejan hojas de triplay de madera, con las fibras en cada capa descansando paralelamente una con la otra, pero cercanamente en ángulos adecuados a las fibras de las capas contiguas. Esta misma disposición ocurre en la piel del talón o de los cojinetes plantares en los animales.

Implicaciones clínicas

Hay varias enfermedades relacionadas con la biogénesis de fibras de colágena; algunas de ellas tienen causas nutrimentales. En el escorbuto (causada por la deficiencia de vitamina C), la producción del residuo 4-hidroxiprolil (Hyp) decrece, porque la prolil hidroxilasa requiere vitamina C. Así, en ausencia de la vitamina C, la colágena sintetizada de novo no puede formar las fibras apropiadamente y por tanto se sintetizan cadenas defectuosas pro- α que fallan en la formación de una triple hélice estable y que son degradadas inmediatamente dentro de la célula. Consecuentemente, con la pérdida gradual de la colágena normal preexistente en la MEC, los

vasos sanguíneos se tornan extremadamente frágiles y los dientes llegan a desprenderse de sus cavidades gingivales, de lo que resultan lesiones en la piel, vasos sanguíneos frágiles, pobre recuperación de heridas e incluso la muerte.

El escorbuto fue común hasta el siglo XIX en los marinos que realizaban largos viajes y cuyas dietas estaban desprovistas de comida fresca. La introducción de limas en la dieta de los barcos ingleses por el reconocido explorador, el capitán James Cook, alivió este padecimiento.

La enfermedad llamada latirismo es causada por la ingestión regular de las semillas de un guisante de olor, el *Lathyrus odoratus*, el cual contiene componentes que específicamente inactivan la *lisil oxidasa*. Las fibras de colágena reducidas, que resultan de su entrecruzamiento, producen serias anomalías de los huesos, las articulaciones y los vasos sanguíneos mayores.

Varios desórdenes de colágena, raros y hereditarios, también han sido estudiados. Las mutaciones que afectan las colágenas tipo I, las cuales constituyen la proteína estructural principal en muchos tejidos, causan osteogénesis imperfecta (enfermedad del hueso quebradizo), caracterizada por huesos débiles que se fracturan con facilidad. La severidad de esta enfermedad varía con la naturaleza y posición de la mutación: un único cambio de aminoácido puede tener consecuencias fatales, por ejemplo, la sustitución central de Gly→Ala distorsiona la hélice ya internamente enrollada, rompiendo el puente de hidrógeno del esqueleto N-H de cada Ala (que normalmente debe ser Gly) con el grupo carbonilo de Pro adyacente en la cadena vecina; por lo tanto, se reduce la estabilidad de la estructura de colágena.

Las mutaciones que afectan las colágenas tipo II causan condrodisplasia; se caracterizan por la presencia de cartílagos anormales, los cuales provocan deformaciones en los huesos y articulaciones.



Las mutaciones pueden alterar la estructura de la molécula de colágena o la manera en que ésta forma fibras. Estas mutaciones tienden a ser dominantes porque modifican ya sea el plegamiento de la triple hélice o la formación de las fibras, aunque las cadenas normales también estén involucradas.

Muchos desórdenes de colágena se caracterizan por deficiencias en la cantidad de un tipo de colágena en particular o por actividades anormales de enzimas procesadoras de colágena, tales como la *lisil hidroxilasa* y la *lisil oxidasa*. Un grupo de al menos diez diferentes enfermedades con colágenas deficientes son las mutaciones que afectan las colágenas tipo III, que causan los síndromes de Ehlers-Danlos, todos ellos caracterizados por fragilidad en la piel y en los vasos sanguíneos, y por una hiperextensibilidad de las articulaciones y la piel. El llamado “hombre de hule de la India”, de gran fama circense, tiene un síndrome de Ehlers-Danlos.

Elastina

Muchos tejidos de vertebrados tales como la piel, los vasos sanguíneos y los pulmones necesitan ser fuertes pero también elásticos para llevar a cabo su función. Una red de fibras elásticas en la MEC de estos tejidos les confiere la elasticidad requerida, de tal forma que puedan recuperarse después de un estiramiento transitorio. Las fibras elásticas son al menos cinco veces más extensibles que una liga de hule de las mismas dimensiones. De esta manera, en el cuerpo se combinan las largas fibras de colágena inelásticas con las fibras elásticas para limitar la extensión de los estiramientos y prevenir el desgarre de los tejidos.

El principal componente de las fibras elásticas es la elastina, una proteína altamente hidrofóbica de aproximadamente 750 aminoácidos de longitud la cual, del mismo modo que la colágena, es inusualmente rica en prolinas y glicinas pero, a diferencia de la colágena, no está glucosilada

y contiene algunas hidroxiprolinas pero no hidroxilisinas. La *tropoelastina* soluble (el precursor biosintético de la elastina) se secreta en el espacio extracelular y es ensamblado en las fibras elásticas cerca de la membrana plasmática, generalmente en los pliegues de la superficie celular. Después de la secreción, las moléculas de tropoelastina llegan a estar altamente entrecruzadas una con la otra, generando una red extensa de fibras de elastina. Los entrecruzamientos son formados entre las lisinas por un mecanismo similar al que ya se explicó en la biogénesis de las fibras de colágena.

La proteína elastina está compuesta por dos tipos de segmentos cortos que se alternan a lo largo de la cadena polipeptídica: 1) los segmentos hidrofóbicos, los cuales son responsables de las propiedades elásticas de la molécula, y 2) los segmentos ricos en alanina, lisina y α -hélices, los cuales forman los entrecruzamientos entre las moléculas adyacentes.

La elastina es la proteína de la MEC dominante en las arterias (comprende 50% del peso seco de la arteria más grande: la aorta). Las mutaciones en el gen de la elastina causan una deficiencia de la proteína en ratones o en humanos, de lo que resulta el estrechamiento de la aorta u otras arterias, a causa de la proliferación excesiva de células de músculo liso en la pared arterial. Aparentemente, la elasticidad normal de una arteria es necesaria para restringir la proliferación de estas células musculares.

Las fibras elásticas no sólo se componen de elastina. El centro de la molécula de elastina está cubierta por una hoja de microfibrillas, cada una de las cuales tiene un diámetro de aproximadamente 10 nm. Las microfibrillas están compuestas por distintas glucoproteínas, que incluyen la *fibrilina*, glucoproteína grande que se une a la elastina y es esencial para la integridad de las fibras elásticas. Las mutaciones en el gen de la fibrilina producen el síndrome de Marfan, una enfermedad genética humana



relativamente común, que afecta el tejido conectivo, que es rico en fibras elásticas. En la mayoría de los individuos que padecen esta enfermedad, la aorta está propensa a la ruptura.

Moléculas mediadoras de la adhesión celular

La unión de la matriz extracelular a la célula, además de proteínas fibrosas, tales como la *colágena*, la *laminina* y la *fibronectina*, también requiere proteínas transmembranales de adhesión celular, que actúan como receptores de la matriz y la enlazan al citoesqueleto de la célula. Algunos proteoglicanos transmembranales funcionan como correceptores para los componentes de la matriz; sin embargo, los principales receptores sobre las células animales para la unión de la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular son las colágenas, las fibronectinas, las lamininas, así como otras moléculas mediadoras de la adhesión (integrinas, cadherinas y ditroglucanos).

Fibronectina

La MEC contiene proteínas no-colagenosas que típicamente poseen múltiples dominios, cada uno con sitios de unión específicos para otras macromoléculas y para receptores sobre la superficie de células. Estas proteínas, por lo tanto, contribuyen a la organización de la matriz y al pegado en ésta de las células. La primera de ellas en ser bien caracterizada fue la fibronectina, una glucoproteína grande encontrada en todos los vertebrados. La fibronectina es un dímero compuesto de dos subunidades muy grandes unidas por puentes disulfuro en uno de sus extremos. Cada subunidad está plegada en una serie de dominios funcionalmente distintos, separados por regiones de una cadena polipeptídica flexible. Los dominios, a su vez, están formados por módulos más pequeños, cada uno de los cuales está repetido serialmente y codificado por un exón indi-

vidual, lo que sugiere que el gen de la fibronectina, como los genes de colágena, evolucionaron por duplicaciones múltiples de sus exones. Todas las formas de fibronectina están codificadas en un solo gen grande que contiene cerca de 50 exones de tamaño similar. La transcripción produce una única molécula de ARN que puede sufrir una *maduración (splicing) alternativa* para producir las variadas isoformas de la fibronectina. El principal tipo de módulo es el llamado *repetido tipo III de fibronectina*, que se une a las integrinas. Tiene aproximadamente 90 aminoácidos de longitud y aparece al menos 15 veces en cada subunidad. El repetido tipo III de fibronectina es uno de los dominios más comunes de todas las proteínas en los vertebrados (*figura 4*).

Existen múltiples isoformas de la fibronectina. Una, llamada *fibronectina plasmática*, es soluble y circula en la sangre y en otros fluidos corporales, donde se cree que aumenta el recubrimiento sanguíneo, la recuperación de heridas y la fagocitosis. Todas las otras formas se ensamblan sobre la superficie de las células y son depositadas en la MEC como fibras de fibronectina altamente insolubles. En estas formas de fibronectina de superficie celular y de matriz, los dímeros de la proteína están entrecruzados unos con otros por enlaces disulfuro adicionales.

A diferencia de las moléculas de fibras de colágena, las cuales pueden generarse por autoensamblaje de fibras en un tubo de ensayo, las moléculas de fibronectina se ensamblan en fibras sólo en la superficie de ciertas células. Esto ocurre porque las proteínas adicionales son necesarias para la formación de fibras, especialmente las *integrinas de unión a fibronectinas*. En el caso de los fibroblastos, las fibras de fibronectina están asociadas con las integrinas en sitios llamados *adhesiones fibrilares*. Éstas son distintas de las adhesiones focales, en que son más alargadas y contienen diferentes proteínas de anclaje intracelular. Algunas proteí-

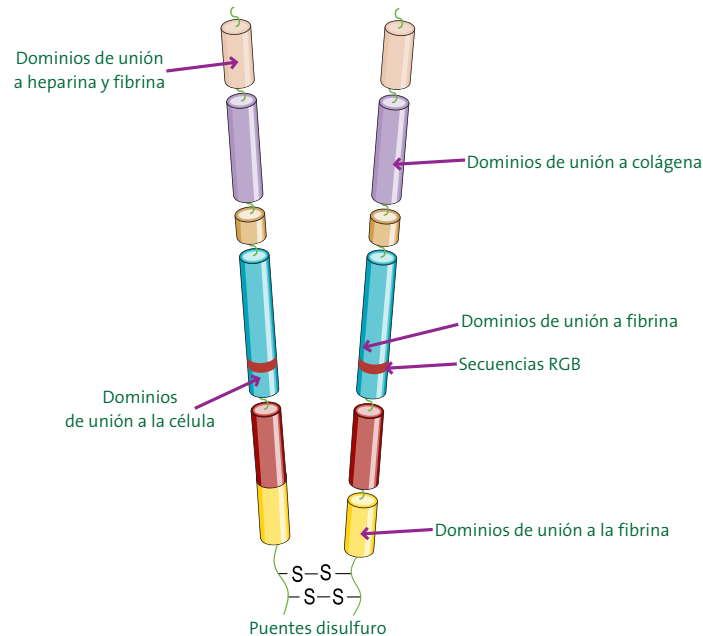


Figura 4. Esquema donde se señalan los diferentes dominios de una molécula de fibronectina.

nas secretadas funcionan para prevenir el ensamblaje de la fibronectina en lugares inapropiados. La uteroglobina, por ejemplo, se une a la fibronectina y evita que forme fibras en el riñón. Los ratones que tienen una mutación en el gen de la uteroglobina acumulan fibras de fibronectina insoluble en sus riñones.

La importancia de la fibronectina en el desarrollo animal está demostrada de manera exhaustiva por la inactivación experimental del gen que la codifica. Ratones mutantes que son incapaces de hacer fibronectina mueren tempranamente en la embriogénesis debido a que sus células endoteliales fallan en la formación de vasos sanguíneos apropiados. Se

cree que este defecto se debe a ciertas anomalías en las interacciones de estas células con la MEC que las rodea, la cual normalmente contiene fibronectina.

Laminina

La laminina I, que es la laminina clásica, es una proteína grande y flexible compuesta de tres cadenas polipeptídicas muy largas (α , β y γ) arregladas en una estructura de redes asimétricas y que se sostienen juntas por puentes disulfuro (figura 5). Varias isoformas de cada tipo de cadenas pueden asociarse en diferentes combinaciones para formar una gran familia de lamininas. La cadena de laminina γ -1 es un componente de la mayoría de los heterotrímeros de laminina. Los ratones que carecen de ella mueren durante la embriogénesis, debido a que son incapaces de hacer una lámina basal. Como otras muchas proteínas en la MEC, la laminina en membranas basales consta de varios dominios funcionales: uno se une al perlecano, uno al nidógeno, y dos o más a las proteínas receptoras de laminina sobre la superficie de las células.

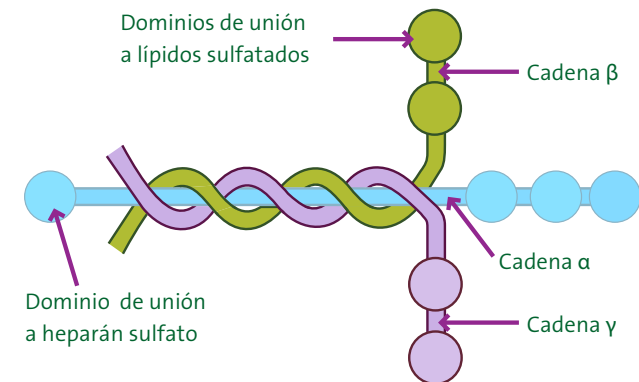


Figura 5. Esquema de los diferentes dominios de la molécula de laminina.



Integrinas

Las integrinas son heterodímeros transmembranales; constituyen una gran familia de receptores de adhesión, homólogos. En las células sanguíneas, las integrinas también sirven como moléculas de adhesión célula-célula, que ayudan a las células a unirse a otras y a la matriz extracelular.

Las integrinas, como otras moléculas de adhesión celular, difieren de los receptores de superficie para hormonas o para otras moléculas de señalización solubles extracelulares, en que generalmente se unen a su ligando con una afinidad más baja y están presentes en concentraciones de diez a cientos de veces más altas sobre la superficie celular. Si la unión fuera más fuerte, las células llegarían a estar pegadas a la matriz y serían incapaces de moverse, un problema que no surge si el pegado depende de grandes números de adhesiones débiles. Esto es un ejemplo del *principio del velcro*. Sin embargo, como otras proteínas de adhesión celular transmembranales, las integrinas hacen más que sólo pegar a la célula a sus alrededores. Ellas también activan vías de señalización intracelular que comunican a la célula las características de la matriz extracelular a la que está unida.

Las integrinas son de gran importancia porque son las proteínas receptoras principalmente necesarias para que las células se unan a la matriz extracelular y respondan a ella. Una molécula de integrina está compuesta de dos subunidades de glucoproteína transmembranal asociadas no covalentemente, llamadas α y β . Debido a que la misma molécula de integrina en diferentes tipos celulares puede tener distintas especificidades de unión al ligando, parece que factores adicionales específicos del tipo celular pueden interactuar con las integrinas para modular su actividad de unión.

La unión de las integrinas a sus ligandos depende de los cationes divalentes extracelulares (Ca^{2+} o Mg^{2+} , dependiendo de la integrina), con lo

que se refleja la presencia de dominios de unión a cationes divalentes en la parte extracelular de las subunidades α y β . El tipo de catión divalente puede influir tanto en la afinidad como en la especificidad de la unión de una integrina a sus ligandos.

Muchas proteínas de matriz extracelular en vertebrados son reconocidas por múltiples integrinas. Al menos ocho integrinas se unen a fibronectina, por ejemplo, y al menos cinco lo hacen a laminina. Una variedad de heterodímeros de integrina humana está formada por nueve tipos de subunidades β y 24 tipos de subunidades α . Esta diversidad se incrementa más debido al procesamiento (*splicing*) alternativo de algunos ARN de integrinas. Algunas de las integrinas mejor estudiadas se enlistan en el [cuadro 3](#).

Las subunidades β_1 forman dímeros con al menos 12 distintas subunidades α . Ellas se encuentran en casi todas las células de vertebrados: $\alpha_5\beta_1$, por ejemplo, es un receptor para fibronectina y $\alpha_6\beta_1$, un receptor para laminina en muchos tipos celulares. Los ratones mutantes que no pueden hacer ninguna integrina β_1 mueren en la etapa de implantación, mientras que los ratones que sólo son incapaces de hacer la subunidad α ,

Cuadro 3
Algunos tipos de integrinas

Integrina	Principal ligando	Distribución
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina	Ubicua
$\alpha_5\beta_2$	Laminina	Ubicua
$\alpha_7\beta_1$	Laminina	Músculo
$\alpha_1\beta_2$	Contrarreceptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas	Células blancas sanguíneas
$\alpha_2\beta_3$	Fibrinogen	Plaquetas
$\alpha_6\beta_4$	Laminina	Hemidesmosomas epiteliales



(la compañera para β_1 en el músculo) sobreviven, pero desarrollan distrofia muscular (como lo hacen los ratones que no pueden hacer el ligando laminina para la integrina $\alpha_2\beta_1$).

Las subunidades β_2 forman dímeros con al menos cuatro tipos de subunidad α . Ellas son expresadas exclusivamente sobre la superficie de células blancas sanguíneas, en las que tienen un papel esencial porque facilitan la defensa en contra de las infecciones. La función principal de las integrinas β_2 es mediar las interacciones célula-célula, más que las interacciones célula-matriz extracelular, uniéndose a ligandos específicos sobre otra célula, por ejemplo, una célula endotelial. Los ligandos, algunas veces llamados contrarreceptores, son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) de moléculas de adhesión célula-célula. Las integrinas β_2 ayudan a las células blancas de la sangre a pegarse firmemente a las células endoteliales en sitios de infección, y a migrar fuera del torrente circulatorio hacia el sitio infectado. Desde el punto de vista clínico, los individuos con la enfermedad genética llamada *deficiencia de adhesión leucocitaria* son incapaces de sintetizar subunidades β_2 y, como consecuencia, sus células blancas sanguíneas carecen de la familia entera de receptores β_2 ; por ello, sufren de repetidas infecciones bacterianas.

Las integrinas β_3 se encuentran en varios tipos de células, incluyendo las plaquetas sanguíneas. Ellas se unen a distintas proteínas de la MEC, como el fibrinógeno. Las plaquetas interactúan con el fibrinógeno durante la coagulación sanguínea, e individuos con la *enfermedad de Glanzmann*, quienes son genéticamente deficientes en integrinas β_3 , sangran profusamente.

Las integrinas funcionan como ganchos o “integradores” transmembranales, mediando las interacciones entre el citoesqueleto y la MEC que requieren las células para engancharse (*grip*) a la MEC. La mayoría de las integrinas están conectadas a mechones de filamentos de actina. La integri-

na $\alpha_6\beta_4$ encontrada en los hemidesmosomas es una excepción, pues está conectada a filamentos intermedios. Después de la unión de una integrina típica a su ligando en la MEC, la cola citoplasmática de la subunidad β se une a varias proteínas intracelulares de anclaje, como la *talina*, la *α -actinina* y la *filamina*. Estas proteínas de anclaje pueden unirse directamente a la *actina* o a otras proteínas ancla como la *vinculina*; de esta manera se establece la unión de las integrinas a los filamentos de actina en la corteza celular. Dadas las condiciones adecuadas, esta unión conduce a un agrupamiento de las integrinas en la formación de adhesiones focales entre la célula y la MEC.

Asimismo, el agrupamiento de integrinas en los sitios de contacto con la matriz (o con otra célula) puede también activar las vías de señalización intracelular (véase capítulo 9). La señalización es iniciada por el ensamblaje de complejos de señalización en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, de la misma manera que sucede en los receptores convencionales. Las integrinas activadas pueden inducir respuestas celulares globales, a menudo incluyendo cambios en la expresión génica. En el desarrollo del sistema nervioso, como otro ejemplo, el crecimiento de un axón es guiado principalmente por su respuesta a las características adhesivas (y repelentes) locales en el ambiente que son reconocidas por las proteínas de adhesión celular transmembranales. Las integrinas y los receptores de señalización convencionales pueden trabajar juntos en varios sentidos. Las vías de señalización activadas por receptores convencionales pueden incrementar la expresión de las integrinas o de las moléculas de la MEC, mientras que aquellas activadas por las integrinas pueden incrementar la expresión de receptores convencionales o de los ligandos que se unen a ellas. Para algunos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, endoteliales y musculares, la sobrevivencia de las células depende de la señalización a través de integrinas. Cuando estas



células pierden contacto con la MEC, sufren entonces muerte celular programada o apoptosis. Esta dependencia sobre su unión a la MEC para la sobrevivencia y la proliferación puede ayudar a asegurar que las células sobrevivan y proliferen sólo cuando están en su localización apropiada, lo cual puede proteger a los animales en contra de la diseminación de células cancerosas.

La división celular y el crecimiento de la glándula mamaria es regulada no sólo por hormonas, sino también por señales locales que pasan entre las células dentro del epitelio y entre las células epiteliales y el tejido conjuntivo, o estroma, en el cual las células epiteliales están embebidas. Todas estas señales son importantes para controlar, tanto el recambio celular en la epidermis, como los eventos en la glándula mamaria. Las señales liberadas por vía de las integrinas desempeñan una función cru-

cial: al desproveer de las adhesiones de la lámina basal que activan la señalización de las integrinas, las células epiteliales dejan de responder normalmente a las señales hormonales. Las fallas en estos sistemas de control interactivo permiten advertir algunas de las formas más comunes del cáncer, por lo que es necesario entenderlas mejor.

Las moléculas de adhesión celular discutidas en esta sección se resumen en el *cuadro 4*.

Interacción célula-matriz extracelular

Membrana basal

La membrana basal es una estructura de sostén que delimita el tejido epitelial y el tejido conjuntivo. Es visible al microscopio fotónico (o de luz)

Cuadro 4

Familias de moléculas de adhesión celular

	Algunos miembros de la familia	Dependencia de Ca ²⁺ o Mg ²⁺	Asociaciones con el citoesqueleto	Asociaciones con uniones celulares
Adhesión célula-célula				
Cadherinas clásicas	E, N, P, VE	Sí	Filamentos de actina (vía cateninas)	Uniones adherentes
Cadherinas desmosomales	Desmogleína	Sí	Filamentos intermedios (vía desmoplaquina, placoglobina y otras proteínas)	Desmosomas
Miembros de la familia de Ig	N-CAM	No	Desconocidos	No
Selectinas (sólo células sanguíneas y endoteliales)	L-, E-, y P-selectinas	Sí	Filamentos de actina	No
Integrinas sobre células sanguíneas	$\alpha 1 \beta 2$	Sí	Filamentos de actina	No
Adhesión célula-MEC				
Integrinas	Muchos tipos	Sí	Filamentos de actina (vía talina, filamina, α -actinina y vinculina)	Adhesiones focales
	$\alpha 6 \beta 4$	Sí	Filamentos intermedios (vía plectina)	Hemidesmosomas
Proteoglicanos transmembranales	Sindecános	No	Filamentos de actina	No



que se tiñe de manera específica con el ácido periódico y la técnica de Schiff, conocida con las siglas PAS, o con métodos a base de plata conocidos como impregnación argéntica (*argentum* = plata); la primera técnica identifica los GAG presentes en esta estructura y la segunda tiñe las fibras colágenas tipo III, conocidas también como *fibras reticulares* (figura 6).

El término membrana basal es más bien histológico, por ello los libros de biología celular generalmente no lo mencionan. La membrana basal comprende tres estructuras: a) La *lámina lúcida*, b) la *lámina densa* y c) la *lámina reticular* (figura 7). Las dos primeras pueden identificarse al microscopio electrónico y constituyen una ultraestructura que no puede ser observada al microscopio fotónico (u óptico), llamada *lámina basal*. La lámina lúcida es electrolúcida y la lámina densa es un engrosamiento formado por una red de filamentos muy finos y más electrodensos que la anterior. La lámina lúcida está adyacente a la membrana plasmática de las células o porciones que recubre; de igual modo, la lámina densa está junto a la lámina lúcida, por lo que ambas estructuras siguen el contorno de la membrana plasmática, que dan soporte estructural a las células epiteliales y rodean por completo las células no musculares.

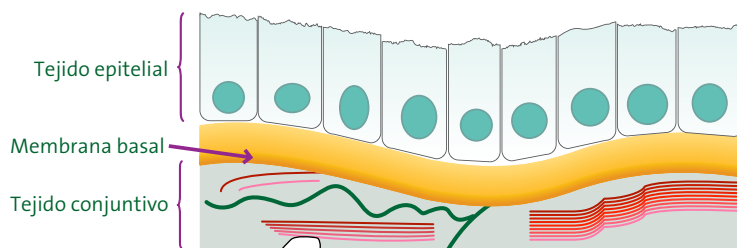


Figura 6. Esquema de la membrana basal entre el tejido epitelial y el tejido conjuntivo.

La lámina basal es elaborada por las células que se rodean de ella, mientras que la lámina reticular es sintetizada por células del tejido conjuntivo.

La lámina reticular y la lámina densa, juntas constituyen las dos principales estructuras por las cuales es visible la membrana basal al microscopio fotónico.

Las células epiteliales presentan membrana basal típica, ya que ésta generalmente se encuentra en contacto con el tejido conjuntivo; sin embargo, alrededor de células no epiteliales, como son las *células musculares lisas*, *células musculares esqueléticas*, *adipocitos* y *neurilemocitos* (o *células de Schwann* o *schwannocitos*), se encuentra una lámina basal con escasa o nula lámina reticular que rodea por completo a las células, por lo que a esta estructura parecida a la membrana basal se le llama *lámina externa*.

Además de las funciones de sostén para el epitelio suprayacente, la lámina basal cumple funciones de filtro selectivo de moléculas y dirige la migración celular a lo largo de su superficie, por lo que la presencia de esta estructura es fundamental para que el organismo pueda llevar a cabo la reparación tisular. Existen diversos ejemplos a este respecto, como son la regeneración hepática, la reparación de heridas y la regeneración de los nervios motores que forman las uniones neuromusculares.

La membrana basal o la lámina externa separan o aíslan las células del tejido epitelial, muscular y nervioso, o bien, a los adipocitos del resto del conjuntivo, dando lugar a dos compartimentos separados y regulando el paso de moléculas entre ellos. En los tejidos epiteliales además induce la polaridad celular, es decir, la especialización morfológica y funcional entre el dominio apical y el basolateral.

En la lámina basal se encuentran cuatro componentes proteínicos comunes:



- fibras colágenas tipo IV
- *laminina*
- entactina, también conocida como *nidógeno*
- el proteoglucano *perlecano*

En la lámina lúcida se encuentran principalmente las glucoproteínas extracelulares; *entactina* y *laminina*, además de moléculas de *integrinas* y *distroglucanos*.

Las redes bidimensionales de la lámina basal son formadas por las colágenas tipo IV y las moléculas de lamininas, mientras que las moléculas conectoras son el nidógeno y el perlecano (figura 7).

La *colágena tipo IV* es exclusiva de la lámina basal y es el componente estructural principal. Las moléculas se autoensamblan formando una red bidimensional irregular y ramificada, a partir de la cual se construye la lámina basal.

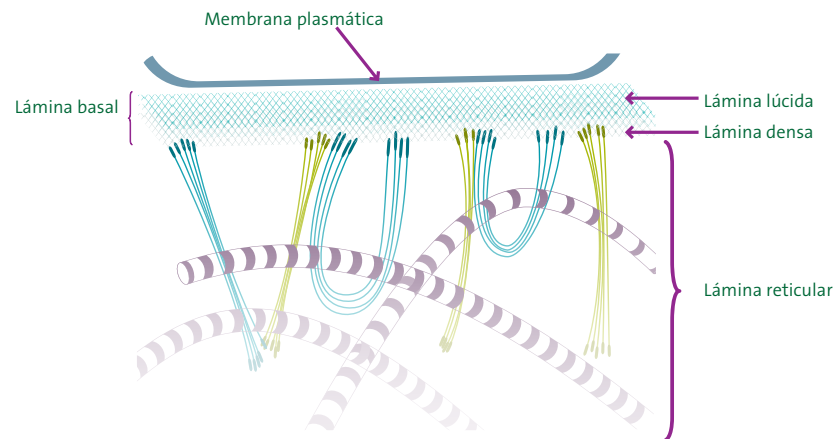


Figura 7. Componentes estructurales de la membrana basal.

La malla formada por la colágena tipo IV contiene poros de dimensiones particulares que participan en la filtración física de moléculas; esta filtración se ve complementada por las cargas negativas de las moléculas de sulfato de heparano presentes en el perlecano, que excluye o restringe el paso de moléculas con cargas negativas.

Los fibroblastos del tejido conjuntivo sintetizan *fibronectina*, colágena tipo VII (conocida como fibrillas de anclaje), *microfibrillas de fibrilina* que fijan la lámina densa a las fibras reticulares (fibras colágenas tipo III). En la superficie de la lámina densa que mira hacia la lámina reticular se encuentran moléculas de fibronectina.

Fibras colágenas tipo IV

Son producidas por las células que presentan membrana basal o lámina externa y no por fibroblastos, como ocurre con los demás tipos de colágenas. Poseen mayor cantidad de hidroxilisina e hidroxiprolina, y de carbohidratos dispuestos lateralmente en relación con otros tipos. La *colágena tipo VII* forma dímeros que se organizan para constituir las *fibrillas de anclaje* que unen la lámina reticular a la lámina densa. Las *colágenas tipo III* y *VII* están clasificadas funcionalmente como colágenas formadoras de redes.

Laminina

Son glucoproteínas en forma de cruz. La laminina clásica o laminina-1 forma un heterotrímero, es decir, presenta tres cadenas polipeptídicas distintas (α , β , y γ) que se unen mediante puentes disulfuro. Estas moléculas tienen diversos dominios que se unen a las colágenas tipo IV, a las cadenas laterales del sulfato de heparano que provienen del centro proteínico del perlecano y a proteínas transmembrales: las *integrinas* y los *distroglucanos*. Estas últimas actúan como receptores que organizan la forma en la que será ensamblada la lámina basal.



Entactina o nidógeno

Es una glucoproteína sulfatada en forma de bastón que se une a las fibras colágenas tipo IV y a la laminina. Al ser una molécula susceptible a la degradación proteolítica, la unión con la laminina le confiere protección.

En el tejido nervioso el nidógeno contribuye a la morfogénesis y plasticidad neuronal; además, cuando está ausente genera actividad epiléptica *in vivo*.

Perlecano

Es un proteoglucano muy versátil en cuanto a la variedad y número de moléculas que se pueden asociar a él, ya que puede establecer puentes cruzados con diversos componentes de la MEC, o bien, entre componentes de la MEC con la superficie celular.

El perlecano cumple diferentes funciones en los procesos de organogénesis, angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes), condrogénesis (formación del cartílago) y osificación endocondral (crecimiento en longitud de los huesos largos a partir del cartílago epifisiario).

En el riñón, el perlecano presente en la membrana basal permite la filtración selectiva de moléculas del torrente sanguíneo para formar la orina en el glomérulo.

La lámina reticular está constituida por fibras colágenas tipo I y III, y es elaborada por fibroblastos del tejido conjuntivo. Su grosor es variable y depende de manera proporcional del grado de fricción a la que esté sometido el tejido epitelial que se encuentra por encima de la lámina basal.

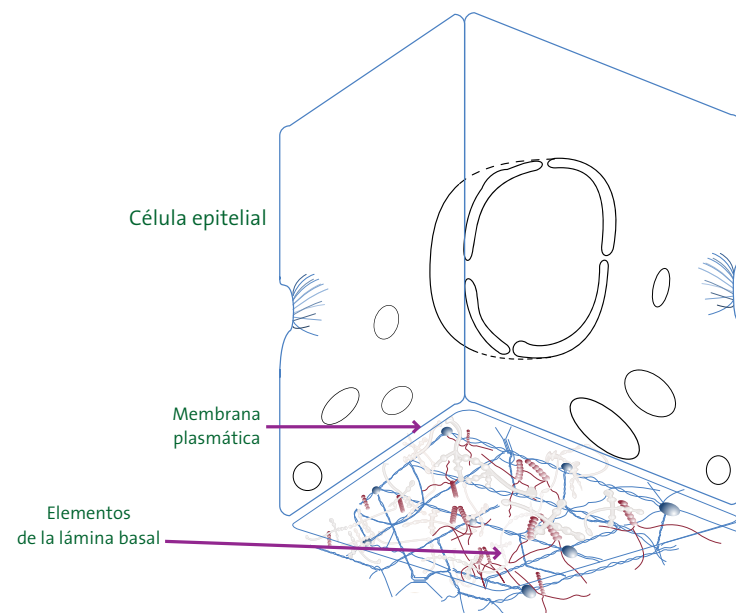


Figura 8. Componentes moleculares de la lámina basal.

La unión con la lámina densa está determinada por las siguientes interacciones moleculares: *a)* las fibras colágenas tipo I y III forman dobleces para relacionarse con las fibrillas de anclaje y microfibrillas, *b)* los GAG ácidos de la lámina densa se unen con los grupos básicos de las fibras colágenas, y *c)* las porciones o dominios de GAG de las moléculas de fibronectina se unen a las moléculas de colágena, de tal forma que el tejido epitelial queda firmemente fijo al tejido conjuntivo subyacente mediante el entramado molecular entre la lámina basal y la lámina reticular (*figura 8*).



Bibliografía

Composición y diversidad estructural

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Introducción a la biología celular. 2ª ed. Madrid (España): Médica Panamericana, 2006.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Ditatev A, Schachner M. The extracellular matrix and synapses. Cell tissue Res 2006; 326:647-654.
- Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-typeII receptor complex formation. Glycosaminoglycans modifications alter betaglycan function J Biol Chem 2002; 277:823-829.
- Fransson LA. Molecules in focus. Glypicans. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35:125-129.
- Gartner LP, Hiatt JL. Texto atlas de histología. 2ª ed. Colombia: McGraw-Hill-Interamericana, 2004.
- Jiménez-García LF, Merchant-Larios H. Biología celular y molecular. México (D.F.): Prentice Hall, 2003.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser Ch A, Krieger M, Scout MP, Zipursky SL, Darnell J. Biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana, 2005.
- Reed ChC, IozzoRV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. Glycocon J 2003; 19:249-255.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología. Texto atlas color con biología celular y molecular. 4ª ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana, 2005.
- Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. Eu Cell Mat 2006; 12:92-101.

Proteínas fibrosas y moléculas de adhesión

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4ª ed. EE.UU.: Garland Science Taylor & Francis Group, 2002.
- Voet D, Voet J G, Pratt C W. Fundamentals of biochemistry. John Wiley & Sons, 1999.

Interacción célula-matriz extracelular

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Introducción a la biología celular. 2ª ed. Madrid (España): Médica Panamericana, 2006.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Dziadek M. Role of laminin-nidogen complex in basement membrana formation during embryonic development. Experiencia 1995; 51:901-913.
- Gartner LP, Hiatt JL. Texto atlas de histología. 2ª ed. Colombia: McGraw-Hill-Interamericana, 2004.
- Knox SM, Whitelock JM. Perlecan: How does one molecule do so many things? Cell Mol Life Sci 2006; 63:2435-2445.
- Köhling R, Nisch R, Vasudevan A, Ho M, Welergraber M, Schneider T, Smyth N. Nidogen and nidogen-associated basement membrane proteins and neuronal plasticity. Neurodegener Dis 2006; 3:56-61.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser Ch A, Krieger M, Scout MP, Zipursky SL, Darnell J. Biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana, 2005.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología. Texto atlas color con biología celular y molecular. 4ª ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana, 2005.

6

Componentes celulares
involucrados en la síntesis, tráfico
y distribución de las proteínas



Capítulo 6

Componentes celulares involucrados en la síntesis, tráfico y distribución de las proteínas

Manuel Espinosa Pedroza

Objetivos temáticos

- Ribosomas: estructura y función.
- Retículo endoplasmático rugoso: estructura y función.
- Aparato de Golgi: estructura y función.
- Lisosomas: estructura y función.
- Retículo endoplasmático liso: estructura y función.

Introducción

Las proteínas son las moléculas de “Primera Clase” que la célula necesita y sintetiza, para lo cual cuenta con componentes como los ribosomas, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Sin embargo, en esta unidad abordaremos los lisosomas, puesto que son organelos producidos por el binomio funcional retículo endoplasmático rugoso-aparato de Golgi.

Ribosomas: estructura y función

Desde el concepto de Garnier de *sustancia cromidial*, en 1900, se ha asociado la basofilia a la presencia numerosa de los ribosomas en el citoplasma.

Los *ribosomas* miden entre 15 y 30 nm, dependiendo de si las células están fijadas o no lo están, y cada ribosoma está constituido por dos subunidades; una mayor (de 60S en eucariontes y 50S en procariontes) y otra menor (de 40S en eucariontes y 30S en procariontes), de tal manera que las eucariontes presentan ribosomas 80S, mientras que las procariontes presentan ribosomas 70S, al igual que en las mitocondrias.

Los ribosomas están compuestos de ARN ribosomal, más las proteínas asociadas. En las células eucariontes, 70% es ARNr, y son producidos en el nucléolo por transcripción de la ARN polimerasa I.

La subunidad mayor del ribosoma eucariótico tiene 3 ARNr (28S, 5.8S y 5S), en tanto que en los organismos procariontes tiene 2 ARNr (23S y 5S), mientras que la subunidad menor tiene un solo un ARNr (18S, en eucariontes y 16S en procariontes)

Los ribosomas se asocian para la síntesis de proteínas y en tanto no ocurra esto, permanecen disociados o libres. Durante la síntesis de proteínas los ribosomas se asocian por mediación de un ARN mensajero, es decir, las subunidades mayor y menor se agregan para constituir el ribosoma, y cada uno de estos se asocia al ARNm, para crear los polisomas (*figura 1*).

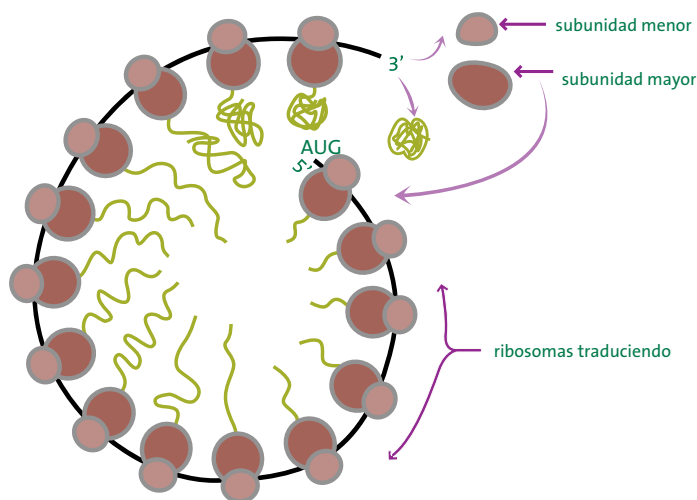


Figura 1. Polisoma.

Si en la traducción (síntesis de proteínas), los polisomas se asocian al retículo endoplasmático, este último se vuelve rugoso y la proteína se descarga en el lumen de sus membranas; se dice que la proteína es translocable.

Si el polisoma permanece en el citosol sin asociarse al retículo endoplasmático, entonces la proteína se descarga al citosol y no es translocable.

Es importante señalar que al terminar de sintetizar una proteína, el ribosoma se disocia y puede asociarse de nuevo para iniciar síntesis proteínica, aunque pueden no asociarse las mismas subunidades mayor y menor, como se ha demostrado por isótopos radiactivos.

Las proteínas no translocables que se sintetizan son acompañadas por un grupo de proteínas que las reparan o les dan mantenimiento, a las que se les llama *proteínas de unión* o *chaperonas*, esto último porque siempre las acompañan desde su nacimiento hasta su destrucción. Algunas proteínas de unión se sintetizan rápidamente en situaciones de

tensión celular causadas por calor, isquemia, acidosis o agentes irritantes, y se les asignan las siglas del inglés HSP, que en español significa *proteínas de choque térmico* o *proteínas de estrés*.

Así como existe un equilibrio en muchos aspectos de la biología, la síntesis y degradación de proteínas permanece en equilibrio y al parecer la degradación ocurre al azar, o bien, cuando hay defectos. Los defectos pueden ser por mal plegamiento o por desnaturalización y presentan una señal para ser degradadas por un complejo proteínico llamado proteosoma. La proteína señalada para su destrucción, primero es ubiquitinada, lo cual consiste en la agregación de múltiples unidades de *ubiquitina* (proteína pequeña de 76 aa) y después es enviada al *proteosoma*.

Un proteosoma consiste en un cilindro que tiene cuatro anillos: dos alfa externos y dos beta mediales, además de dos complejos proteínicos en los extremos del cilindro, los cuales capturan las proteínas ubiquitinadas introduciéndolas en los anillos que actúan como proteasas (*figura 2*).

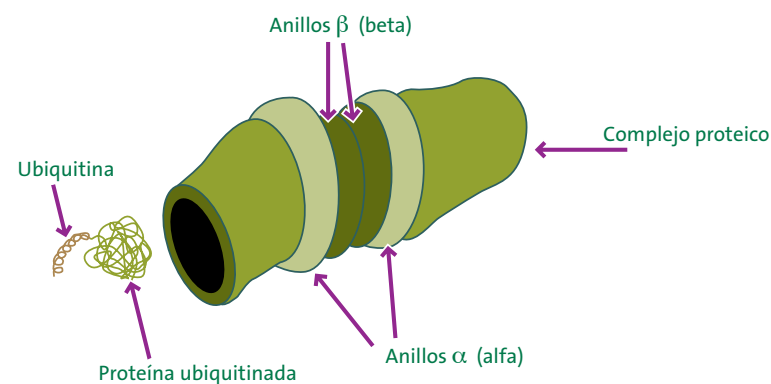


Figura 2. Proteosoma.



Retículo endoplasmático rugoso: estructura y función

El retículo endoplasmático es un sistema de túbulos y cisternas de membrana, interconectados en forma de red, precisamente como un retículo. Se distribuyen por todo el citoplasma y pueden presentar vesículas en sus espacios libres y periféricos; el de tipo rugoso presenta ribosomas adheridos a su membrana, y el de tipo liso, del cual se hablará más adelante, carece de ribosomas.

En el caso del *retículo endoplasmático rugoso (RER)*, la red membranosa está conformada por vesículas o sáculos aplanados; su membrana encierra una cavidad llamada luz o lumen. En 1945 Claude aisló vesículas con ribosomas adheridos, a los que llamó *microsomas*, y posteriormente, al aplicar centrifugación diferencial, se demostró que procedían del RER.

La membrana unidad del RER es más delgada que la membrana plasmática y se establece una asimetría de las dos hemimembranas (exoplásmica hacia el lumen y citoplasmática hacia el citosol).

Los ribosomas se adhieren al RER a través de la subunidad mayor, y sólo lo hacen aquellos que traducen un péptido señal que media la migración del polisoma hacia el RER (*figura 3*).

Al iniciar la síntesis de proteína, un pequeño péptido da una señal en su *extremo aminoterminal*, que reconoce una proteína citosólica llamada *proteína reconocedora de la señal (SRP)*. La unión de la SRP con el ribosoma provoca la migración del ribosoma hacia la membrana del RER. La SRP se une a un receptor de la membrana del RER y provoca el anclaje del ribosoma en la hemimembrana citoplasmática del RER. La SRP se desprende del receptor y vuelve al *citosol*; esto consume GTP. Se reinicia la síntesis de proteína y el *péptido señal* se une a una proteína translocadora de la

membrana del RER y se genera un poro que permite que se descargue vectorialmente al lumen del RER la proteína que se va sintetizando; esto consume ATP.

El péptido señal queda anclado en la membrana del RER y es eliminado por una *peptidasa señal*. Existen casos en donde el péptido señal no se separa de la proteína sintetizada como en las proteínas que quedan en la membrana del RER. Si la proteína va a ser translocada del lumen, entonces se une un segundo péptido señal de translocación o seguirán otros que van determinando el anclaje sucesivo, éstos se unen al *extremo carboxilo terminal*.

Las proteínas sintetizadas por los ribosomas de RER se descargan a su lumen, en donde son glucosiladas para generar glucoproteínas (presentan oligosacáridos) o proteoglucanos (presentan glucosaminoglucanos).

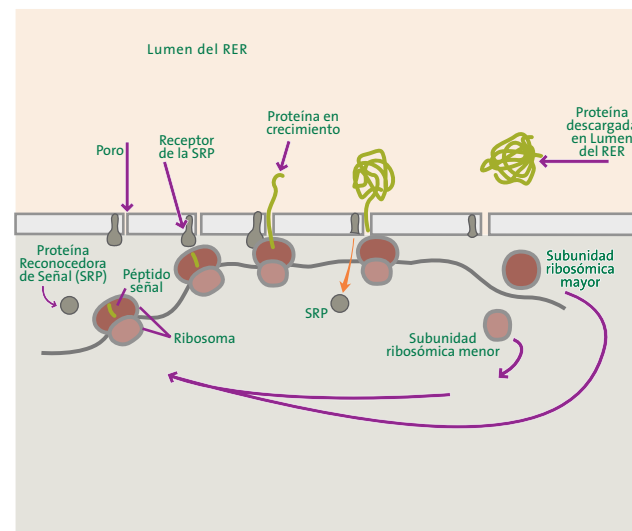


Figura 3. Péptido señal.



Las proteínas en la luz del RER son asistidas por proteínas chaperonas que existen en el lumen del RER y se encargan de su mantenimiento y de evitar su precipitación. Si una proteína está defectuosa, estas chaperonas la transportan al citosol para su degradación.

Muchas proteínas que se sintetizan en el RER se utilizan para formar parte de las membranas del RER y el *retículo endoplasmático liso*, de la envoltura nuclear, o bien, de la membrana del aparato de Golgi. Otras proteínas son secreciones y entonces se translocan al aparato de Golgi, de donde saldrán como *vesículas secretorias* en dos tipos de secreción (constitutiva y regulada).

La síntesis de *hidrolasas ácidas* lisosomales ocurre en el RER; enseguida éstas pasan al aparato de Golgi, para salir de ahí como *lisosomas primarios*, o bien, unirse a los lisosomas ya formados.

Aparato de Golgi: estructura y función

En un principio fue denominado *complejo reticular interno* por su descubridor Camilo Golgi en 1898, y confirmado posteriormente por Santiago Ramón y Cajal. Hasta 1950 se observó al microscopio electrónico y se le llamó como actualmente se le conoce: *complejo* o *aparato de Golgi*.

Se localiza en las células secretoras entre el núcleo y la zona apical y consta de varias unidades llamadas *dictiosomas*. El número de unidades varía en las células desde 1 hasta 50.

Cada dictiosoma consta de un conjunto de sáculos de membrana, apilados como monedas, en el cual la membrana unidad de cada sáculo encierra un lumen y se interconecta en algunos sáculos; cada dictiosoma presenta dos caras: una convexa, orientada al núcleo y llamada *proximal, cis* o *formadora*. La otra cara es cóncava y está orientada hacia la zona apical, y se le llama *distal, trans* o *madura*.

En la *cara cis* llegan vesículas de transferencia que provienen del RER y por la *cara trans* salen vesículas secretorias.

Es común observar vesículas de transición entre los sáculos. El aparato de Golgi participa en la secreción de proteínas en asociación con el RER; las glucoproteínas sintetizadas por el RER pasan como vesículas a la cara cis del aparato de Golgi y sufren modificaciones en los oligosacáridos, se retira manosa, se agrega N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico o neuramínico.

En células conjuntivas es común la incorporación de las largas cadenas de glucosaminoglucanos a los proteoglucanos. También en el aparato de Golgi se lleva a cabo la fosforilación de oligosacáridos de enzimas lisosomales.

Existe una compartimentación del dictiosoma en cinco regiones: 1) red cis, 2) compartimento cis, 3) compartimento medial, 4) compartimento trans y 5) red trans (*figura 4*).

Se reconocen dos tipos de secreción: 1) *constitutiva*, donde las vesículas secretorias están recubiertas de coatmeros y 2) *regulada*, donde el recubrimiento de las vesículas es por *clatrina*. En ambos casos, la secreción se libera por exocitosis a través de la membrana plasmática, y para evitar un aumento en la membrana celular, parte de ésta se recupera con las vesículas de endocitosis, lo que da lugar a un reciclaje de membrana.

Lisosomas: estructura y función

Son organelos esféricos de diámetro variable, en su interior presentan numerosas *enzimas hidrolíticas*; existen en todas las células animales, no así en las vegetales. Fueron observados por primera vez en 1949, por C. de Duve, en hepatocitos de rata.

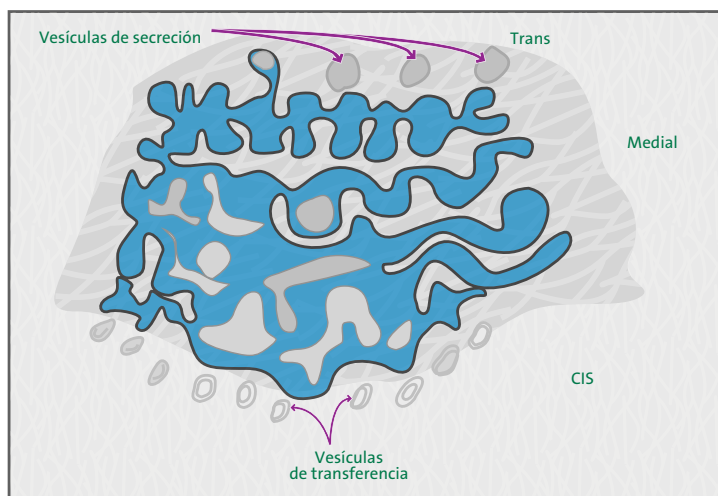


Figura 4. Aparato de Golgi.

Sus enzimas son *hidrolasas ácidas* y se han descrito alrededor de 40 diferentes para diversos sustratos, entre las que destacan *proteasas*, *nucleasas*, *glucosidasas*, *lisozima*, *arilsulfatasas*, *lipasas*, *fosfolipasas* y *fosfatasas*, siendo estas últimas las más abundantes.

El pH de actividad lisosomal es de 4.5-5 en el interior del lisosoma y se abastece de H^+ gracias a una *bomba de protones* que hidroliza ATP para trabajar. La membrana lisosomal presenta glucosilaciones en su porción interna (hemimembrana exoplasmática), además tiene receptores de unión para vesículas, elevada cantidad de colesterol y esfingomielina, así como proteínas específicas llamadas LAMP (proteínas asociadas a la membrana lisosomal).

Las enzimas lisosomales son producidas como glucoproteínas en el RER y se modifican en el aparato de Golgi, para posteriormente ser liberadas como lisosomas primarios. Si los lisosomas ya tienen actividad se

denominan *lisosomas secundarios*; éstos pueden ser *cuerpos multivesiculares*, o bien, *endolisosomas*, producto de la *pinocitosis*, donde las enzimas degradan sustratos incluidos por la célula.

También pueden ser *fagolisosomas*, producto de la fagocitosis; aquí las enzimas lisosomales degradan sustratos incluidos por la célula de defensa, como *macrófagos* o *neutrófilos*. En ambos casos de *endocitosis*, una vez digeridos los sustratos, las moléculas se difunden al citosol, o bien, se expulsan de la célula por *exocitosis* y en algunos casos se quedan en el interior del lisosoma, generando los *cuerpos residuales* o *telolisosomas*.

A veces los lisosomas degradan material interno, como organelos o vesículas, y entonces se generan las *vacuolas autofágicas*, *autolisosomas* o *citolisosomas*. Algunas células pueden liberar enzimas lisosomales para degradar material externo; tal es el caso de los espermatozoides durante la *reacción acrosomal*, así como los *osteoclastos* y *condroclastos* durante la destrucción de la matriz ósea y cartilaginosa respectivamente.

Retículo endoplasmático liso: estructura y función

A diferencia del RER, el retículo endoplasmático liso (REL) no presenta ribosomas adheridos y por lo tanto no se especializa en la síntesis de proteínas. Por centrifugación se aísla en forma de *microsomos lisos* y son muy similares a los del aparato de Golgi. Sus funciones son muy variadas; entre éstas destacan las siguientes:

1. Síntesis de hormonas esteroideas a partir de pregnenolona, como testosterona, estrona, estradiol, corticosterona y desoxicortisol.
2. Síntesis de triacilglicéridos y fosfoglicéridos.



3. Síntesis de ácidos biliares.
4. Desintoxicación de sustancias liposolubles como barbitúricos, etanol, insecticidas, herbicidas, medicamentos, entre otras, las cuales se inactivan por enzimas (*oxigenasas*) y las más importantes están asociadas al *citocromo P450* de la membrana de REL. Esta actividad enzimática fue conocida como *sistema microsomal enzimático*.
5. Regulador citosólico de calcio. Secuestra o libera calcio dependiendo de las necesidades del ion en el citosol, como ocurre en las células musculares para su contracción. En las células musculares es conocido como *retículo sarcoplasmático*.
6. Glucogenólisis. Se considera que la enzima *glucosa 6-fosfatasa* está presente en la membrana del REL.

Aislamiento de proteínas

Hay dos técnicas las utilizadas para este fin:

1. Cromatografía
2. Electroforesis

En ambos casos lo primero será obtener un homogeneizado a partir de las células en donde se encuentre la proteína que se quiere aislar.

Cromatografía

Es el nombre que se le da a las técnicas que fraccionan componentes conforme pasan a través de una matriz porosa.

Las proteínas se disuelven en un solvente y se hacen pasar por una matriz empacada en una columna, para que avancen con el solvente a través de la columna y se vayan adhiriendo a los sitios de unión de la ma-

triz porosa. Conforme las proteínas se unen a los sitios de la matriz, se va retrasando su avance en la columna y ocurre un retaso diferencial de acuerdo con la afinidad de la proteína por los componentes de la matriz. El avance del solvente va arrastrando las moléculas de menor afinidad, que son las que pueden recolectarse en las primeras fracciones que salen de la columna.

Algunas técnicas de cromatografía son la cromatografía por intercambio de iones, la cromatografía por filtración en gel y la cromatografía por afinidad.

Electroforesis

Son técnicas que dependen de la capacidad de las moléculas con carga para desplazarse cuando se colocan en un campo eléctrico. La más utilizada es la electroforesis en gel de poliacrilamida, en la cual las proteínas se mueven por acción de una corriente eléctrica que se aplica a través de un gel compuesto por una pequeña cantidad de acrilamida.

El movimiento de las proteínas a través del gel depende de su tamaño, forma y densidad de carga; cuanto mayor sea la densidad de carga, la proteína avanzará con más fuerza a través del gel y su velocidad de migración será más rápida.

Bibliografía

- Alberts B et al. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Omega, 2004.
- Karp G. Biología celular y molecular. México: McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Frayle B, Anadón R, Sáenz F. Biología celular. México: McGraw-Hill, 2003.

7

Mitocondrias y peroxisomas



Capítulo 7

Mitocondrias y peroxisomas

Ivonne Caballero Cruz

Objetivos temáticos

- Organización estructural de la mitocondria.
- Organización funcional de la mitocondria.
- División mitocondrial.
- Biogénesis y función de los peroxisomas.
- Respuesta celular al estrés oxidativo.

Introducción

La biología celular estudia la mitocondria, los peroxisomas y los radicales libres. Éstos son temas que el alumno de licenciatura debe aprender, y para ello requiere de conocimientos previos de bioquímica. La finalidad del presente capítulo es que el alumno se aproxime de forma integral a estos temas, que le serán de utilidad para comprender las cátedras de Inmunología, Fisiología, Farmacología y Clínica Veterinaria, entre otras.

Organización estructural de la mitocondria

Introducción al estudio de la mitocondria

El término mitocondria proviene del griego *mito* (hilo o hebra) y *chondros*, (grano, terrón, cartílago).

Las mitocondrias fueron observadas por primera vez, con microscopio óptico, en el siglo XIX. Su estudio se inició cuando se aislaron, en 1948.

La mitocondria es uno de los organelos membranosos más importantes de la célula. Se encuentra prácticamente en todos los organismos eucariontes, que incluyen a los animales, las plantas y los hongos. Los plastos, o cloroplastos, se presentan sólo en las plantas. La mitocondria, al igual que los cloroplastos, presenta una gran cantidad de membrana interna, sitio en el que se realizan diversos de procesos bioquímicos, entre los que se encuentra, de manera primordial, el transporte de electrones y la síntesis de ATP.

En su estructura, las mitocondrias son organelos móviles y plásticos de forma cilíndrica y alargada; sin embargo, estas formas pueden intercambiarse continuamente. Su diámetro es de 0.5-1.0 μm ; se comportan fusionándose entre ellas y separándose de nuevo. Son estructuras que se desplazan de manera continua asociadas a los microtúbulos.

La ubicación y forma intracelular de las mitocondrias, así como su número en las células, se han asociado al tipo celular en que se encuentran; tal es el caso de las células musculares del corazón, donde se observan en mayor número, al igual que en los flagelos de los espermatozoides. Éstas se encuentran en el citoplasma celular y representan hasta la quinta parte del volumen celular en células eucariontes y organismos pluricelulares.



En la mayoría de los estudios las mitocondrias se han aislado del tejido hepático, donde se han llegado a obtener entre mil y dos mil.

Origen de la mitocondria

En cuanto al origen de las mitocondrias se supone que, al igual que los cloroplastos, fueron endocitadas por organismos procariontes hace más de mil millones de años; esta hipótesis se conoce como la hipótesis del endosimbionte, y se fundamenta en que las células eucariontes se originaron en un medio anaerobio sin mitocondrias ni cloroplastos, y debido a los cambios de una atmósfera reductora a un medio con mayor presencia de oxígeno, se estableció una relación de simbiosis con bacterias que tenían desarrollado el sistema de fosforilación oxidativa. La relación entre estos organismos fue excepcionalmente estrecha, ya que gran parte de los genes que codifican las proteínas mitocondriales son de localización nuclear, es decir, que hay genes que provienen del organelo y se dirigen al ADN del núcleo. Actualmente el genoma de los organelos es muy estable, lo que indica que la transferencia genómica es un proceso evolutivo poco común.

La hipótesis anterior explica que algunos genes del núcleo codifican proteínas de las mitocondrias y éstas adquieren una secuencia señal, de tal manera que la proteína codificada pueda ser trasladada a la mitocondria después de su síntesis en el citosol. Por otro lado, algunas secuencias de ADN no codificantes del ADN nuclear, que aparentemente son de origen mitocondrial, al parecer se integraron en el genoma nuclear como ADN de desecho.

Se cree que las mitocondrias descienden de bacterias púrpuras fotosintéticas que previamente perdieron la capacidad de realizar fotosíntesis y que se quedaron sólo con una cadena respiratoria.

El aporte evolutivo que dan las mitocondrias a la célula radica en producir energía (ATP) por medio de la glucólisis aerobia, es decir, en presencia de oxígeno. El ingreso a la mitocondria de los productos derivados de la glucólisis permite obtener hasta quince veces más ATP que si sólo se utilizara la glucólisis citoplasmática.

El espacio que rodea la membrana mitocondrial interna puede presentar varias copias de los genomas mitocondriales. El número de copias en cada organelo dependerá del grado de fragmentación de la mitocondria; la replicación del ADN no se limita a la fase S del ciclo celular, sino que ocurre a lo largo de todo el ciclo celular aun fuera de la fase de división celular.

En las membranas internas de la mitocondria se encuentra una gran cantidad y variedad de proteínas que se embeben en la membrana, sitio en que se realiza el *acoplamiento quimiosmótico*, a través del cual la célula se abastece de energía. El término quimiosmótico describe la relación entre los procesos químicos de donde se generan enlaces de alta energía en forma de ATP y los mecanismos de transporte por *ósmosis* a través de la membrana celular.

En cuanto a las partes que componen la mitocondria, se encuentran constituidas por una *membrana externa* y una *membrana interna* altamente plegada, donde cada pliegue es llamado cresta, las cuales pueden ser diferentes en número, según la actividad y tipo celular. El espacio interno se conoce como *matriz mitocondrial*. La membrana interna es la que presenta el mayor número de proteínas que intervienen en procesos de oxidorreducción, transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Es en este organelo donde la célula obtiene la energía para crecer y multiplicarse. Aquí es donde se consume el oxígeno y se obtiene dióxido de carbono como producto final, proceso conocido como respiración celular.



Componentes de las membranas mitocondriales

Las marcadas diferencias entre la membrana externa y la membrana interna incluyen los siguientes puntos: la membrana externa contiene 60% de proteínas y 40% de lípidos, tiene un gran parecido a la membrana del *retículo endoplasmático* debido a que se compone de un poco de colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y escasa *cardiolipina*. En las proteínas, como ya lo indicamos, están incluidas las transportadoras de electrones, la enzima que oxida monoaminas a aldehídos (*monoaminoxidasa* o MAO, por sus siglas), las enzimas que intervienen en la degradación de los lípidos, tales como la *acil-CoA sintetasa* y *fosfolipasa A*, las enzimas que fosforilan a los nucleósidos, el complejo que inserta en la mitocondria proteínas sintetizadas en el citosol, múltiples copias de proteínas que constituyen a las *porinas* permeables a moléculas menores de 10 kDa, y la proteína bcl-2 que inhibe la *apoptosis*.

La membrana externa, por lo tanto, es permeable al agua, los iones y la sacarosa. La vida media de la membrana externa es de 5.2 días, al igual que la del *retículo endoplasmático*.

La membrana interna mitocondrial presenta 80% de proteínas y 20% de lípidos; es muy parecida a las membranas internas de los cloroplastos, carece de colesterol y contiene *fosfatidilglicerol* y *cardiolipina* en mayor abundancia que en la membrana externa, lo que la hace impermeable a los iones y a la sacarosa. En esta membrana se encuentra el complejo para la inserción de proteínas sintetizadas en el citosol o en la matriz, enzimas de oxidación de ácidos grasos (*hidroxibutirato deshidrogenasa*), transferasas (*carnitina* y *acil-carnitina*, ADP, Pi, aminoácidos o ácido pirúvico a la matriz mitocondrial), los componentes de la cadena transportadora de electrones y la enzima *ATP sintetasa*, que realiza la fosfolidación oxidativa. Su vida media es de 12.6 días.

El espacio entre la membrana interna y la membrana externa contiene la enzima *adenilato cinasa*, que fosforila el AMP en ADP a partir del ATP (*figura 1*).

Formas de la mitocondria

Algunas de las formas que más pueden encontrarse son (*figura 2*):

- granular
- bastoniforme
- filamentosas

Las ATP sintetetas de las mitocondrias

Son estructuras proteínicas de forma esférica que miden 8 nm de diámetro y alrededor de 4 nm de tallo. Primero se les denominó partículas elementales; posteriormente *ATPasa* de la *fosforilación oxidativa*; mas tarde, unidades proyectantes, y actualmente se les conoce como *ATP sintetasa* o partículas

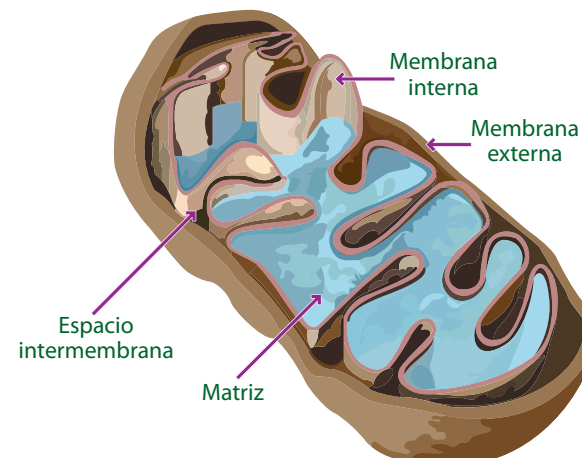


Figura 1. Estructura de la mitocondria.

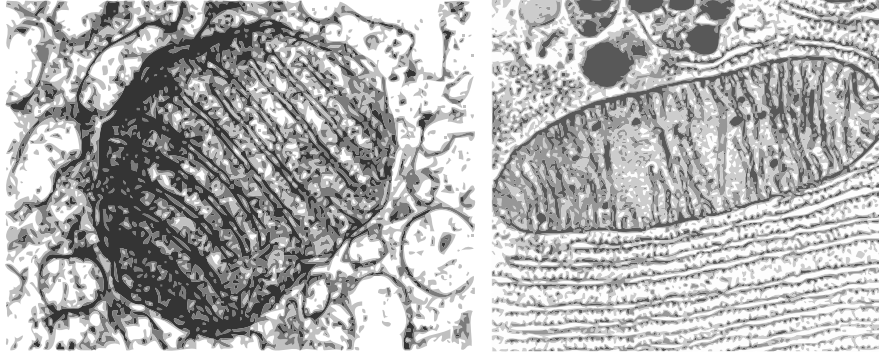


Figura 2. Variaciones en la morfología de las mitocondrias.

F. La parte esférica se llama partícula F1, y el tallo, partícula Fo (fracción F "o" no F "cero", porque es inhibido por la oligomicina). Estas unidades proyectantes constituyen 15% de la membrana interna. Están distribuidas en la superficie de la membrana interna, y su número varía entre diez mil y cien mil por mitocondria (figura 3).

Cloroplastos

A diferencia de las mitocondrias, los cloroplastos se encuentran en plantas y algas, pero no en animales y hongos. Los cloroplastos cuentan con dos membranas externas y, en su interior, con una serie de saculaciones que contienen clorofila, que es un pigmento de color verde. En los cloroplastos se realiza la *fotosíntesis*, proceso de captación de luz solar que interviene en la síntesis de moléculas carbonadas ricas en energía. Este proceso va acompañado de la producción de oxígeno, el cual será utilizado por las mitocondrias.

La *membrana externa mitocondrial* contiene proteínas llamadas *porinas*, que permiten el paso por difusión de moléculas de más de 10 kDa.

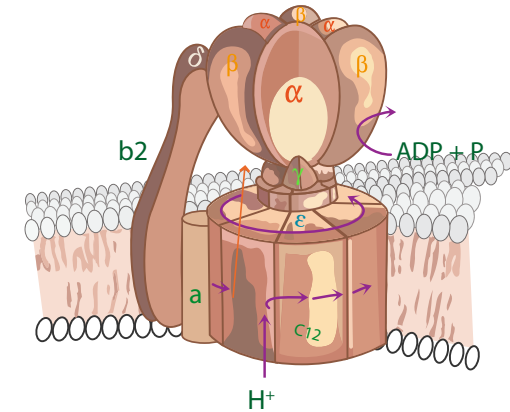


Figura 3. ATPasa mitocondrial.

En la membrana interna hay aproximadamente 75% de proteínas, con relación a su peso total. Esta membrana es permeable al O_2 , CO_2 y H_2O , elementos útiles en el transporte de ATP, ADP, piruvato, Ca^{+} y fosfato. Estos procesos estarán regulados y requerirán proteínas para realizar su transporte (figura 4).

La selectividad de esta membrana permite establecer los gradientes iónicos y formación de compartimentos entre el citoplasma y la matriz mitocondrial.

Entre las dos membranas mitocondriales queda un espacio llamado cámara externa o intermitocondrial; la cámara interna está limitada por la membrana mitocondrial interna, y ésta es la llamada matriz mitocondrial.

Entre los sistemas de transporte presentes en la membrana interna se encuentran:

- Mecanismos de transporte indirecto, también conocidos como *lanzaderas* para el NADH generado durante la glucólisis, y que se utilizarán durante la *cadena transportadora de electrones*.

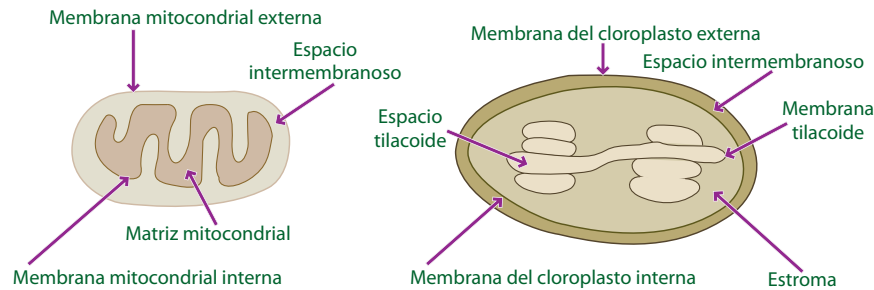


Figura 4. Comparación entre mitocondria y cloroplasto.

- Transportadores del oxaloacetato, y acetyl CoA, que son precursores de la glucosa y ácidos grasos.
- Transportadores de ATP de origen mitocondrial que saldrán al citosol, así como del ADP que ingresa a la mitocondria. Este transportador en realidad es un *antiportador* ATP-ADP.
- Un mecanismo de transporte para el Pi.
- Transportadores de calcio.
- Transportadores de electrones que intervienen en la fosforilación oxidativa, que a su vez generan el *gradiente electrónico de protones*.

La *matriz* o sitio acuoso del medio interno de la mitocondria se constituye aproximadamente por 50% de agua con características de gel, donde se encuentran diversas proteínas solubles con función enzimática, sustratos, iones inorgánicos y cofactores. Es aquí donde se encuentra el ADN, ARN y ribosomas que sintetizan proteínas que tendrán función interna o en otros sitios de la célula.

El ARN y el ADN mitocondriales se hibridan entre sí, pero no así con el ADN del núcleo, lo que muestra exclusividad mitocondrial.

Los ribosomas mitocondriales generalmente son menores que los del citoplasma. Los ribosomas presentan rasgos comunes con los de los procariontes y son inhibidos por el cloranfenicol y la N-formil-metionina. Los ribosomas de la mitocondria llegan a sintetizar proteínas integrales de la membrana interna, otras proteínas se importan del citoplasma.

ADN mitocondrial

El ADN está en doble hélice, en ausencia de histonas no forma cromosomas, y presenta 2.5 nm de espesor y 5-6 nm de longitud. Se presenta en forma circular, similar al ADN de algunas bacterias. En humanos presenta aproximadamente 16 569 pares de bases, cuenta con un par de secuencias reguladoras de ADN y es capaz de transcribir ARNr y ARNt.

En 1948 A. Lenhinger y E. Kennedy demostraron que la mitocondria contiene enzimas como la *piruvato deshidrogenada*, las de ciclo de Krebs (también llamada de los ácidos tricarboxílicos), las que intervienen en la oxidación de los ácidos grasos (durante la *betaoxidación*), y las que forman parte del transporte de electrones y la *fosforilación oxidativa*, ya antes mencionados.

Se cree que la mayoría de las mitocondrias, si no es que todas, se originan de otras ya existentes, antes de la división celular. En cuanto a su localización en la célula, se ha correlacionado con las estructuras del *retículo endoplasmático rugoso* debido a la necesidad de este último de recibir energía de la mitocondria y ésta, a su vez, recibirá las proteínas necesarias para su crecimiento y multiplicación.

En *oocitos* de varios animales se ha observado, durante las etapas de mayor actividad celular o crecimiento, que las mitocondrias se adhieren a la membrana nuclear, en donde se aprecia la salida de material que sirve como estímulo para una intensa multiplicación. De este material se des-



conoce la naturaleza química, aunque se presume que puede ser ARN, NAD, o bien, NADP^+ sintetizadas en el nucléolo, y que favorece la multiplicación mitocondrial.

En la célula se observa que aparecen en continuo movimiento.

La observación de las mitocondrias se realiza por medio de técnicas histológicas o ultraestructurales (microscopia electrónica) y para obtenerlas se utilizan procesos de ultracentrifugación.

Organización funcional de la mitocondria

Glucólisis y cadena respiratoria

Las funciones principales de la mitocondria incluyen la generación de energía mediante un proceso llamado *respiración aerobia*. El *piruvato* es el resultado del catabolismo de moléculas como la *glucosa*, que entra en la mitocondria y se integra al *ciclo de Krebs*, y esto dará como resultado la producción de dióxido de carbono y diez equivalentes reductores (diez átomos de hidrógeno), los cuales posteriormente se integrarán al interior de la mitocondria, adonde serán transportados a través de proteínas llamadas coenzimas. Todo el proceso recibe el nombre de *cadena transportadora de electrones*. En esta cadena se separan los electrones y protones de los diez hidrógenos; los diez protones viajan a lo largo de la cadena y finalmente son captados por el oxígeno para formar agua (*figura 5*).

Durante el transporte de electrones se libera energía, la cual se almacena en los componentes de la cadena transportadora de electrones, que bombearán a los protones desde la matriz hacia el espacio entre las membranas interna y externa, denominado cámara externa.

Los protones podrán regresar a la matriz por una vía compuesta de proteínas que se encuentran en la membrana mitocondrial interna,

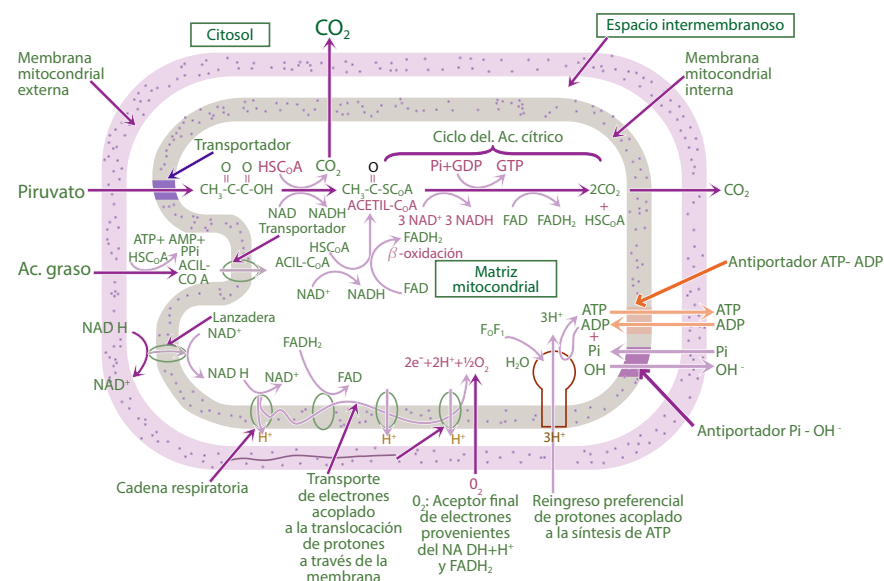


Figura 5. Esquema de los procesos metabólicos (Ciclo de Krebs, betaoxidación, descarboxilación oxidativa del piruvato, entre otras), proteínas transportadoras y cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

proceso denominado gradiente electroquímico de protones. El complejo proteínico permite a los protones volver a la matriz, lo cual acopla la reacción en que el fosfato se une al ADP para sintetizar ATP, en el proceso llamado *fosforilación oxidativa*.

El ATP será liberado al citoplasma, donde puede ser utilizado por todas las reacciones que requieran energía, dando como resultado ADP, que será nuevamente fosforilado en la mitocondria (*figura 6*).

La producción de ATP

Hay que recordar que tanto el $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ como el FADH_2 ceden electrones que son conducidos por la cadena transportadora de electrones, y que

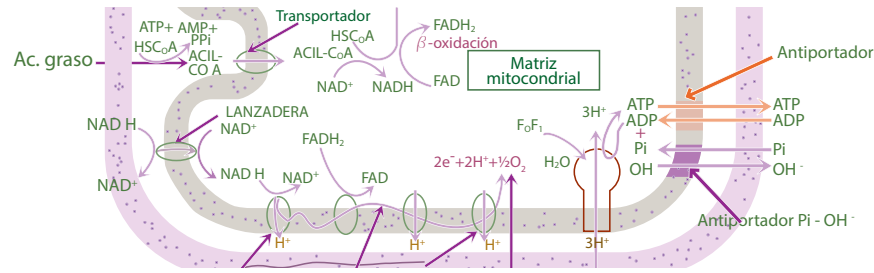


Figura 6. Cadena respiratoria y síntesis de ATP.

hay separación de los protones, hasta que los electrones son reunidos nuevamente con los protones y el oxígeno para formar agua como producto final.

Entre los numerosos componentes de la cadena transportadora de electrones se encuentran:

- flavoproteínas Fe-S
- ubiquinona
- cadena de citocromos

En este último componente se unen los electrones con los protones y el oxígeno, para formar agua, proceso que consume 90% del oxígeno generado por la célula. El resto del oxígeno origina algunas especies reactivas de oxígeno y radicales libres (figura 7).

Algunos inhibidores del transporte de electrones son (figura 8):

- La rotenona, que inhibe la unión de los electrones a la flavoproteína Fe-S.
- La antimicina A, que inhibe la función del complejo b-c₁.
- El cianuro y la azida, que bloquean el complejo citocromo oxidasa.

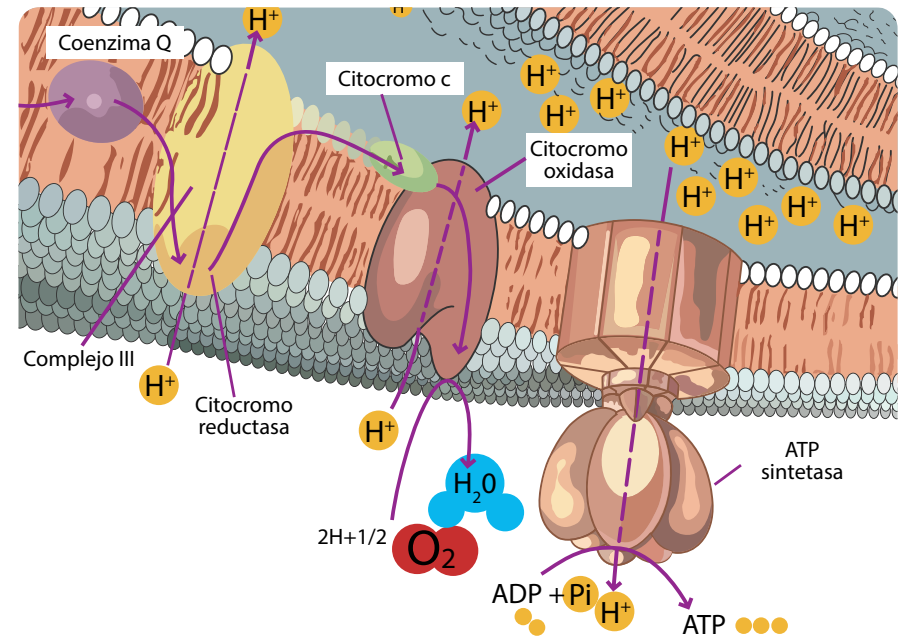


Figura 7. Funcionamiento de la cadena respiratoria y ATPasa.

La formación de ATP está acoplada a partir de ADP + Pi. A este proceso dependiente del transporte de electrones se le llama fosforilación oxidativa.

Teoría quimiosmótica de Mitchell (1961)

La transferencia de electrones bombea protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso de la mitocondria, que a su vez produce un gradiente de concentración y, debido a que la membrana interna de la mitocondria es impermeable a los protones, se genera también un gradiente eléctrico (-180 mV). Esto ocasiona que la energía obtenida de los procesos oxidativos se almacene en forma de un *gradiente electroquímico de protones*, que se utilizara en la fosforilación oxidativa y en otros proce-



so que requieren energía. La síntesis de ATP se realiza por la *ATP sintetasa* mitocondrial. A través de esta ATP sintetasa fluyen protones hacia la matriz mitocondrial a favor del gradiente electroquímico, y ese paso aporta energía a la reacción de $\text{ADP} + \text{P}_i$, para formar $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$, acumulándose así ATP en la matriz mitocondrial (figura 7).

Beta oxidación

La degradación de *ácidos grasos*, también llamada *betaoxidación*, comprende la degradación de estos compuestos que penetran a la mitocondria, donde serán degradados a *acil-CoA*, y los acetil-CoA que se generen dependerán del número de carbonos del ácido graso. Los acetil-CoA serán introducidos al ciclo de Krebs y los $\text{NADH}^+ + \text{H}^+ + \text{FADH}_2$ (también llamados equivalentes reductores), a la *cadena respiratoria*, para ceder sus protones y electrones, como ya de ha descrito. Los acetil-CoA, en el ciclo

de Krebs, favorecerán la producción de más $\text{NADH} + \text{H}$ y FADH_2 , los cuales se integrarán a la cadena respiratoria para la síntesis de energía, en forma de ATP.

Las mitocondrias participan con el retículo endoplasmático liso (REL) en la síntesis de hormonas esteroideas

Algunos tejidos como la corteza suprarrenal, las células de Leydig testiculares, las células de la granulosa, tecales y ováricas, intervienen, junto con el REL, en la síntesis de hormonas. El colesterol sintetizado en el REL es llevado a las mitocondrias, donde es transformado en pregnenolona y de ahí otra vez va al REL, para ser transformado en corticosteroides, que nuevamente serán transformados en aldosterona y colesterol (figura 9).

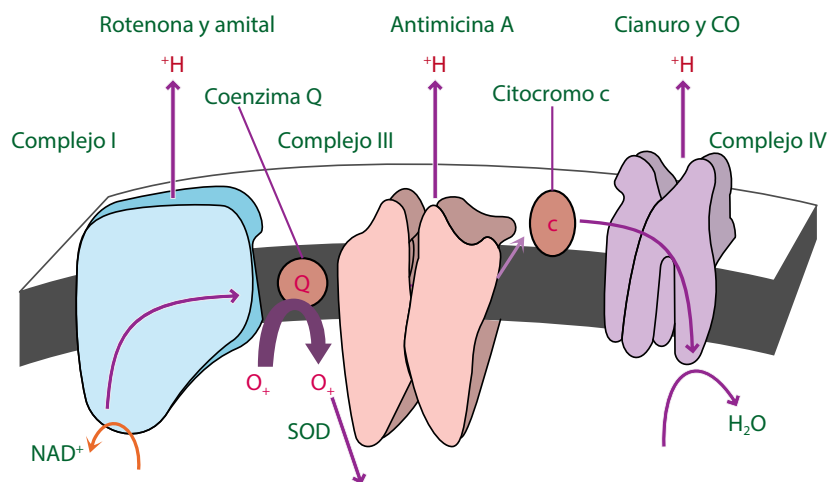


Figura 8. Inhibidores de la cadena respiratoria.

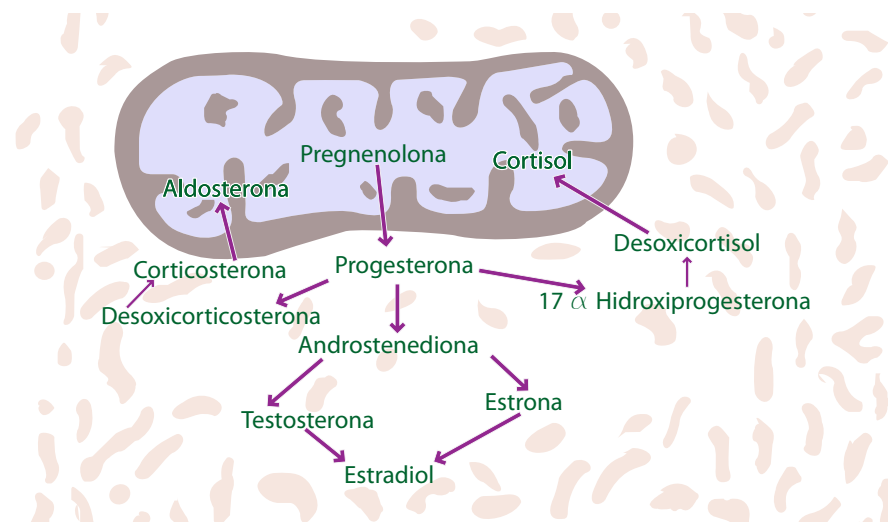


Figura 9. Relaciones funcionales entre el retículo endoplasmático liso y la mitocondria.



División mitocondrial

El promedio de vida de las mitocondrias es de diez horas; cuando éstas envejecen, serán reemplazadas por diferentes procesos. Sobre su reproducción se ha formulado la hipótesis de que las nuevas mitocondrias se generan de las ya existentes. En estudios donde se marcaron las moléculas presentes en las mitocondrias antes de la división, se observó que las moléculas marcadas aparecían en las nuevas generaciones en un porcentaje casi igual, lo cual confirma la hipótesis previa.

La reproducción mitocondrial puede ser por los mecanismos de bipartición, estrangulación y gemación.

La afirmación de que las mitocondrias establecieron una interacción con las células eucariontes anaerobias se apoya en los siguientes conocimientos:

- Los ribosomas mitocondriales son más similares a los ribosomas de células procariontes que a los del citoplasma de eucariontes.
- El cloranfenicol inhibe las proteínas de la mitocondria y de bacterias, pero no el de proteínas citoplasmáticas de las células eucariontes.
- Las membranas bacterianas presentan estructuras proteínicas similares a las de las mitocondrias
- La membrana interna de la mitocondria se parece más a las membranas de células procariontes y la membrana externa es similar a la del retículo endoplasmático.

Estudios relacionados con la mitocondria

Algunas investigaciones mencionan que las mitocondrias son indicadores de herencia materna, y que se pueden buscar los ancestros en organismos eucariontes. La explicación probable es que las mitocondrias se

dividen de forma independiente del núcleo. Las dos células originadas de la división recibirán cada una la mitad de las mitocondrias. Cuando el espermatozoide fecunda al óvulo, sus mitocondrias quedan fuera del huevo. El cigoto fecundado hereda sólo las mitocondrias de la madre, lo que permite diferenciar la herencia materna y obtener un estudio genealógico familiar, en virtud de la ausencia de la recombinación de genes que se lleva a cabo entre el material genético del padre y la madre.

Gracias al estudio del ADNmt (ADN mitocondrial), se cree que la humanidad descende de una mujer que vivió en África entre 14 000 y 290 000 años atrás; este fue el resultado de una investigación en varios grupos étnicos, que arrojó como resultado que el ADNmt africano ocupa la rama más larga y antigua, de la que se originaron los otros grupos étnicos. Aunque se supone que existieron otras mujeres en la misma época, su herencia se extinguió y sólo permaneció la de la mujer africana. Esto se explica por el hecho de que en una familia no se procreen hijas.

El estudio de las mitocondrias también es útil en la medicina forense, donde recientemente se ha descubierto en cadáveres o restos de individuos no identificados, su procedencia familiar, gracias al ADNmt de la madre, como es el caso de Alejandra de Rusia y sus hijos que han sido identificados por este procedimiento. Sobre este caso, el ADNmt del Zar Nicolás II no coincide con el de su esposa y sus hijos.

Estudios recientes indican que hay enfermedades que son heredadas por defectos del ADNmt de la madre, tales como las alteraciones neuromusculares y la diabetes mellitus.

La mitocondria y el cáncer

Al parecer la producción de algunas moléculas mitocondriales intervienen en el desarrollo de procesos tumorales. Entre éstas se encuentra la



SDH (*succinato deshidrogenasa*), que estimula el desarrollo y crecimiento de los vasos sanguíneos.

Esto se debe a que el gen de la SDH está dañado y hay concentración del producto metabólico, llamado ácido succínico, que a su vez aumenta los niveles de la proteína llamada HIF-1; ésta se activa como resultado de crisis o alteraciones celulares, como lo es la ausencia de oxígeno. Esta condición estimula la proliferación de los vasos sanguíneos para abastecer la llegada de oxígeno a las células.

Los estudios indican que los valores altos de ácido succínico, como resultado de mutaciones de la SDH, aumentarán la proteína HIF-1, que interfiere con su degradación y estimula el crecimiento de vasos sanguíneos que alimentan al tumor y diseminan el cáncer. La alteración de la SDH, al parecer, predispone a una persona a padecer cáncer de riñón, glándulas suprarrenales y tiroides.

Las mitocondrias también se han asociado a cáncer de estómago e intestino, como lo propone el Dr. Lesley Walter, director de información sobre el cáncer, en el Cancer Research Center de Reino Unido.

Estos hallazgos hacen del estudio de la mitocondria un medio que ayuda a explicar los procesos de enfermedad, o bien, al desarrollo de productos para el tratamiento del cáncer.

Sobre la apoptosis

Las mitocondrias participan de manera fundamental en los procesos de muerte celular a través de una serie de procesos que están bien definidos. Algunos de éstos son: liberación de *citocromo c*, que actúa liberando *caspasas*; cambio en el transporte de electrones; pérdida del potencial transmembranal mitocondrial; alteraciones del proceso de oxidorreducción, y participación de proteínas pro y antiapoptóticas Bcl-2, entre otras.

Recientemente se ha comenzado a relacionar la presencia de algunas enzimas, como las caspasas, con los procesos de muerte celular; sin embargo, la inhibición de las caspasas no siempre evita la muerte celular inducida por estímulos proapoptóticos. Algunos inhibidores de las caspasas bloquean ciertas formas apoptóticas inducidas por la privación de factores de crecimiento, como en el caso de la *radiación ultravioleta*, *staurosporina*, expresión forzada de *c-myc* o *glucocorticoides*, donde no se mantiene el potencial replicativo o clonogénico; las células mueren finalmente por inactivación de la actividad de las caspasas, por una muerte no apoptótica. Otras proteínas como la Bcl-2, Bcl-xL y la oncogénica Abl pueden mantener la supervivencia y la clonogenicidad en la fase de estos tratamientos. Otras proteínas como la Bax, presente en mamíferos e involucrada en la muerte celular, tiene como blanco la membrana mitocondrial, y la célula muere aunque las caspasas estén inactivadas. Esto hace suponer que las caspasas actúan por un mecanismo independiente para inducir la muerte celular.

Los mecanismos modificados en la mitocondria y que se consideran cruciales durante la muerte celular son:

- a) Interrupción del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP; este proceso es clasificado como indicador de muerte celular, por ejemplo, la irradiación g induce la apoptosis en timocitos y una interrupción en la cadena de electrones del paso de citocromo b-c1/citocromo c (cito C). La ceramida es un segundo mensajero que se involucra en el señalamiento apoptótico que interrumpe el transporte de electrones. Como consecuencia de la pérdida del transporte de electrones, hay una caída en la producción de ATP, la cual



ocurre en una fase tardía, debido a que el ATP parece ser utilizado en eventos posteriores de la apoptosis. Hay que aclarar que la ausencia de ATP mitocondrial puede matarla, pero no es un mecanismo de inducción apoptótica.

- b) Liberación de las proteínas que disparan la activación de las proteasas de la familia de las caspasas. Algunos sistemas de células libres mostraron que la inducción de activación de caspasas, cuando se añade desoxiadenosina trifosfato, depende de la presencia del citocromo c, liberado de las mitocondrias durante la preparación de extracto. En la apoptosis el citocromo c es liberado por las mitocondrias y es inhibido en presencia de Bcl-2 en estos organelos. El citocromo c forma una parte importante del apoptosoma en vertebrados, el cual está formado por el citocromo c, *Apaf-1* y *procaspasa-9*; esto da como resultado la activación de *caspasa-9*, que es luego procesada y activa otras caspasas para ejecutar los cambios bioquímicos celulares.

Las mitocondrias de algunas células contienen procaspasa-3, la cual se libera al citosol durante la apoptosis, a pesar de que no está claro si se activa antes de ser liberada. Otra proteína activadora de caspasas que es liberada por la mitocondria es el *factor inductor de apoptosis* (AIF), que al parecer procesa la procaspasa-3 *in vitro*.

- c) Alteración del potencial oxidorreducción (redox) celular: las mitocondrias son la principal fuente de producción del anión superóxido. Durante la transferencia de electrones al oxígeno molecular en la cadena respiratoria, se estima que entre 1 y 5% se pierde favoreciendo la formación de O_2^- . Todo factor que disminuye la eficiencia en el acoplamiento de la cadena transportadora de electrones aumenta la producción de superóxidos, lo

cual refleja mayor peroxidación de lípidos durante la apoptosis. Hay que aclarar que la generación de *especies reactivas de oxígeno* son un evento relativamente tardío, que ocurre cuando las células han iniciado un proceso de activación de caspasas.

Algunos otros escenarios que llevan a la apoptosis contemplan la apertura de un canal de conducción conocido como el poro PT. Algunos inhibidores de la apertura de los poros, como la *ciclosporina* y el *ácido bongkrékico*, parecen bloquear la apoptosis, reforzando la idea de que el PT es central en el proceso apoptótico. Otros estímulos que afectan el poro PT directamente son los oxidantes y el aumento patológico del calcio, lo cual induce la ruptura de la membrana mitocondrial externa y libera las proteínas activadoras de caspasas, por lo que en varios casos se propone que PT es el que dirige el proceso apoptótico.

Biogénesis y función de los peroxisomas

Los peroxisomas son organelos presentes en todas las células eucariontes. En su nucleolo cristalino se encuentran enzimas oxidativas como la *catalasa* y la *urato oxidasa* (figura 10).

Éstos se generan a partir de los ya existentes, mediante crecimiento del organelo y fisión, de forma similar a las mitocondrias; presentan cualidades muy particulares, ya que cuentan con una membrana especial y no tienen ADN ni ribosomas (figura 11).

Los peroxisomas fueron caracterizados por De Duve en 1960, y entre las funciones que desarrollan están:

- Catabolismo de ácidos grasos de cadena muy larga, de ácido pípecólico, de ácidos dicarboxílicos y del ácido titánico.
- Biosíntesis de plasmalógenos y de ácidos biliares.

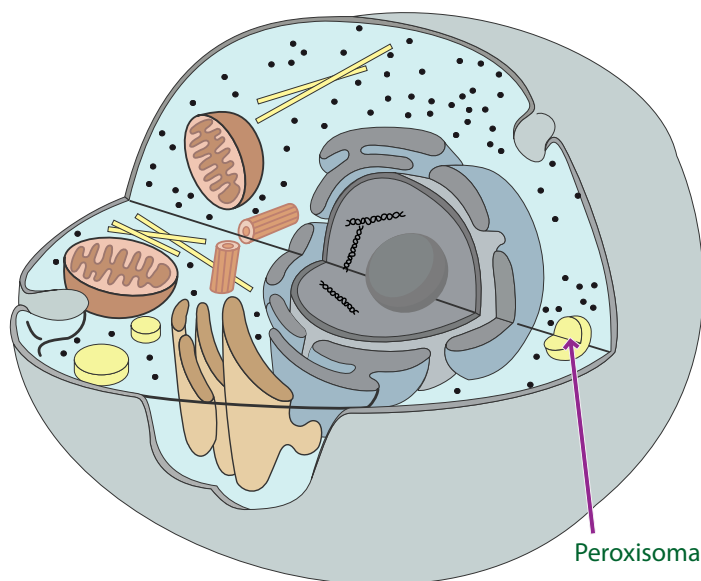


Figura 10. Localización de los peroxisomas.

El peroxisoma es un organelo celular que está presente en todos los tejidos, excepto en el eritrocito maduro. Es particularmente prominente en el riñón y en el hígado, donde puede ocupar de 1.5 a 2% del volumen celular parenquimatoso. En estos tejidos los peroxisomas aparecen en el microscopio electrónico como un organelo redondo u oval, con un diámetro de 500 nanómetros, en promedio.

Los peroxisomas cerebrales son más pequeños, con un diámetro de 140 nanómetros (nm), en promedio.

El análisis bioquímico muestra un contenido de *peroxidasa*, *catalasa*, *uratooxidasa* y *aminoacidooxidasa*, es decir, enzimas totalmente diferentes de las que se encuentran en los lisosomas. Se necesita una tinción especial para identificar las catalasas en los peroxisomas de las

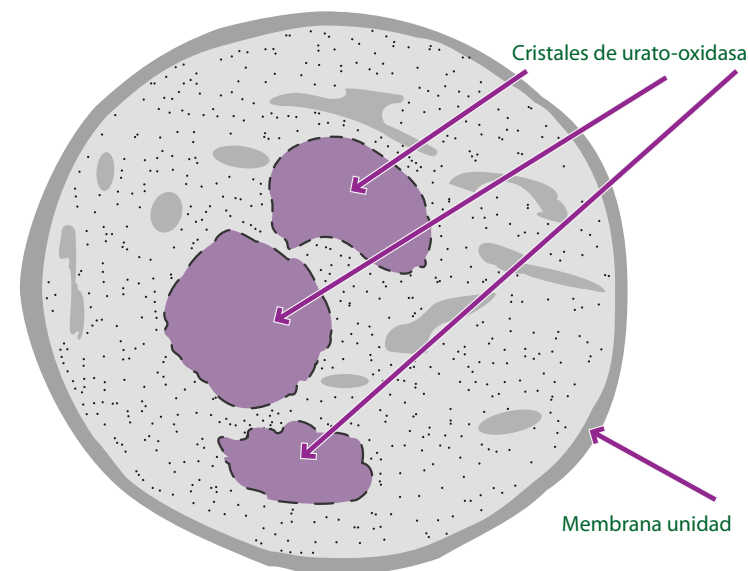


Figura 11. Estructura del peroxisoma.

neuronas cerebrales de los roedores, tanto del cerebro como del cerebelo, que contienen peroxisomas durante las primeras dos semanas posnatales; algunos están presentes en los cuerpos neuronales después de la tercera semana. Son prominentes en los oligodendrocitos durante el periodo de mielinización activa. Éste fue el último organelo subcelular descrito. Se identificó por primera vez en 1954, en el riñón del ratón, y como su función era desconocida, se le asignó el nombre de microcuerpo (*microbody*). El término de peroxisoma fue asignado a este organelo por De Duve y Baudhuin debido a su papel en la formación y oxidación del peróxido de hidrógeno. En 1976, Lazarow y De Duve mostraron que este organelo también desempeñaba una función en la oxidación de los ácidos grasos.



El **cuadro 1** resume algunas de las reacciones que se ha demostrado tienen lugar en el peroxisoma. Nótese que muchas de éstas afectan el metabolismo lipídico.

El sistema de betaoxidación peroxisomal de los ácidos grasos utiliza reacciones enzimáticas completamente distintas de las de la mitocondria. La oxidación peroxisomal de los ácidos grasos no está ligada a la producción de energía. La oxidación de los ácidos grasos no ramificados con una longitud de cadena de hasta 18 o 20 carbonos, son una fuente clave de

energía; se lleva a cabo tanto en la mitocondria como en el peroxisoma, y de 70 a 95% tiene lugar en la mitocondria.

El peroxisoma se usa exclusivamente para la oxidación de un conjunto distinto de ácidos grasos, como los ácidos grasos de cadena muy larga, con una longitud de cadena de 24 o más carbonos y, como se ha demostrado muy recientemente, ácidos grasos de cadena ramificada, como el ácido fitánico y pristánico.

Los peroxisomas también contienen una vía paralela para la biosíntesis del colesterol. Todavía no está clara su relación con la del retículo endoplasmático. Al menos 50 reacciones enzimáticas se han localizado en el peroxisoma, y el número continúa aumentando.

Es muy relevante clínicamente, ya que al menos 11 trastornos peroxisomales se deben al fallo de los mecanismos de importación. En estudios en humanos, animales y cobayos mutantes que presentan mecanismos de importación defectuosos, se han identificado 17 genes que desempeñan alguna función en estos procesos. Estos genes son ahora denominados *peroxinas*, PEX, y numerados del uno al 17, según el orden de la fecha de su descubrimiento. PEX 5 es el receptor para la SEP1, y PEX7 es el receptor para la SEP2. Los otros 15 están involucrados en la estabilización, transporte o procesos de anclaje, y están en investigación.

Se ha planteado que el ingreso de proteínas se obtiene de forma selectiva desde el citosol. Todas sus proteínas son de importación, debido a la carencia de genoma en su interior.

De manera similar a las mitocondrias, los peroxisomas utilizan el oxígeno, por lo que se cree que estos organelos son un vestigio de células antiguas, cuya función era esta misma; es decir, fueron antecesoras de las células eucariontes antiguas, por lo que la aparición de las mitocondrias parece ser posterior a la de los peroxisomas.

Cuadro 1.

Reacciones que tienen lugar en el peroxisoma

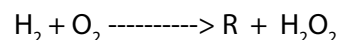
Reacciones catabólicas
Respiración celular basada en el peróxido de hidrógeno
Catabolismo de las poliaminas
Catabolismo de las purinas
Oxidación del etanol
Oxidación del ácido L-pipecólico*
Betaoxidación
Ácidos grasos de cadena de más de 8 carbonos
Ácidos grasos de cadena muy larga*
Ácidos dicarboxílicos de cadena larga
Prostaglandinas
Xenobióticos
Cadena lateral del colesterol
Alfaoxidación
Ácido fitánico*
Ácido pristánico*
Reacciones anabólicas
Biosíntesis de los plasmalógenos*
Biosíntesis del colesterol
Biosíntesis de los ácidos biliares*
Gluconeogénesis
Transaminación del glioxalato*

* Tiene lugar exclusivamente en el peroxisoma.



En los peroxisomas, a diferencia de las mitocondrias, no hay síntesis de energía en las reacciones.

Para las reacciones oxidativas, las moléculas de oxígeno que intervienen de manera importante son el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno. Las enzimas que intervienen utilizan el oxígeno para eliminar los átomos de hidrógeno, a partir de sustratos orgánicos, a través de una reacción que produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2).



La catalasa utilizará el peróxido generado para oxidar diferentes sustancias como fenoles, ácido fórmico, formaldehído y alcohol, mediante una reacción de peroxidación.

Sistema de desintoxicación celular

Los peroxisomas funcionan como un sistema de desintoxicación de diversas sustancias presentes en la circulación. Esta función es más significativa en células como el riñón y el hígado. En los peroxisomas, gran parte del alcohol es oxidado a acetaldehído.

La presencia de la *catalasa* y *peroxidasa* en los peroxisomas en el hígado tienen la finalidad de descomponer las moléculas de alcohol en sustancias que puedan ser eliminadas del organismo. Aproximadamente una cuarta parte del alcohol que entra en el hígado se procesa en los peroxisomas.

Oxidación de los ácidos grasos

En la degradación de los ácidos grasos, también llamada betaoxidación, se generan moléculas de dos carbonos y, convertidos en acetil CoA, serán exportados de aquí al citosol para la biosíntesis. Este proceso está presente de forma exclusiva en levaduras y vegetales, a diferencia de los mamíferos, donde las mitocondrias y los peroxisomas son funcionales.

Deficiencia en la función peroxisómica

Entre las funciones peroxisómicas está la formación de *plasmalógenos*, constituidos por fosfolípidos que se encuentran en forma abundante en la mielina, por lo que la ausencia de ésta en las células neuronales provoca alteraciones neurológicas importantes.

Influencia del medio

La función de los peroxisomas puede variar, dependiendo del sustrato con el que se encuentren en el medio. Un ejemplo de esto es que, en presencia de metanol, los peroxisomas de levaduras crecen y llegan a ser capaces de degradar ácidos grasos por medio de la betaoxidación.

Peroxisomas en plantas

Los peroxisomas que se encuentran en las hojas de las plantas pueden tener reacciones cruzadas, que toman el CO_2 para generar carbohidratos, por el proceso de *fotorrespiración*.

En las semillas en germinación, los peroxisomas toman los lípidos almacenados con el fin de formar monosacáridos para el crecimiento de la planta joven. En el proceso se desarrolla el *ciclo del glioxilato*; a estos peroxisomas se les llama *glioxisomas*. Esto no ocurre en los animales, ya que no pueden transformar lípidos en carbohidratos. En las plantas, para formar el ácido succínico que se transformará en glucosa, se necesitarán dos moléculas de acetil CoA.

La dirección de las proteínas hacia los peroxisomas

Se requieren tres aminoácidos en el extremo c (carboxilo terminal) de las proteínas, que actuarán como señales de importación. Otras proteínas peroxisómicas contienen una secuencia en el extremo amino-terminal que actúa como señal.



Si por alguna razón estas secuencias se unen al extremo de otras proteínas, éstas se dirigirán a los peroxisomas.

Se cree que más de 23 proteínas llamadas *peroxinas* tienen la función de dirigir hacia los peroxisomas a las proteínas con gasto de ATP.

Síndrome de Zellweger

En humanos un defecto en las proteínas de importación a los peroxisomas conduce a deficiencias graves. En estos sujetos hay un vacío peroxisómico que los lleva a anomalías en el cerebro, hígado y riñones. La muerte ocurre poco después del nacimiento.

La enfermedad se debe a una mutación en el gen que codifica una proteína integral llamada peroxina Pex2 de la membrana de los peroxisomas. Esta proteína está implicada en el transporte e importación membranar del peroxisoma.

En años recientes se ha caracterizado un grupo de enfermedades de origen genético derivadas del déficit en el número y actividad bioquímica de los peroxisomas.

Por otra parte, en experimentación animal se ha observado que ciertos fármacos (clofibrato, nafenopina, bezafibrato, ácido acetilsalicílico, etc.) inducen proliferación peroxisómica. El clofibrato fue introducido en 1962 como agente hipolipemiente y se observó que en ratas que ingerían esta droga proliferaba el número de peroxisomas. El mismo efecto se ha comprobado posteriormente con otros xenobióticos. Al haberse comprobado que algunos fármacos de uso común como analgésicos e hipolipemiantes se comportan como proliferadores peroxisómicos, se ha considerado que esta expansión del espacio peroxisómico puede ir asociada a la activación de las vías metabólicas que se asientan en este organelo.

Respuesta celular al estrés oxidativo

Radicales libres

En 1954 la doctora Rebeca Gerschman sugirió por primera vez que las especies reactivas de oxígeno eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades, para lo cual estableció los siguientes postulados:

1. Los radicales libres constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.
2. El desequilibrio entre oxidante y antioxidante genera los efectos tóxicos.
3. La producción de radicales libres es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Estos postulados siguen vigentes y son motivo de varias líneas de investigación.

En los años setenta los radicales libres dejaron de ser objeto de estudio exclusivo de químicos, físicos y biólogos, ya que los profesionales en investigación médica los tomaron como un área básica en la investigación de diversas enfermedades. Al mismo tiempo, la acción de los antioxidantes y su relación con los radicales libres se ha estudiado de forma paralela.

La importancia del estudio sobre radicales libres en procesos biológicos normales y patológicos son de mayor interés, ya que hasta hace poco tiempo la generación y acción de los radicales libres sólo se asociaban al daño celular. Actualmente se sabe que ejercen una influencia significativa en la activación y regulación de diversos procesos fisiológicos.

Los radicales libres (RL) se originan en átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, lo que los vuelve entidades extremadamente reactivas, ya que buscan



satisfacer tal desequilibrio sustrayendo o adicionando electrones a otros átomos o moléculas (*figura 2*), las que a su vez se pueden convertir en radicales libres; este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, es decir, a la propagación del fenómeno inicial.

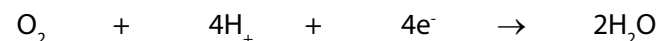
Los RL son entidades altamente reactivas y su vida es efímera, sólo el tiempo suficiente para interaccionar con los componentes celulares, tales como los lípidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos.

Los RL provienen de las reacciones del oxígeno, debido a que se encuentran ampliamente distribuidos en los seres vivos y son característicos de los sistemas aeróbicos. Se generan como producto normal del metabolismo celular, acciones que son detenidas por mecanismos enzimáticos y de captación o atrapamiento. Son componentes normales de la célula, y el aumento o la disminución de los radicales libres de oxígeno puede alterar diversas funciones. Innumerables enfermedades, como el cáncer y la aterosclerosis, se asocian al aumento de radicales libres que rebasan los mecanismos de protección antioxidante.

A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, es potencialmente tóxico y su utilización en los procesos metabólicos sólo es posible si los organismos cuentan con una gama de moléculas que los protejan de los derivados del oxígeno, llamados radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($-OH$) y singulete de oxígeno ($^1O_2$)

El oxígeno molecular (O_2) es un birradical con dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro paralelo, pero el oxígeno sólo puede aceptar electrones de uno en uno en una reacción univalente. El organismo maneja este oxígeno reduciéndolo y formando

agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción:



En condiciones normales quedan unidos los intermediarios (electrones, hidrogeniones, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) del oxígeno al sitio activo de la citocromo oxidasa, y no se difunden al resto de la célula. Cuando el oxígeno es reducido parcialmente, se generan las especies reactivas de oxígeno siguientes:

- anión superóxido (O_2^-)
- peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- radical hidroxilo ($-OH$)
- singulete de oxígeno ($^1O_2$)

El *peróxido de hidrógeno* no es un radical libre en sí mismo, pero debido a su capacidad de generar radicales hidroxilo se ha incorporado a la lista.

Origen de los radicales libres

En la atmósfera primitiva el medio reductor que existía fue modificado por la presencia de organismos que empezaron a tomar la energía proveniente de la descomposición del agua en oxígeno e hidrógeno. El cambio ocurrido permitió la aparición de organismos aerobios, los que crearon mecanismos antioxidantes para protegerse de la toxicidad de las especies de oxígeno parcialmente reducidas.

Estas especies químicas que se originaron son llamadas *especies reactivas de oxígeno*, *oxirradicales* o *intermediarios de la reducción parcial del oxígeno*. Se generan de la reducción parcial del oxígeno por medio de



una transferencia monoelectrónica o dielectrónica. Hay que aclarar que el peróxido no es propiamente un radical libre, ya que no tiene ningún electrón desapareado, pero puede generarlos.

De todas las especies, sin duda la más dañina es el *radical hidroxilo* (que no debe confundirse con el ion hidroxilo). Su alta toxicidad se debe a que posee una vida muy corta (10^{-9} segundos) y una alta reactividad que le permite interactuar con todo tipo de biomoléculas. El resultado sobre los lípidos es la lipoperoxidación de los lípidos de la membrana; en proteínas puede causar la inactivación sobre su acción enzimática; en el ADN puede causar mutaciones y, en los glúcidos, alteración de los receptores celulares.

Las sustancias oxidantes se pueden generar de forma endógena o exógena.

Endógena

Electrones que escapan de la cadena transportadora de electrones, peroxisomas y microsomas (citocromo P450, y citocromo b5); citoplasmáticas: *xantina oxidasa*, *catecolaminas*, *riboflavina* y enzimas de la fagocitosis: *mieloperoxidasa* y la *NADH-oxidasa*.

En la cadena transportadora de electrones, los electrones pueden escapar cuando la *ubiquinona* y algunos complejos ferrosulfurados se oxidan en presencia de *antimicina A*, generando así el superóxido. En los peroxisomas, las flavino-oxidases generan peróxido de hidrógeno que al escapar originan el radical hidroxilo. En los microsomas puede haber alguna fuga de electrones cuando la oxidación del sustrato no se acopla bien en presencia tanto de sustratos endógenos como exógenos. Durante la fagocitosis, si hay leucocitos se liberan sustancias como el superóxido, el peróxido de hidrógeno, los óxidos de nitrógeno e hipoclorito.

Exógena

Por presencia de xenobióticos (quinonas, benzopireno), humo de cigarro, componentes de la dieta (sales de hierro y cobre y compuestos fenólicos), las radiaciones y la hiperoxia.

Los xenobióticos pueden generar una gran cantidad de superóxido debido a su alta afinidad por captar electrones y transferir el electrón al oxígeno.

El humo del cigarro en ocasiones genera una gran cantidad de óxido de nitrógeno, que oxida biomoléculas y agota las reservas de antioxidantes. Las sales de cobre y de hierro aumentan la producción de oxirradicales, por la reacción de Fenton y los compuestos fenólicos de plantas.

La principal fuente de especies reactivas de oxígeno es la mitocondria a nivel de la cadena transportadora de electrones, sitio que participa en la generación del gradiente electroquímico, necesario para producir energía en forma de adenosina trifosfato (ATP).

En el proceso, el oxígeno capta cuatro electrones con producción de dos moléculas de agua. La importancia de dicho proceso radica en captar más de 95% de los electrones captados por el oxígeno.

Los radicales de oxígeno son capaces de destruir bacterias e inactivar enzimas. También pueden interactuar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, alterando la estructura y la función de los componentes celulares.

Los antioxidantes

Un antioxidante es aquella sustancia que retrasa o previene la oxidación de un sustrato.

Un sustrato oxidable incluye biomoléculas: glúcidos, lípidos, proteínas y ADN.



Para los seres vivos, los antioxidantes se dividen en endógenos y exógenos, dependiendo del sitio de donde se obtienen; y en enzimáticos y no enzimáticos, dependiendo de su tipo de acción.

Los antioxidantes enzimáticos están presentes en el organismo de los seres vivos. En este grupo está la *superóxido dismutasa* (SOD), la *catalasa* (CAT), y la *glutación peroxidasa* (GPX).

La SOD existe en diferentes formas, dependiendo del ión que presente su centro catalítico, como zinc, cobre o manganeso.

La CAT es una enzima tetramérica que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y se localiza en peroxisomas de células eucariontes.

La GPX requiere del glutatión reducido (GSH) para eliminar el peróxido de hidrógeno. Hay dos tipos de ésta: una depende de selenio y otra no. En mamíferos existe la GPX citosólica y la mitocondrial. En este proceso se encuentra involucrada la *glutación reductasa* que ayuda a mantener la proporción de glutatión reducido (GSH) vs. glutatión oxidado (GSSG).

Los antioxidantes no enzimáticos se adquieren en la dieta a base de vegetales como frutas y verduras. Estos antioxidantes captan o atrapan un electrón por cada molécula, lo que los hace menos eficientes que los enzimáticos. Su acción es más evidente en concentraciones elevadas.

La *vitamina C* y el GSH son antioxidantes hidrosolubles, por lo cual su actividad es menos efectiva en presencia de sustancias lipídicas, además de llegar a actuar como prooxidantes al autooxidarse frente a los metales.

Los antioxidantes no enzimáticos de naturaleza lipídica o liposoluble son la *vitamina E* o *tocoferoles*, que evitan la acción de los *radicales hidroxilo*, durante la peroxidación lipídica. El *alfa-caroteno* protege contra el oxígeno en singulete (*cuadro 2*).

El aporte eficiente en la dieta de oligoelementos como zinc, selenio, magnesio y hierro debe ser considerado, ya que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes.

Importancia médica de los radicales libres

Existen varios procesos en los que los radicales libres participan como activadores o reguladores de procesos fisiológicos, mientras que en otros pueden generar lesiones o enfermedades.

Entre las enfermedades de mayor impacto por su frecuencia se encuentra el cáncer. Sobre esto se ha comprobado que las especies reactivas de oxígeno activan y promueven procarcinógenos en presencia de

Cuadro 2.
Clasificación de los antioxidantes

Antioxidantes exógenos	
Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singulete. Captura radicales hidroxilo. Captura anión superóxido. Neutraliza peróxido.
Vitamina C	Neutraliza al oxígeno singulete, captura radicales hidroxilo, aniones superóxido y regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Beta-caroteno	Neutraliza el oxígeno en singulete.
Flavonoides	
Licopeno	
Antioxidantes enzimáticos	
Superóxido dismutasa	Elimina anión superóxido.
Catalasa y glutatión peroxidasa	Previene la reducción del peróxido de hidrógeno que genera el radical hidroxilo.



una deficiente actividad antioxidante. Las enfermedades pulmonares, hepatitis, cardiovasculares, enfermedades inmunitarias, cataratas, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras, involucran el efecto de los radicales libres.

Niveles óptimos de antioxidantes

Entre los alimentos ricos en antioxidantes se encuentran:

Vitamina E	Vitamina C y carotenos	Beta-carotenos y vitamina C
Cacahuete	Pimientos rojos y verdes	Papa dulce cocida
Germen de trigo	Fresa	Papaya
Aceite vegetal	Naranja	Zanahoria
Aceituna	Brócoli	Espinaca
Margarina	Kiwi	Tomate
Espárrago	Jugo de tomate	Albaricoque
	Uva	Calabaza
	Sandía	
	Col de Bruselas	

Estos productos aportan antioxidantes y nutrientes como el *ácido fólico*, que se requiere para la síntesis del ADN, mientras que la deficiencia causa ruptura cromosómica y es factor de riesgo en los infartos al miocardio.

Los niveles de antioxidantes que se requieran dependerán de la actividad que el individuo realice, ya que prácticas como la de fumar hacen mayor el catabolismo de vitamina C, y debido a la pérdida de la placenta las mujeres también requieren de la suplementación de vitamina C después del parto.

Los niveles recomendados de antioxidantes son 50 UI de vitamina C, 30 UI de vitamina E, y 4 UI de beta-carotenos.

Estrés oxidativo

El estado en el que un organismo ve rebasada su defensa antioxidante por moléculas oxidantes es denominado *estrés oxidativo*; éste se relaciona con diversas enfermedades y procesos fisiológicos que incluyen el envejecimiento.

Durante el estrés oxidativo se manifiestan los efectos tóxicos de los radicales libres y se producen reacciones químicas que deterioran lípidos, proteínas, carbohidratos y el ADN en el interior de las células, lo cual puede desencadenar la muerte.

La condición de estrés oxidativo se ha asociado a la generación de las enfermedades antes mencionadas.

Algunos estudios han demostrado que la incidencia de ciertas enfermedades, como las cardiovasculares, disminuyen cuando hay un adecuado aporte de antioxidantes.

En un grupo de dos mil pacientes con enfermedad coronaria comprobada por angiografía se observó una reducción significativa del infarto agudo del miocardio cuando fue tratado con vitamina E a la dosis de 8000 UI/día contra el grupo placebo.

Otras acciones nocivas de los radicales libres son los cambios sobre el ADN, donde afectan la actividad de las ADN *polimerasas*, que son enzimas que reparan el ADN y aceleran su replicación (protoncogenes) o la frenan (genes supresores de tumores). El daño oxidativo acumulado desencadena en consecuencias carcinogénicas y mutaciones.

Algunos estudios correlacionan la reducción de las probabilidades de adquirir cáncer cuando se consumen antioxidantes como los beta-carotenos en procesos de cáncer o tumoraciones en boca, vías aéreas superiores, pulmón, tubo digestivo, próstata y aparato genital femenino.



Se cree que la aparición de cataratas es resultado del aumento de la oxidación de proteínas en el cristalino que se da con los años, al igual que la aparición de mácula senil.

Se ha propuesto la hipótesis de que la determinación de radicales libres y antioxidantes pronto serán un proceso de rutina que ayudará a ver el riesgo de salud de los individuos. Sobre este asunto aún falta desarrollar técnicas más sensibles y específicas de mayor acceso, además de tomar en cuenta que los radicales libres presentan una vida media efímera y que es la mayor limitante para su detección (cuadro 3).

Cuadro 3.

Medidores de estrés oxidativo o daño biomolecular

Biomolécula	Método
Lípido	Químico, luminiscencia MDA (malondialdehído) Dienos conjugados Peróxidos Pentano, etano
Proteína	Compuestos carbonilos Grupos sulfhidrilos Fragmentación de proteínas Actividad de enzimas Grupos aminos libres
ADN	Bases modificadas

Entre los más empleados está la determinación de malón di aldehído (MDA), que mide los productos que resultan de la alteración lipídica o lipoperoxidación. Estos son obtenidos con un bajo costo y mediante un procedimiento sencillo.

Algunos agentes y procesos que deben limitarse para evitar el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes son: agentes químicos como

los metales pesados, xenobióticos, humo de cigarro, radiaciones ultravioleta e hiperoxia, adriamicina, dietas hipercalóricas, bajo consumo de antioxidantes; enfermedades como la diabetes mellitus, inflamación, traumatismos, la isquemia y la reperusión de tejidos.

Prevención del estrés oxidativo

Epidemiológicamente se ha visto que el consumo de antioxidantes en la dieta o en forma de suplemento son benéficos para el individuo, mientras que otros reportes indican que cuando una dieta es adecuada el aporte extra o mayor no proporciona mayor beneficio, por lo que se recomienda no exceder su consumo. Se concluye que la alimentación es fundamental para proveer de antioxidantes a nuestro organismo, sobre todo en situaciones en que el sistema de defensas se ve deprimido.

Algunos de los factores que deben ser tomados en cuenta o pueden favorecer el estado general de antioxidantes son: realizar ejercicio, disminuir el tabaquismo y mejorar la dieta. Si esto se toma en cuenta, puede prevenirse de 40 a 70% de las muertes prematuras, un tercio de las incapacidades agudas, y dos tercios de las enfermedades crónicas.

Bibliografía

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter M. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Omega, 2004: 678-684.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D, Grinberg AD. Biologías celular y molecular. 2ª ed. Omega, 1993: 632- 660.
- Karp G. Biología celular y molecular. McGraw-Hill, 1996: 171-195.
- Laguna J, Piña E. Bioquímica. 5ª ed. México: El Manual Moderno, 2002.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Frayle B, Anadón R, Sáenz F. Biología celular. McGraw-Hill, 2003: 223-328.
- Rodríguez PJM, Méndez LJR, Trujillo LY. Radicales libres en biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit. 2001;(1): 36-44.

8

División y ciclo celular



Capítulo 8

División y ciclo celular

Santiago René Anzaldúa Arce

Luis David Zepeda Domínguez

Objetivos temáticos

- Ciclo celular.
- Diferenciación celular.
- División celular.

Introducción

En 1830, dos alemanes, el botánico Matthias Jakob Schleiden (1804-1881) y poco después el zoólogo Theodor Schwann (1810-1882) postularon la Teoría Celular, en donde la célula se constituía en la unidad morfológica y funcional de todos los seres vivos. Un poco más tarde, en 1858, el también alemán Rudolf Virchow (1821-1902) completó esta teoría formulando el célebre axioma “toda célula proviene en otra preexistente”, esto conduce indudablemente a un proceso celular fundamental que es la multiplicación celular.

En los organismos pluricelulares, las células mueren por diversas causas, entre ellas: desgaste, destrucción por envejecimiento o naturalmente, como parte de su ciclo de vida; de tal forma que el organismo, por medio de la división celular, debe reponer un gran número de éstas, a la misma velocidad en la que mueren, para mantener un equilibrio en las

poblaciones celulares y conservar la funcionalidad de los diversos tejidos y órganos, y de esta manera asegurar la subsistencia del individuo.

La división celular, junto con la diferenciación celular, permite que el huevo o cigoto dé origen a un individuo. En los organismos pluricelulares, a partir de que nacen, el crecimiento no es más que los procesos de proliferación celular controlada; en un animal adulto algunas células del cuerpo ya no se multiplican (como la mayoría de las neuronas, o las células musculares cardíacas, o musculares esqueléticas), mientras que otras lo hacen sólo ante determinadas circunstancias fisiológicas, como en el caso de las células musculares lisas del útero durante la gestación.

Por otro lado, existen tejidos que constantemente deben renovarse a lo largo de toda la vida, como las células sanguíneas o las células epiteliales de la piel o del intestino. La capacidad de regeneración de un órgano está supeditada, primero, a la posibilidad de multiplicación que tiene un grupo de células indiferenciadas (llamadas células troncales) para restaurar la pérdida celular y la funcionalidad de ese órgano en particular; y segundo, a la presencia de algunas estructuras que sirven como guía para la localización de las células (como es el caso de la membrana basal para las células epiteliales).



El estudio de la división celular resulta de gran trascendencia para comprender los procesos de envejecimiento, en los cuales hay una disminución notable de la capacidad de multiplicación celular. También es importante analizar los procesos patológicos en los que se pierde el control de la división celular, como ocurre en el cáncer. Así pues, los tumores se deben a una división celular que rebasa los mecanismos fisiológicos de control, lo cual puede ocasionar serios trastornos e incluso, en el caso del cáncer, culminar en la muerte del individuo.

Ciclo celular

El ciclo celular comprende una secuencia de procesos coordinados, que van desde el nacimiento de una célula a partir de otra, hasta su completa división para formar dos nuevas células hijas. En cada ciclo la célula debe primero duplicar fielmente su material genético y después repartirlo (o segregarlo) de manera simétrica en las dos células resultantes.

El ciclo celular se divide en dos grandes etapas: *a)* la interfase y *b)* la división celular (mitosis). La primera de ellas fue considerada erróneamente como una etapa de “reposo” por los microscopistas ópticos del siglo pasado, mientras que la segunda comprendía una serie de cambios espectaculares y en poco tiempo. En la actualidad sabemos que la interfase es la etapa de máxima actividad metabólica y de expresión génica; además, en ella se realiza la duplicación del material genético necesario para que durante la mitosis (o etapa de “M”) se reparta equitativamente en las células hijas.

Interfase

La interfase ha sido dividida en tres etapas, que son G₁, S y G₂; la “G” proviene de la palabra inglesa *gap* = intervalo, y la “S”, de la palabra inglesa

synthesis, porque en ella ocurre la síntesis o duplicación del material genético: el ADN; G₁ es la etapa postmitótica, y G₂ es la etapa premitótica.

En todo el ciclo celular existen dos fases muy claras y concretas que pueden distinguirse fácilmente: la fase de duplicación del ADN o fase de síntesis, o “S”, y la división celular, tanto del núcleo, la *mitosis*, como del citoplasma, la *citocinesis*; esta última fase de multiplicación celular se conoce como *fase M** (“M” de mitótica), por lo que las etapas intermedias, que indican una separación o lapso entre las etapas fácilmente identificables, son las que se conocen con la letra “G”. Así, entre el final de la fase M y el inicio de la fase S está G₁ (o etapa postmitótica), y por último, entre el final de la etapa de síntesis del ADN (S) y el inicio de la siguiente fase M, está la G₂ (o etapa premitótica).

En una célula animal en crecimiento, todo ciclo celular dura aproximadamente 24 horas, de las cuales 23 comprenden la interfase, y menos de una hora, la fase M.

Como se ha mencionado anteriormente, las células de un organismo no se multiplican por igual; algunas lo hacen de manera constante, otras de manera ocasional y otras, una vez que han completado su diferenciación, nunca más; por ello, para el grupo de células que se dividen sólo en ciertas circunstancias (como las células musculares lisas del útero durante la gestación) se sugirió establecer una etapa de suspensión específica del ciclo celular dentro de la interfase, la cual no era definitiva, ya que las células conservan la potencialidad de continuar el ciclo en un momento dado y dividirse, por lo que se le conoce como etapa quiescente o potencial, y se designó por G₀.

* Algunos autores consideran que la fase de M comprende tanto la mitosis como la citocinesis (ver Gerard Karp, 1998).



Existen, por otro lado, poblaciones que han perdido toda capacidad de multiplicación por mitosis (tal es el caso de las células musculares cardíacas y la mayoría de las neuronas del animal adulto); estas células se han considerado en un estado de G (sin subíndice) para indicar que en condiciones normales –es decir, no patológicas– no tienen potencialidad de multiplicación mitótica.

La acumulación de los materiales necesarios para la división celular se produce durante G_1 ; además, las células hijas provenientes de la mitosis son de la mitad del tamaño que la célula original, por lo que durante esta etapa dichas células aumentarán su volumen para adquirir una dimensión citoplasmática similar a la de las células que les dieron origen.

Los tiempos del ciclo celular son muy variables, incluso dentro de un mismo tejido, debido principalmente a las diferencias en la duración de G_1 . Las células que se dividen lentamente permanecen en G_1 durante días o años; en cambio, el tiempo necesario para que la célula pase desde el inicio de S hasta el final de la fase M es muy constante.

La etapa de S dura de diez a 12 horas, que corresponde aproximadamente a la mitad de la duración total del ciclo (figura 1).

Durante la fase S ocurre primero la duplicación de la eucromatina (cromatina dispersa) y posteriormente la de la heterocromatina (cromatina condensada); además se realiza la síntesis de diversas proteínas que tendrán una participación directa en el proceso, como las histonas, ubiquitina ligasas, la síntesis de cinasas de histonas, la síntesis de tubulina (que formará el huso mitótico), cohesinas y condensinas.

Sistema de control del ciclo celular

Los mecanismos básicos de control génico del ciclo celular son comunes en todas las células eucariontes. Entre los componentes clave del sistema

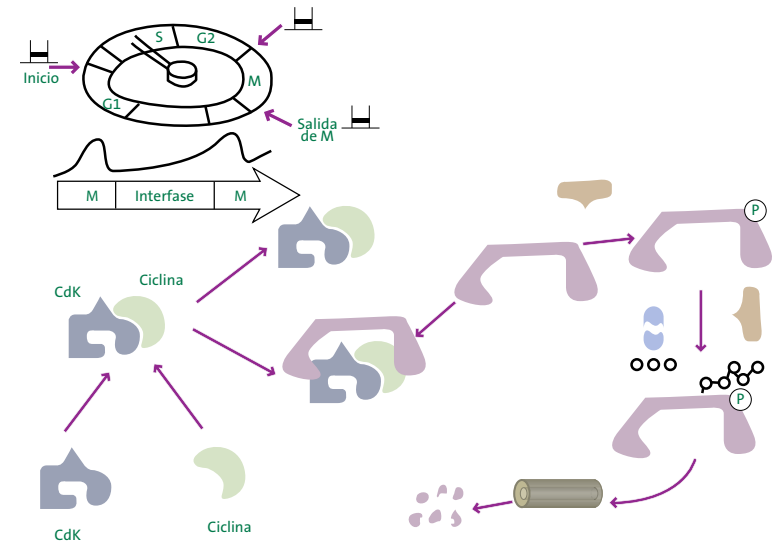


Figura 1. Puntos de control del ciclo celular y su regulación molecular.

regulador se encuentran las *proteincinasas* o *cinasas*, enzimas que activan o desactivan otras proteínas al agregarles grupos fosfato (fosforilación). El sistema de control del ciclo celular se basa en la formación de proteínas heterodiméricas a partir de dos grupos de familias proteínicas: la primera es la familia de las *cinasas* (proteincinasas) *dependientes de ciclinas* (Cdk), porque sólo se activan cuando forman complejos con proteínas reguladoras que constituyen el segundo grupo, que es la familia de las *ciclinas*, llamadas así porque sus concentraciones oscilan de manera predecible (o cíclica) a lo largo del ciclo celular. Las Cdk actúan como las porciones catalíticas del heterodímero, e inducen la fosforilación de un grupo selectivo de proteínas (en residuos de serinas y treoninas), mientras que las ciclinas actúan como las subunidades reguladoras del heterodímero; los procesos de ensamblaje, activación y desensamblaje de los complejos heterodiméricos



méricos de *Cdk-ciclinas* comprenden el mecanismo esencial que dirige y controla el ciclo celular. No basta con que las Cdk se unan a su respectiva ciclina, sino que además se requiere que la molécula de Cdk se encuentre en estado activo; esto se logra mediante la fosforilación de ciertas regiones (o dominios de la molécula) y simultáneamente la desfosforilación de otras regiones de la misma molécula; lo anterior conlleva el concepto de que existen fosforilaciones que activan la molécula y fosforilaciones que la inactivan; cada Cdk puede asociarse con diferentes ciclinas y esta asociación determina los sustratos proteínicos específicos que es capaz de fosforilar; cada complejo heterodimérico Cdk-ciclina varía a lo largo del ciclo celular y, por lo tanto, el grupo de proteínas susceptibles de ser fosforiladas. La fosforilación de estas proteínas es lo que determina los diversos procesos celulares característicos de cada una de las etapas del ciclo.

Los complejos Cdk-ciclinas se inactivan como consecuencia de la proteólisis regulada de las ciclinas, que llevan a cabo por lo menos dos complejos enzimáticos dependientes de *ubiquitina*. Estos complejos reconocen secuencias específicas de algunos aminoácidos de las moléculas de ciclina y le une numerosas moléculas de ubiquitina, marcando la proteína para su completa degradación en los *proteosomas*, que es un complejo proteínico presente en el citoplasma, en el que se degradan las proteínas marcadas con la ubiquitina. La transferencia de las moléculas de ubiquitina es catalizada por una de las dos enzimas *ubiquitinas ligasas* que existen: *a)* las que actúan en las fases G1 y S, llamado complejo SCF (por sus tres subunidades proteínicas principales) que destruye las ciclinas G1/S y ciertas *proteínas inhibidoras de Cdk (CKI)* que controlan el comienzo de la fase S, y *(b)* las que actúan sobre las ciclinas M llamado *complejo promotor de la anafase (APC)*.

Además de la regulación de las moléculas de Cdk, mediante fosforilación, y su unión a las ciclinas (que a su vez son reguladas mediante proteólisis), existen mecanismos de regulación transcripcional, ya que en la mayoría de las células los niveles de ciclina no únicamente se regulan mediante modificaciones en su degradación, sino también por variaciones en su transcripción y traducción.

Para que una célula pueda crecer y multiplicarse debe recibir de su entorno un conjunto de señales intercelulares que le indiquen que puede hacerlo; estas señales, que forman parte de la “vida social” de la célula, se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- Factores de proliferación o mitógenos, que favorecen la multiplicación o proliferación celular. En términos de la economía tisular, se llama hiperplasia.
- Factores de crecimiento, que permiten a la célula aumentar de volumen, lo que favorece la síntesis de proteínas e inhibe la degradación de las mismas. En términos de la economía celular, a este fenómeno se le llama hipertrofia. No debe confundirse el término crecimiento celular, que implica un aumento de volumen, con el de proliferación celular.
- Factores de supervivencia; estos factores son necesarios para que las células no desencadenen mecanismos intracelulares que las lleven a la apoptosis.

Todos los factores mencionados no son mutuamente excluyentes, ya que algunos pueden desarrollar funciones que actúan como mitógenos y factores de crecimiento de manera simultánea.

Los *factores de crecimiento* son proteínas extracelulares que indican a determinadas células cuándo crecer y dividirse; son activos a concen-



traciones extremadamente bajas y estimulan la mitosis en ciertas células animales. De la media centena de factores de crecimiento conocidos, algunos actúan sobre clases específicas de células, mientras que otros trabajan sobre una variedad más amplia. Por ejemplo, los efectos de la eritropoyetina se limitan a células que se convertirán en glóbulos rojos, en tanto que el factor de crecimiento epidérmico estimula la división de muchos tipos celulares. Además, ciertas hormonas de naturaleza esteroide pueden actuar como factores de crecimiento.

De manera contraria, algunos factores inhibiendo la proliferación celular, como es el caso de la miostatina, que impide la multiplicación de las células musculares; algunas razas de bovinos productores de carne, como la Belgian Blue, son producto de una mutación en el gen que codifica para esta proteína, que da como resultado una masa muscular enorme y desproporcionada en los animales.

Existen cuatro clases de ciclinas según la etapa del ciclo celular en las que actúan y se unen a la molécula de Cdk. En todos los organismos se requieren por lo menos tres de las cuatro clases; estas ciclinas son: G1/S, S y M. En la mayoría de las células existe una cuarta, que son las ciclinas G1.

Las ciclinas G1/S se unen a las Cdk y contribuyen a que la célula duplique el ADN, mientras que las ciclinas G1 ayudan a que la célula atraviese el punto de restricción al final de G1. Las ciclinas S son necesarias para iniciar la replicación del ADN y se unen a las Cdk durante la fase S. Las ciclinas M se unen a sus respectivos Cdk para estimular los procesos propios de la mitosis.

En levaduras, una sola molécula de Cdk se une a todas las distintas clases de ciclinas, por lo que esta molécula es la responsable de dirigir todos los eventos del ciclo celular. En los vertebrados existen cuatro mo-

léculas de Cdk, dos de las cuales se unen a las ciclinas G1, una a las ciclinas G1/S y con las ciclinas S, y la última con las ciclinas M (*figura 2*).

Puntos de control del ciclo celular

El ciclo celular tiene tres puntos de control:

1. Punto de control de G_1 .
2. Punto de control de G_2 .
3. Punto de control de la metafase.

El primer punto de control se ubica poco antes de terminar G_1 , y se conoce en las células de los vertebrados como *punto R* (o bien, *start* para el caso de las levaduras); el segundo punto se ubica entre la fase G_2 y la fase M, y el tercero y último durante la fase M, en particular en una subetapa conocida como metafase. Este último punto permite salir a la célula de mitosis para llegar a la siguiente G_1 ; algunos puntos están controlados por factores medioambientales (externos), entre ellos, las señales provenientes de otras células, como ya se ha mencionado, por lo que la inhibición o activación de la proliferación celular son procesos de control tisular, además de señales intracelulares que se discutirán con detalle más adelante. Las señales intracelulares intervienen de manera preponderante en G_1 .

Primer punto de control del ciclo celular (transición de G_1 a S)

Una de las mejores formas de estudiar el ciclo celular es mediante la utilización de cultivos celulares; la división celular en estas condiciones controladas permite retardar o incluso detener el ciclo, manipulando por diversas vías el medio de cultivo: ya sea que se limite el aporte de nutrientes, o se apliquen bajas concentraciones de compuestos inhibidores de la síntesis proteínica o se prive a las células de factores de crecimiento; en cualquier



caso, la célula se detiene en G_1 , lo cual implica que cuando la célula sale de esta etapa se ve obligada a completar en condiciones normales las demás etapas del ciclo (S, G_2 y M), por lo que se habla de un punto de no-retorno, conocido como *punto de restricción* (*punto de R* o *start* cuando se habla en este último caso exclusivamente de levaduras) que se ubica al final de G_1 , y una vez sobrepasado este punto las células normales duplicarán su ADN. Sin embargo existen células mutantes que pueden detenerse en otros puntos del ciclo celular, por ejemplo, en G_2 o M.

Cuando la célula ha traspasado el punto de R ha tomado la primera “decisión”, pero ¿qué factores o señales intracelulares o externas han influido para que esto ocurra?

Los factores de crecimiento provocan una cascada de reacciones citoplasmáticas que conducen a la activación (generalmente por fosforilación) de un grupo de enzimas que fosforilan; estas enzimas se llaman *quinasas* (o *quinazas*), y en conjunto se denominan *MAP quinasas* (siglas en inglés de *mitogen activated kinases*); estas quinasas migran al núcleo, donde fosforilan proteínas que controlan la expresión de un grupo de genes implicados en el crecimiento celular. La expresión de genes se presenta mediante la transcripción; para ello se requiere de la participación de las proteínas llamadas *activadores de la transcripción*, y la inhibición de otras llamadas *represores*; ambas moléculas se regulan a su vez por fosforilación.

Los genes que son inducidos por los factores de crecimiento se clasifican en dos grupos: *genes de respuesta temprana*, por ser genes que se inducen a los 15 minutos de la aplicación del factor de crecimiento y porque su inducción no requiere de la síntesis de proteínas; y *genes de respuesta tardía*, ya que se inducen por lo menos después de una hora del tratamiento y para ello se requiere de la síntesis proteínica. Al parecer,

los productos de los genes de respuesta temprana inducen a los genes de respuesta tardía; ninguno de estos genes son expresados cuando la célula se encuentra en G_0 .

Los genes de respuesta temprana más importante y mejor estudiados son los que se conocen como *myc*, *fos* y *jun*, los cuales son *protooncogenes*, que codifican proteínas reguladoras de la transcripción y de moléculas relacionadas con la proliferación celular, y todos ellos resultan necesarios para que la célula pueda llevar a cabo la duplicación del ADN. Los productos de los genes de respuesta temprana (como *myc*) son indispensables para la expresión de los genes de respuesta tardía; muchos de sus productos son componentes fundamentales del sistema de control del ciclo celular, como es el caso de las ciclinas y los llamados *genes cdc* (ciclo de división celular).

Además de los genes antes señalados, se expresan otros genes como ARN polimerasa, ADN polimerasa y ciclinas. La acumulación de estas proteínas son las que funcionalmente llevan a la célula a la etapa de S.

La inactivación de represores de la transcripción es muy importante en la transición G_1 -S. Uno de los represores más importantes es la *proteína del retinoblastoma (Rb)*; esta molécula está regulada por procesos de fosforilación. Un represor clásico de la transcripción se caracteriza porque al estar activado se asocia al ADN e impide el funcionamiento de la ARN polimerasa (molécula que se une al ADN y sintetiza el ARN del gen), de tal manera que no hay transcripción; sin embargo, el *Rb* no es un represor clásico pues actúa de manera distinta: cuando está activado bioquímicamente, se une a *factores de la transcripción* (*E2F* y *Drtf*), por lo que es un represor indirecto de la transcripción de genes necesarios para la duplicación del ADN, como por ejemplo C-fos y C-myc, así como el gen que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa (*Dhfr*). Por lo anterior, *Rb* es



considerado como un supresor tumoral, junto con otra proteína de gran relevancia llamada *p53*; de estas moléculas se tratará más adelante, cuando se hable de la relación que existe entre la división celular y el cáncer.

La activación de Cdk-S al final de G1 desencadena la duplicación del ADN; para el comienzo de la replicación se requiere la actividad de una segunda proteína cinasa que fosforila un grupo de proteínas homólogas, llamada complejo prerreplicativo (o pre-RC). Este complejo se ensambla durante G1, con lo que los orígenes de la replicación se activan.

Una vez concluida la replicación del ADN la célula pasa a G2, la cual contiene dos copias exactas de todo genoma organizado en unidades estructurales formadas por dos cromátidas hermanas unidas entre sí a todo lo largo, por medio de un complejo proteínico llamada complejo de cohesinas, las cuales se depositan durante la etapa de S a medida que ocurre la duplicación del ADN.

Segundo punto de control del ciclo celular: Punto de control de G₂ (transición de G₂ a M)

Después de la replicación del ADN, la célula se ubica en G2. En esta etapa cada cromosoma está formado por dos cromátidas unidas por un centrómero, denominadas *cromátidas hermanas*, ya que son muy similares pero no idénticas. El inicio de la mitosis se debe a la activación del complejo Cdk-M, que ocurre posteriormente a la finalización de la fase S.

La activación de la Cdk-M requiere de la acumulación de la ciclina M (o B en vertebrados); esta acumulación es el resultado del incremento de la transcripción del gen correspondiente.

La Cdk se encuentra activado gracias a las fosforilaciones activadoras producidas por la CAK; también presenta fosforilaciones inhibitorias que bloquean el sitio activo de la cinasa, las que son catalizadas por las cinasas Wee1. Los fosfatos inhibitorios serán eliminados gracias a una fosfatasa

llamada Cdc25, al finalizar G2. A su vez, la Cdc25 debe ser activada por reacciones de fosforilación catalizadas por dos enzimas: la cinasa Polo y una pequeña subpoblación de moléculas de Cdk-M que en ese momento se encuentren parcialmente activadas. Las moléculas de Cdk-M también son capaces de inhibir por fosforilación a su propio inhibidor (Wee1). De ésta forma, la activación inicial de algunas moléculas de Cdk-M redundan finalmente en la activación de su activador (Cdc25) y en la inhibición de su inhibidor (Wee1); con esto se pondrá en movimiento una gran cantidad de moléculas de Cdk-M durante la mitosis, lo cual desencadenará numerosos procesos propios de la mitosis, ocasionados por las reacciones de fosforilación sobre diversos sustratos (*figura 2*).

Cdk-M fosforila al siguiente grupo de proteínas: *a*) laminas nucleares, *b*) proteínas scaffold (del andamio) cromosómicas (se cree que pueda ser la topoisomerasa), *c*) MAP cinasas (cinasas de proteínas asociadas a microtúbulos que formarán el huso mitótico o acromático) y *d*) proteínas del complejo de condensinas que favorecen la condensación máxima de los cromosomas, con lo que se forman los cromosomas metafísicos (ya que son visibles con claridad durante la metafase), *e*) fosforilación de moléculas de caldesmina, lo cual favorece indirectamente la polimerización de microtúbulos del huso.

Tercer punto de control del ciclo celular (salida de la célula de metafase de mitosis)

Una vez que la célula entra en la fase M llegará invariablemente hasta la metafase, donde se ubica el tercer punto de control del ciclo celular; aquí, la totalidad de los cromosomas se encuentra alineada en el plano ecuatorial de la célula originado por el huso mitótico. El paso de la metafase a la anafase requiere de la separación de los cromosomas en sus dos mitades, llamadas cromátidas debido a la despolimerización de los microtúbulos

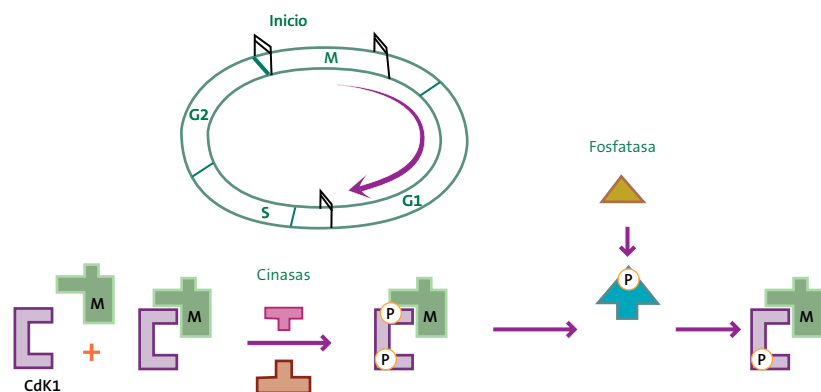


Figura 2. Fosforilaciones activadoras e inhibitoras de los complejos Cdk-M.

que unen a los cromosomas; aunque se desconoce con exactitud la señal intracelular que desencadena la separación de las cromátidas, se sabe que dicha separación depende de la rápida destrucción de las ciclinas G2 ciclinas M (ciclina A en levaduras y en mamíferos A y B), mediante la hidrólisis dirigida por un sistema de *ubiquitina* responsable de la proteólisis de las ciclinas M, llamado *complejo promotor de la anafase* (APC). La molécula blanco más importante del APC es la proteína *securina*, que se encuentra unida a otra llamada *separasa*; la unión inhibe la actividad proteasa de esta última. La degradación de la securina al final de la metafase libera la separasa, la cual puede romper una subunidad del complejo de *cohesinas*, con lo que las cromátidas hermanas se separan y se dirigen hacia los polos opuestos (lo cual se conoce como anafase A). Para que la APC desencadene la anafase, se requiere que sea activada por la proteína Cdc20 durante la mitosis; para que esto tenga lugar, es necesario un incremento en la transcripción del gen de Cdc20 en etapas previas de la mitosis; además, tiene que ocurrir la fosforilación del APC para que Cdc20 pueda unirse al propio APC y formar un complejo activo. Por ahora se desconocen las cinasas que fosforilan el

complejo APC-Cdc20, pero se sabe que dependen de la actividad de las moléculas de Cdk-M. También se sabe que existe un lapso, llamado *fase de retraso* entre la activación de Cdk-M y la activación del complejo APC-Cdc20; este retraso puede ser crucial para que la célula determine el momento idóneo para que se presente la anafase.

Diferenciación celular

En la mayoría de los organismos multicelulares, no todas las células son iguales. Por ejemplo, las células que forman la piel en los animales son diferentes de las células que componen los órganos internos. Sin embargo, todos los tipos celulares se derivan de una sola célula inicial o cigoto, procedente de la fecundación de un ovocito por un espermatozoide. La diferenciación es un mecanismo mediante el cual una célula no especializada se concentra en numerosos tipos celulares que forman el cuerpo, como los miocitos del tejido muscular, los hepatocitos o incluso las neuronas. Durante la diferenciación, ciertos genes son expresados, mientras que otros son reprimidos. Este proceso es intrínsecamente regulado gracias al material epigenético de las células. Así, la célula diferenciada se desarrollará en estructuras específicas y adquirirá determinadas funciones.

La diferenciación afecta numerosos aspectos de la fisiología de la célula, como el tamaño, la forma, la polaridad, la actividad metabólica, la sensibilidad a ciertas señales y la expresión de genes. Todas estas cualidades pueden ser modificadas durante la diferenciación.

Diferenciación de las células de los mamíferos

Las células de los mamíferos se han clasificado en tres categorías: las células de la línea germinal, las células somáticas y las células madre. Cada una de los cerca de cien billones de células del cuerpo humano posee



su propia copia del genoma, excepto ciertas células que han perdido su núcleo celular durante la diferenciación, como es el caso de los glóbulos rojos. La mayoría de las células que forman el cuerpo humano son diploides, es decir, que poseen dos copias de cada cromosoma. Estas células se llaman células somáticas.

Todas las células de la línea germinal están destinadas a la formación de gametos (óvulos y espermatozoides) y son las únicas capaces de transmitir su material genético a las generaciones siguientes. Las células madre tienen la capacidad de dividirse ilimitadamente y proporcionar células especializadas.

El estudio del *desarrollo*, el proceso por el cual las células se especializan y se estructuran en un organismo complejo, abarca algunos de los problemas más fascinantes y difíciles de la biología celular actual. Durante las muchas divisiones celulares requeridas para que una sola célula se desarrolle hasta formar un organismo multicelular, los grupos de células gradualmente se especializan en patrones específicos de actividad génica a través de un proceso denominado *determinación*. El paso final que conduce a la especialización celular es la *diferenciación*. Una célula diferenciada puede ser reconocida por su aspecto y actividades característicos.

El cuerpo de los mamíferos contiene más de 200 tipos celulares reconocidos; lo más notable de todo es el hecho de que las diferentes células provienen de un mismo óvulo fecundado.

Sorprende saber que cada tipo celular produce un conjunto altamente específico de proteínas. Una posible explicación a este hecho es que durante el desarrollo embrionario cada grupo celular pierde los genes que no necesita y conserva sólo cuantos requiere. Sin embargo, al parecer esto no es cierto. Según el concepto de *equivalencia nuclear*, los núcleos de todas las células adultas diferenciadas de un individuo son genéticamente idénti-

cos (aunque no desde el punto de vista metabólico) entre sí y al núcleo del óvulo fecundado del cual descienden. Esto significa que en realidad todas las células somáticas del adulto tienen los mismos genes, pero distintas células expresan distintos subconjuntos de estos genes.

Puede considerarse la diferenciación como una serie de vías o rutas que van de una sola célula original (el huevo o cigoto) a todas las células del cuerpo en cada uno de los tejidos especializados, dispuestas en un patrón apropiado. En ocasiones una sola célula hace “compromisos” genéticos sobre la vía de desarrollo que seguirán sus descendientes. Estos compromisos poco a poco restringen el desarrollo de las células descendientes a un conjunto limitado de tejidos finales. Así, la determinación es la fijación progresiva del destino de los descendientes de una célula.

Como el desarrollo de una célula se determina a lo largo de una vía de diferenciación específica, es posible que el aspecto físico de la célula no cambie en grado significativo. Sin embargo, cuando una fase dada de determinación se completa, los cambios en la célula suelen hacerse autoperepetuantes y no se revierten con facilidad. Por ello, la diferenciación suele ser la última fase en el proceso de desarrollo. En esta fase, una célula precursora se hace estructural y funcionalmente reconocible como célula ósea, por ejemplo, y su patrón de actividad génica es distinto al de una célula nerviosa.

El apoyo de la idea de la equivalencia nuclear proviene de casos en los cuales se ha observado que células diferenciadas o sus núcleos son capaces de desarrollarse normalmente. Se dice que tales células o núcleos son *totipotenciales* o *totipotentes*.

La *diferenciación celular* es el proceso por el que las células adquieren una forma y una función determinada durante el desarrollo embrionario en la vida de un organismo pluricelular, especializándose en un tipo celular. La morfología de las células cambia drásticamente durante la dife-



renciación, pero el material genético, o genoma, permanece inalterable, con algunas excepciones.

Una célula capaz de diferenciarse en varios tipos celulares se llama *pluripotente*. Estas células, en los animales, reciben el nombre de células madre. Una célula capaz de diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo y los anexos extraembrionarios se llama *totipotente*. En los mamíferos, sólo el cigoto y las células embrionarias jóvenes (blastómeros) son totipotentes.

La *citodiferenciación* o *diferenciación celular embrionaria* es la diferenciación en el transcurso del desarrollo.

El desarrollo comienza cuando un espermatozoide fecunda un óvulo y crea una sola célula que puede potencialmente formar un organismo entero. Durante la primera hora después de la fecundación, esta célula, *el huevo o cigoto*, se divide en varias células idénticas. En los mamíferos, alrededor de cuatro horas después de la fecundación y después de varios ciclos celulares estas células comienzan a especializarse y formar una esfera que crece llamada *blastocisto*. Esta esfera posee una capa de células externas (*trofoblasto*) y un grupo de células internas (*embrioblasto*). A partir del trofoblasto se desarrollará el *corion*, que es la porción fetal de la placenta, y a partir del embrioblasto se formará el embrión. No obstante, estas células, calificadas como *pluripotentes*, individualmente no pueden formar a un organismo entero; continuarán diferenciándose hasta formar las células madre que producirán las células de los tejidos bien definidos. Por ejemplo, las células madre de las células sanguíneas situadas en el tejido mieloide producen los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas, y las células madre de la piel formarán todos los tipos celulares que constituyen los tejidos dérmicos. Estas células madre más especializadas se llaman *multipotentes*.

La *citodiferenciación* implica que una célula o una línea celular logra un fenotipo estable. Al menos hasta el estadio de ocho células, los blastómeros conservan su potencialidad para desarrollar un organismo completo.

La multiplicación celular es un proceso concomitante con la diferenciación. Cuando las células logran su significado evolutivo final, puede suceder que se frene su multiplicación por largos periodos o en forma temporal, conservando la capacidad de reiniciar las mitosis (células musculares lisas); o bien, que mantengan siempre la capacidad mitótica en función (células de los epitelios de la piel, del intestino, las células precursoras de los componentes celulares de la sangre, etcétera).

La diferenciación celular en el desarrollo embrionario consiste, en el conjunto de procesos por los cuales, las células se van diversificando y especializando unas de otras, de manera tal que comienzan a ser reconocidas como distintas entre sí y de sus precursoras. Una célula “totalmente diferenciada” es aquella que reúne las características propias o específicas de los tipos celulares hallados en el organismo adulto, con lo cual ha alcanzado su significado evolutivo final. Considerando el desarrollo embrionario en su conjunto, la diferenciación celular es un proceso gradual y, por consiguiente, la diferenciación total de un tipo celular conlleva la existencia previa de tipos intermedios o células “parcialmente diferenciadas”. Por ejemplo, una célula mesenquimatosas es, comparada con un mioblasto, una célula parcialmente diferenciada. Y el mioblasto, con relación a un miocito, tiene también una diferenciación parcial. Por lo tanto, la calificación de totalmente diferenciada o parcialmente diferenciada, es relativa siempre a los tipos celulares que se comparan.

En términos generales se sostiene que cuanto más diferenciada está una célula, mayor especialización presenta. Esta frase debe ser también considerada en términos relativos. Así, el huevo o cigoto es una célula



indiferenciada en comparación con cualquier tipo de tejido adulto, pero altamente especializada.

Criterios de diferenciación celular

Para determinar el grado de diferenciación de una célula se utilizan diferentes criterios, cada uno de los cuales implica una metodología de análisis de distinta complejidad. Hay un criterio morfológico, basado en las observaciones macroscópicas o microscópicas de una célula o tejido para, a partir de identificar sus características y compararlas con otras, determinar su grado de diferenciación. Con el empleo de la microscopía electrónica puede mejorarse el análisis de las células, identificando estructuras subcelulares, con lo cual se hace más detallado el estudio. Otro criterio es el bioquímico, donde se analiza la presencia de proteínas específicas de un determinado grupo celular. Un tercer criterio es el fisiológico, empleado en aquellos tipos celulares que presentan, en estado adulto, funciones bien definidas, identificables en forma cuantitativa. El cuarto criterio utilizado es el evolutivo, que se aplica en sentido prospectivo (a futuro) y se basa en los conocimientos existentes sobre el desarrollo embrionario de los distintos grupos celulares; por ejemplo, ya comentamos que las células ectodérmicas ubicadas en proximidad con la notocorda darán origen al neuroectodermo, y que éste se diferenciará en tejido nervioso. La determinación del neuroectodermo para transformarse en células del sistema nervioso, permite considerarlo como un grupo celular parcialmente diferenciado en una etapa temprana del desarrollo y totalmente diferenciado al nacimiento.

Las células mesodérmicas se transforman en mesenquimatosas, con lo cual adquieren la capacidad de desplazarse hacia otras regiones del cuerpo. Las destinadas a ser tejido muscular, por ejemplo, se localizan en la pared corporal y toman una forma ahusada con núcleos ovoides,

que se denominan mioblastos mononucleados; éstos dejan de tener capacidad mitótica y se fusionan formando sincitios o células multinucleadas denominadas fibras musculares o miocitos. En los miocitos se produce la síntesis de actina y miosina. El aspecto ahusado y multinucleado es un signo de diferenciación morfológica del músculo esquelético y la detección de proteínas contráctiles, un signo bioquímico. La diferenciación celular es un proceso gradual y continuo.

Por razones de la limitación de los métodos de estudio y la necesidad de establecer parámetros, se habla de estadios de desarrollo en la formación de las estructuras embrionarias. Tales estadios son construcciones mentales, ya que en la realidad no hay límites en el proceso de diferenciación lo suficientemente claros como para establecer fronteras entre los momentos por los que atraviesa un tipo celular para dar origen a otro.

La diferenciación celular no es en todos los casos una característica permanente

Se conocen ejemplos de organismos en los cuales se produce una “*desdiferenciación*” de células totalmente diferenciadas y luego una “*rediferenciación*” de las mismas. Por ejemplo, en el proceso de regeneración de los miembros de algunos anfibios, se observa una desdiferenciación de las células musculares y cartilaginosas. Estas células adquieren propiedades mitóticas y dan lugar a los nuevos tejidos muscular y cartilaginoso del miembro en regeneración.

Citodiferenciación y genes

A pesar de la progresiva diferenciación que presentan las células conforme avanza el desarrollo, todas las células tienen, desde el punto de vista genético, la misma información. Dado que los genes actúan determinan-



do la síntesis de proteínas, es lógico suponer que muchos de ellos se inactivan (pero no desaparecen) a medida que la diferenciación tiene lugar.

Durante el proceso de diferenciación, las células van perdiendo la capacidad de expresar un diferente juego de genes, por lo que generalmente la diferenciación celular es irreversible. Sin embargo, dentro de cada tipo celular sigue existiendo flexibilidad para regular la expresión de ciertos genes, lo que permite que la célula produzca distintas proteínas en diferentes momentos de su ciclo de vida o en respuesta a señales provenientes del exterior (ver control de la regulación génica).

Control del proceso de diferenciación celular

La diferenciación celular implica que dos células distintas expresan diferentes juegos de genes. Conforme ocurre el desarrollo embrionario, las células del cuerpo comienzan a ser expuestas a diversas proteínas reguladoras, por lo que en distintas células comienza a activarse la transcripción de diferentes genes.

Muchos de los genes así activados codifican la síntesis de proteínas, que a su vez actúan como proteínas reguladoras para otros genes. Así, se inicia una cascada de procesos en los que la activación de un gen activa o reprime otros genes, lo que a su vez puede afectar la regulación de más genes, y así sucesivamente.

No todas las *proteínas reguladoras* se producen en la célula misma, algunas pueden ser generadas por células diferentes o estar en el entorno celular.

En otros casos, las sustancias no proteínicas presentes en el entorno celular o provenientes de otras células (por ejemplo, hormonas esteroideas) pueden modificar la función de las proteínas reguladoras. De esta manera, la posición de una determinada célula con respecto a las otras o al entor-

no celular particular la expone a una determinada combinación de proteínas reguladoras, por lo que la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario depende principalmente de la posición de cada célula con respecto a las demás (esto se conoce con el nombre de *valor posicional*).

Los individuos pluricelulares requieren mecanismos que les permitan controlar la expresión de sus genes, de tal forma que sus diferentes tipos celulares sean generados y mantenidos. En general, una vez que una célula se compromete a diferenciarse hacia un determinado tipo celular, su elección se mantiene durante muchas generaciones celulares, lo que significa que los cambios sufridos en cuanto a control de la expresión génica deben ser recordados. La *memoria celular* es indispensable para que se puedan crear tejidos organizados formados por tipos celulares estables.

Debido a que la expresión de un gen es controlada por una combinación de múltiples proteínas reguladoras, la capacidad de una célula para expresar un determinado juego de genes en cierto momento de su vida depende en gran parte de la historia de dicha célula, es decir, de la serie de proteínas reguladoras que han sido transcritas anteriormente, o incorporadas desde el entorno celular o activadas.

Es común que una sola proteína active un número elevado de genes característicos de determinado tipo celular. Por ejemplo, la proteína *miogenina* activa la transcripción de todos los genes requeridos para que los fibroblastos se transformen en una célula de músculo estriado. Sin embargo, para lograrlo, la miogenina tiene que combinarse con una serie de proteínas reguladoras que fueron acumuladas por el fibroblasto a lo largo de su historia de diferenciación, por lo que no puede provocar la transformación en célula muscular de células con una historia radicalmente diferente, como lo sería una célula hepática.



Por otra parte, muchas proteínas reguladoras establecen ciclos de retroalimentación positiva, ya que, además de afectar la transcripción de otros genes, se convierten en factores activadores de la expresión de su propio gen y en represoras de la expresión de genes competidores. De esta manera, en muchas ocasiones, una vez que un gen comienza a expresarse es difícil que deje de hacerlo, lo cual constituye una memoria celular que fija a la célula en un determinado tipo celular.

La característica de *control combinatorio* depende del conjunto de las proteínas reguladoras, con la capacidad de muchas de éstas para autoestimular su propia síntesis, significa que durante la historia de una célula se pueden ir acumulando los cambios que la comprometan a diferenciarse en una determinada dirección, proceso conocido como *determinación celular*.

Esta célula que aún no se ha diferenciado, ha adquirido una serie de proteínas reguladoras para evitar la expresión de los juegos de genes que la podrían llevar hacia otras direcciones. Al mismo tiempo, dicha célula a veces requiere solamente la presencia de una proteína reguladora extra para que se produzca la combinación necesaria para iniciar una avalancha de transcripciones, a partir de la cual producirá las proteínas que la van a diferenciar hacia un nuevo tipo celular.

La retroalimentación positiva garantiza que el nuevo tipo celular sea estable. Adicionalmente, los genes que han sido inactivados son por lo general metilados. La metilación de los residuos de citosina dificulta el ensamblaje del mecanismo de transcripción, por lo que la metilación es un mecanismo para asegurar que un gen que se ha inactivado continúe en ese estado.

Desdiferenciación

Hay que remarcar que a medida que las células se diferencian, el número de tipos celulares que son capaces de producir disminuye; a este fenómeno

no se le llama “*especialización*”. Mientras exista la especialización existirá en cierta medida el fenómeno de *desdiferenciación*, en el que las células relativamente especializadas pueden volver a ser menos especializadas. Este tipo de mecanismo está limitado durante la diferenciación por el material epigenético que lo modifica irreversiblemente. En los animales este proceso es raro pero puede darse, por ejemplo, en la cola del tritón, que después de ser cortada las células del muñón se desdiferencian de manera que pueden restablecer todos los tejidos de la cola.

Diferenciación celular y cáncer

Una célula neoplásica indiferenciada es una célula más primitiva que las del tejido del cual proviene y, por ende, tiene mayor capacidad mitótica. De ahí el concepto de que una célula neoplásica más diferenciada es aquella más parecida en sus funciones a una célula normal del tejido del cual proviene, y una célula poco diferenciada es aquella célula menos diferenciada del tejido original y menos especializada.

División celular

Mitosis

La *mitosis* es el mecanismo por el cual las células eucariontes dividen equitativamente sus cromosomas, de tal forma que las células hijas conservan un número característico y propio de la especie (número *diploide* o $2n$ de cromosomas).

El proceso mitótico fue conocido y descrito detalladamente desde hace muchos años; Walter Flemming, de la universidad alemana de Praga, distinguió sus diversas etapas mediante detalladas observaciones al microscopio fotónico hace más de un siglo (1880), y mucha de la nomenclatura utilizada por él aún se conserva.



Durante la mitosis se observan los siguientes rasgos bioquímicos generales: disminución de la síntesis proteínica (hasta 75%), reducción de los niveles de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), fosforilación de las histonas (en particular las H1) durante la condensación cromosómica y detención de la síntesis del ARN.

Tradicionalmente la fase M se ha dividido en seis etapas: *profase*, *prometafase*, *metafase*, *anafase*, *telifase* y *citocinesis*; las primeras cinco constituyen la *cariocinesis* (o división del material genético), mientras que la última corresponde a la división del citoplasma (figura 3).

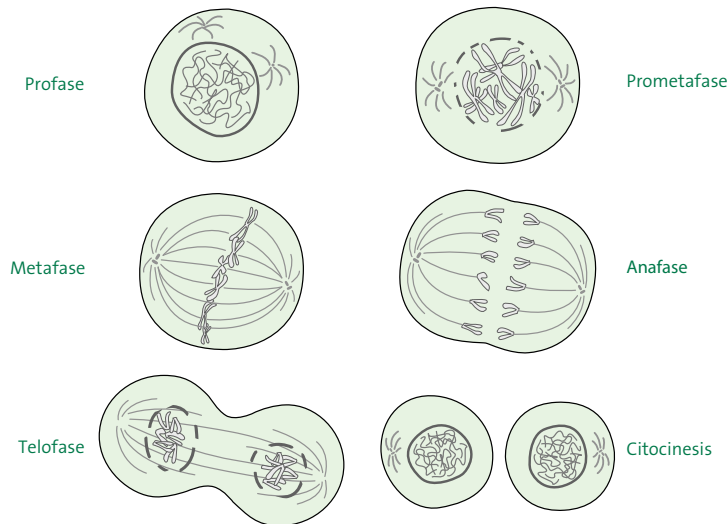


Figura 3. Fases de la mitosis.

Profase

La transición de la etapa de G_2 a la fase de profase es paulatina y poco nítida, si se observa con el microscopio fotónico.

Dentro de los principales eventos celulares de la profase están los siguientes:

- a) Los *microtúbulos* y los *microfilamentos* del citoesqueleto se desensamblan, desestabilizando la forma celular original, ya sea cilíndrica, cúbica y fusiforme, entre otras, adquiriendo una forma esférica característica de las células en división.

La despolimerización de los microtúbulos se debe a cambios en el *centro organizador de microtúbulos* (COMT) del centrosoma o centro celular. El COMT está constituido por un material amorfo llamado *matriz centrosómica* o *material pericentriolar*, que se observa como un material electrodensito y que está conformado por una gran variedad de proteínas, entre las que destaca el complejo en anillo de δ -tubulina, a partir del cual se generan microtúbulos; cuando este material rodea a los *centríolos* (en la matriz del centrosoma) a esta porción del citoplasma se le llama *centrosoma* o *centro celular*.

Se ha estudiado el *ciclo del centrosoma*, que se inicia con la duplicación del par de centríolos, que empieza desde G_1 , continúa con una etapa de transición en la fase S y termina en G_2 , cuando se completa la duplicación centriolar. En la profase, los dos pares de centríolos (y por ende el par de centrosomas) se van separando gradualmente y se dirigen a los extremos opuestos de la célula (sitios conocidos como polos celulares).

Cada COMT del par de centrosomas organiza un grupo de microtúbulos que parten en forma radial de éste, constituyendo los *ásteres* (por dar la apariencia de rayos luminosos de las estrellas) conforme se alejan paulatinamente hacia los polos; algunos



microtúbulos se alargan, y de esta manera se forman los denominados *microtúbulos astrales*.

- b) El aparato de Golgi y el retículo endoplasmático se vesiculizan; las vesículas no pueden distinguirse morfológicamente, sino únicamente con el microscopio electrónico (M.E.). En este proceso participa la *clatrina* (proteína que forma las vesículas cubiertas en procesos de tráfico de proteínas dentro de la célula).
- c) El tráfico general de membranas se detiene de tal forma que no se observa *pinocitosis*, *fagocitosis* ni *exocitosis*.
- d) Además, durante la profase se detiene la síntesis de ARN y la síntesis proteínica disminuye hasta quedar en 25% de su nivel normal (interfásico).
- e) Durante la profase el *nucléolo* se disgrega: una parte de sus componentes se asocia a los cromosomas mitóticos y la otra parte de los componentes se dispersa en el citoplasma.
- f) Condensación paulatina de la cromatina a cromosomas. La condensación de los cromosomas se debe a un complejo proteínico llamado *complejo de condensinas*. Es sabido que los *cromosomas* sólo son observables durante la división celular; sin embargo, cuando las células interfásicas son fusionadas con células en la fase M, se logra condensar prematuramente la cromatina. Estos estudios demuestran la existencia de una cromatina simple en G_1 , mientras que en G_2 los cromosomas están constituidos por dos cromátidas, llamadas *cromátidas hermanas*, que permanecen unidas a todo lo largo, por medio de las *cohesinas*; la presencia de las cromátidas hermanas comprueba la duplicación del ADN en la etapa intermedia (S), y también es una forma de confirmar, en las células en división, la existencia del factor cito-

plasmático responsable de provocar los cambios propios de las células mitóticas (el factor promotor de la mitosis o MPF, por sus siglas en inglés), a diferencia de las células en interfase (como son la fragmentación de la envoltura nuclear y la condensación cromosómica). Hay que destacar que estos estudios son tan sólo un artificio que permite observar el comportamiento de la cromatina en las células interfásicas; por esto, el término cromosoma sólo debe utilizarse para referirse a las células en división.

La condensación de la cromatina no se presenta hasta la metafase, por lo cual esta etapa se utiliza para estudios citogenéticos del *cariotipo*. Como resultado de la condensación de la cromatina se forma un número característico de cromosomas propios de la especie, que se denomina *número diploide* o $2n$. También la morfología de los pares cromosómicos es característica de cada especie; éstos son los datos que se estudian en el cariotipo.

La condensación de la cromatina es dirigida por la fosforilación de una serie de *quinasas de histonas*, que provocan a su vez la fosforilación de las histonas H3, así como la hiperfosforilación de las histonas H1 por las CDCK2 (como se ha comentado anteriormente).

El rasgo morfológico distintivo de la profase es la condensación de cromatina a cromosomas. Las condensinas constituyen los componentes principales en esta función; estas moléculas son fosforiladas por la Cdk-M para estimular la actividad de condensación del ADN, como ya fue descrito.

Prometáfase

La prometáfase puede dividirse en dos etapas principales:



- a) *Prometáfase temprana*: que consiste en la fragmentación de la envoltura nuclear, lo cual marca el final de la profase y el inicio abrupto de la prometáfase.
- b) *Prometáfase tardía*: consiste en la conexión e interacción de microtúbulos con el cinetocoro (una región específica de los cromosomas), que produce la orientación y la movilización de los cromosomas hasta situarlos en un solo plano (el plano ecuatorial o metafásico), esto último marca el fin de la prometáfase e inicio de la metafase.

Fragmentación de la envoltura nuclear (prometáfase temprana)

La envoltura nuclear permanece intacta en la interfase y profase, mientras que durante los procesos tempranos de la prometáfase se fragmenta y deja de observarse al microscopio óptico (M.O.).

En la célula interfásica las proteínas que constituyen la *lámina nuclear* se encuentran escasamente fosforiladas; ello implica que el proceso de fosforilación llevado a cabo por la Cdk-M conlleve cambios estructurales que provocan el desensamblaje de la lámina, lo que ocasiona la fragmentación de la envoltura nuclear en vesículas; sin embargo, las proteínas de la lámina se mantienen asociadas a los poros nucleares correspondientes. Estas vesículas no pueden distinguirse de los fragmentos del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, que también sufren fragmentación. Se ha propuesto que una de las tres proteínas de la lamina B permanezca adherida a los fragmentos vesiculares de la envoltura nuclear, mientras que las dos restantes permanezcan solubilizadas en el citoplasma. Durante la *telofase* ocurre un fenómeno inverso de *reensamblaje*, debido sobre todo a la inactivación de las Cdk-M y probablemente a procesos de desfosforilación (por *fosfatasa*s) de las laminas A, B y C, con lo que se organizan nue-

vamente los tres elementos estructurales de la envoltura al interactuar entre sí las tres proteínas estructurales de la lámina nuclear. En conjunto, esta sucesión de cambios se conoce como *ciclo de la envoltura nuclear*.

No en todos los organismos se requiere la fragmentación de la envoltura nuclear; en protozoarios y dinoflagelados la envoltura nuclear permanece intacta durante la división celular.

Se ha demostrado experimentalmente que la vesiculización de la envoltura nuclear, solubilización de la lámina nuclear y condensación de los cromosomas son procesos independientes y separados bioquímicamente.

En resumen, la fragmentación de la envoltura nuclear está dirigida por un proceso bioquímico de hiperfosforilación de las laminas A, B y C (laminas nucleares), gracias a la intervención del Cdk-M (MPF), que actúan como *laminas cinasas*. Esta actividad es sólo una parte de la cascada de fosforilación promovida por el MPF; asimismo, durante la *telofase* se reagrupan y reensamblan los elementos de la envoltura nuclear por la inactivación de la Cdk-M y por un fenómeno bioquímico inverso (desfosforilación) originado por una serie de *fosfatasa*s.

Inmediatamente después de la fragmentación de la envoltura nuclear, ocurre la interacción de los microtúbulos del huso mitótico con los cinetocoros de los cromosomas.

Interacción de los microtúbulos al cinetocoro (prometáfase tardía)

Estructura y función del cinetocoro

Los cromosomas están constituidos por las cromátidas hermanas, unidas por un *centrómero*; el sitio donde se encuentra el centrómero es variable, y ello permite clasificar a los cromosomas morfológicamente en: *cromosomas metacéntricos*, *submetacéntricos*, *acrocéntricos* y *telocéntricos*, según se encuentre el centrómero en la parte media, ligeramente desplazado



hacia alguno de los extremos, muy próximo a algunos de los extremos, o bien en el extremo, respectivamente.

Los centrómeros presentan a ambos lados estructuras especializadas, que vistas al microscopio electrónico (M.E.) están formadas por tres láminas superpuestas con diferentes grados de densidad electrónica: *a)* la lámina interna está en contacto con la cromatina, *b)* una lámina intermedia de densidad menor, y *c)* una lámina externa de material electrodens, sobre cuya superficie se observa una corona o collar de finos filamentos. Estas tres láminas en conjunto se conocen como *cinetocoro*; existen dos por cada cromosoma y representan el sitio específico donde los microtúbulos del huso mitótico se unen fuertemente para dirigir la migración de las cromátidas durante la anafase.

Estudios realizados con anticuerpos dirigidos contra el cinetocoro han permitido observar que la duplicación de los cinetocoros ocurre durante la etapa S en la interfase.

En la mayoría de los organismos, el cinetocoro está formado por un gran complejo de proteínas que se ensamblan en secuencias de ADN específicas, llamadas *secuencias centroméricas*. Los centrómeros de los mamíferos están constituidos por secuencias de ADN muy largas, muchas de ellas repetitivas, formando grandes cinetocoros a los cuales se llegan a unir 30 o 40 microtúbulos, insertados en cada una de las cromátidas hermanas; estas secuencias repetidas se conocen como ADN satélite. Los microtúbulos que se unen a los cinetocoros se extienden al polo correspondiente y se les denomina **microtúbulos del cinetocoro** (o fibras cromosómicas, como se les conocía anteriormente) y forman parte del huso mitótico.

Los microtúbulos del cinetocoro se unen a éste a través de su *extremo más*, y pueden agregar o disgregar unidades de tubulina mientras sigan unidas al cinetocoro.

Unión de los microtúbulos al cinetocoro

El aparato mitótico de las células con mitosis astral está conformado de la siguiente manera:

1. **Áster:** Formado por el centrosoma, los centriolos y la mayoría de los microtúbulos que salen radialmente de él, los *microtúbulos astrales*.
2. **Huso mitótico:**
 - a) **Microtúbulos polares o interpolares** (antiguamente llamados fibras continuas), parten de los polos y se dirigen un poco más allá de la mitad de la célula; estos extremos se traslapan en la parte media (o ecuador de la célula), por lo que no van de polo a polo y, por tanto, no son continuos.
 - b) **Microtúbulos del cinetocoro (o cinetocóricos).** Los microtúbulos presentan dos extremos, uno de ellos se conoce como *extremo menos* (–) o *de crecimiento lento*; este extremo siempre se localiza en los polos, es decir, es la porción más próxima al centrosoma, y el otro es el *extremo más* (+) o *de crecimiento rápido* que se localiza en la parte media para los microtúbulos polares, o bien, adherido al cinetocoro, en los microtúbulos correspondientes.
 - c) **Microtúbulos astrales.** Formado por microtúbulos que parten del centrosoma y se dirigen en todas direcciones; al parecer estos microtúbulos son los responsables de la separación de los polos (*figura 4*).

El comportamiento particular de cada uno de los microtúbulos depende de la combinación de un grupo de *proteínas motoras* dependen-



tes de microtúbulos, que se asocian en los dos extremos del microtúbulo. Estas proteínas se dividen en dos grupos: *proteínas relacionadas con las cinesinas* (o *quinesinas*), y las *dineínas*. Las cinesinas se desplazan hacia el extremo más, mientras que las dineínas lo hacen hacia el extremo menos.

Durante la interfase, los microtúbulos muestran *inestabilidad dinámica*, en la que se alternan periodos de crecimiento (llamado *rescate*) o acortamiento (llamado *catástrofe*). Estos periodos de modificación se presentan al azar; durante la profase, la vida media de los microtúbulos disminuye drásticamente, debido a la participación de un grupo de proteínas que desestabilizan el conjunto de microtúbulos y que se llaman *catastrofinas*, ya que incrementan la frecuencia de las catástrofes porque bruscamente pasan de un crecimiento lento a un acortamiento rápido. Las MAP (proteínas asociadas a los microtúbulos) tienen efectos contrarios a las catastrofinas, pues tienden a estabilizar a los microtúbulos. La

Cdk-M fosforila las MAP y, en consecuencia, reduce su capacidad para estabilizar microtúbulos, con lo que se incrementa la frecuencia de las catastrofes. La participación diferencial y en momentos distintos de los tres grupos de proteínas motoras, catastrofinas y MAP son las responsables del comportamiento dinámico de los microtúbulos que conforman el huso mitótico.

La prometafase tardía se caracteriza por un periodo frenético de actividad, durante el cual los cromosomas son violentamente rotados y sufren oscilaciones hacia atrás y hacia adelante entre los dos polos del huso, una vez que sus cinetocoros son capturados por sus respectivos microtúbulos en crecimiento. Esta asociación se llama *adhesión bipolar* y es asincrónica, por lo que los cromosomas migran de un polo al otro de una manera muy heterogénea; al ser tirados en esa dirección, la fuerza de tracción está en relación directa con la longitud de los microtúbulos: un cromosoma es jalado a través de uno de los dos cinetocoros y sólo podrá migrar al extremo opuesto hasta que los microtúbulos de ese lado hagan contacto con el cinetocoro respectivo; sin embargo, un cromosoma puede relacionarse con dos fibras del cinetocoro del mismo polo. Este tipo de interacciones son transitorias, pero favorecen la orientación azarosa de las cromátidas, de tal forma que no existe una preselección acerca de qué cromátida migrará hacia cuál de los dos polos, lo cual no reviste gran relevancia en la mitosis, ya que las dos cromátidas son idénticas desde el punto de vista genético, pero sí es muy importante para la meiosis, pues es un factor más que contribuye a la variabilidad entre las especies. Los movimientos anárquicos de los cromosomas van disminuyendo paulatinamente hasta que éstos comienzan a agruparse de manera alineada en la placa ecuatorial (o metafásica) de la célula.

La metafase no comenzará hasta que todos los cromosomas estén completamente alineados en la placa ecuatorial; en esta posición existe

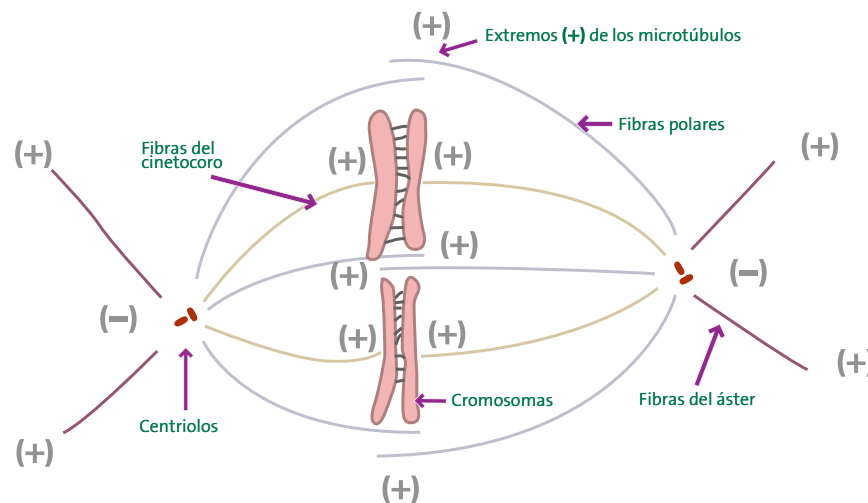


Figura 4. Componentes de huso mitótico.



un equilibrio de fuerzas; recordemos que mientras los cromosomas no estén alineados uno de los grupos de microtúbulos del cinetocoro tendrá diferente longitud con respecto al del lado opuesto, por lo que dichos cromosomas estarán sujetos a fuerzas de tracción. Otra hipótesis señala que hay fuerzas de exclusión astral que empujan (o repelen) a los cromosomas, alejándolos; esta fuerza decrece conforme aumenta la distancia a partir del polo, de tal manera que conforme la longitud de los microtúbulos de ambos lados se asemejan, las fuerzas de atracción o repulsión se irán nivelando, y esto conducirá paulatinamente a la formación de la placa ecuatorial de cromosomas, característica de la metafase.

La metafase no comienza hasta que todos los cromosomas se encuentran completamente alineados en la placa ecuatorial de la célula; en esta posición existe, como ya se ha explicado, un equilibrio de fuerzas provocada por los microtúbulos, puesto que conservan la misma distancia desde los polos hasta el cinetocoro y tienen en promedio el mismo número de microtúbulos por cinetocoro.

Los cromosomas avanzan hacia adelante y hacia atrás a cortas distancias, y ajustan constantemente su posición metafásica. Si se fragmenta un microtúbulo con un haz de rayo láser muy fino, el cromosoma migra inmediatamente hacia el polo opuesto. Esto indica que las fuerzas que provocan la formación de la placa metafásica son las mismas responsables de la migración de las cromátidas en la fase posterior (anafase).

La tensión generada en ambos grupos de microtúbulos del cinetocoro con orientación bipolar mantiene la estabilidad de los cromosomas.

Los cromosomas presentan movimientos oscilatorios de tal manera que por momentos se aproximan hacia los polos en el que el cromosoma se desplaza hacia el extremo menos, ocasionado al parecer por los cinetocoros, en otros momentos, los cromosomas se alejan de los polos y se

dirigen hacia el ecuador; esta fuerza que empuja a los cromosomas en esta última dirección se llama fuerza astral de expulsión (*figura 5*).

Al alinearse los cromosomas en el ecuador, el eje longitudinal de los cromosomas forma un ángulo recto con las fibras del huso.

Los estudios *citogenéticos* del cariotipo se realizan de preferencia en esta etapa porque en ella existe la mayor condensación de los cromosomas y pueden observarse nítidamente. El tratamiento con sustancias que intervienen con el ensamblado de las moléculas de tubulina como la *colchicina* y la *vinblastina* permiten estos estudios. Se ha identificado un mecanismo de control de adhesión al huso que permite asegurar que las células no entren en anafase hasta que todos los cromosomas estén sujetos por los dos polos del huso. Los fármacos antes mencionados activan este mecanismo de control y la célula queda fija en metafase.

Como ya se ha mencionado, la fosforilación de las histonas H1 y H3 es indispensable para que la condensación cromosómica sea total. Se ha podido inhibir esta condensación por medio de sustancias bloqueadoras de la *topoisomerasa II*; además de esta enzima existen diversas *quinasas de histonas*, algunas de ellas sintetizadas durante G_2 .

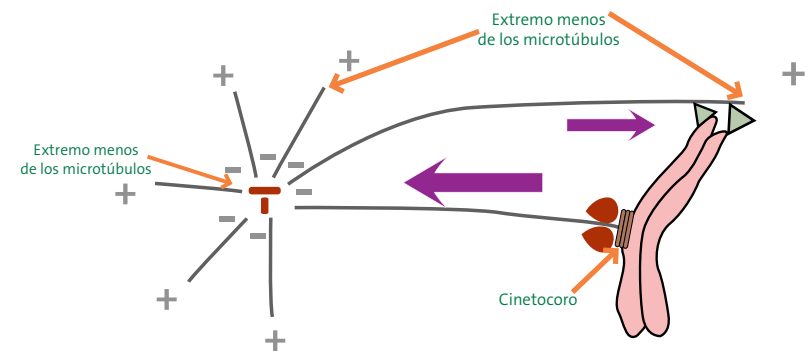


Figura 5. Movimiento de los cromosomas durante la prometáfase tardía.



Durante la metafase los microtúbulos del cinetocoro y los solapados mantienen en su longitud un equilibrio dinámico, ya que son capaces de agregar subunidades de tubulina en su extremo más (en el cinetocoro) y el mismo número de subunidades son eliminadas en el extremo menos (en el polo del huso), lo cual se conoce como *flujo hacia los polos*; esto mantiene la longitud y la tensión de todos los microtúbulos. En la metafase se localiza el tercer y último punto de control del ciclo celular, como ya se ha descrito (figura 6).

Anafase

En la anafase se rompe el equilibrio de fuerzas existentes en la metafase. La anafase comienza abruptamente con la separación sincrónica de las cromátidas hermanas de cada cromosoma metafásico, ya que sus extremos están relacionados como microtúbulos del cinetocoro. La separación de las cromátidas hermanas ocurre por la eliminación de una subunidad del complejo de *cohesinas* catalizada por la *separasa*, una proteasa que se activa cuando se fragmenta la proteína inhibidora llamada *securina*.

El principal responsable de la anafase es el *complejo promotor de la anafase (APC)*; cuando se activa este complejo tiene una actividad proteolítica que por un lado fragmenta e inactiva la ciclina M, por lo que se activa la Cdk-M, y por el otro fragmenta la *securina* (figura 7).

Los movimientos de las cromátidas comprenden dos mecanismos distintos y bioquímicamente independientes que se denominan: *anafase A* y *anafase B*.

La **anafase A** se refiere al **movimiento de las cromátidas hacia los polos** asociado a un progresivo acortamiento de los *microtúbulos del cinetocoro*; mientras que la *anafase B* consiste en el *alargamiento de los microtúbulos polares* a una distancia aproximada del doble de la que pre-

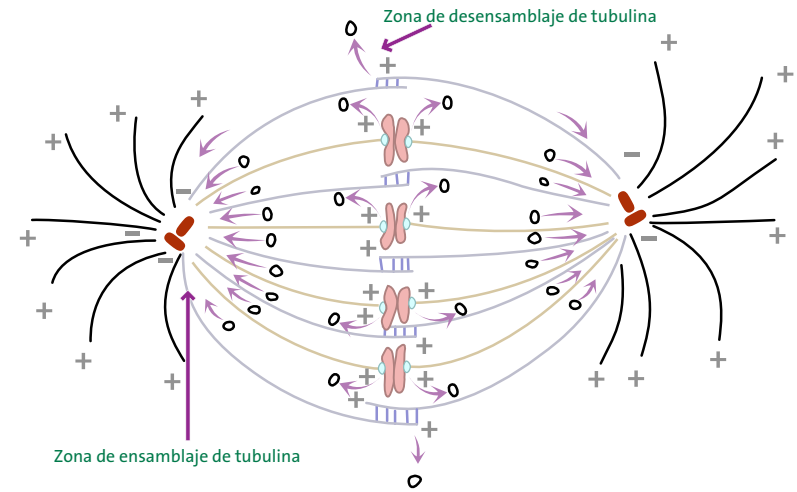


Figura 6. Metafase. Equilibrio dinámico en el ensamblaje y desensamblaje de los dímeros de tubulina.

sentaban en metafase. La anafase A depende de proteínas motoras que se encuentran en el cinetocoro.

En las células de los mamíferos, la anafase B comienza poco después de que las cromátidas han comenzado su viaje hacia los polos y cuando el huso es aproximadamente 1.5 a 2 veces su longitud metafásica. En otros organismos, como las levaduras y los protozoarios, la anafase B predomina y el huso suele alargarse hasta 15 veces su longitud original de la metafase. En los vegetales, la anafase B prácticamente no provoca aumento de longitud en los microtúbulos polares, por la escasa flexibilidad de las paredes celulares.

Anafase A

Durante la anafase A ocurre la migración de las cromátidas hermanas hacia los polos, esta migración obedece a un proceso de despolimerización

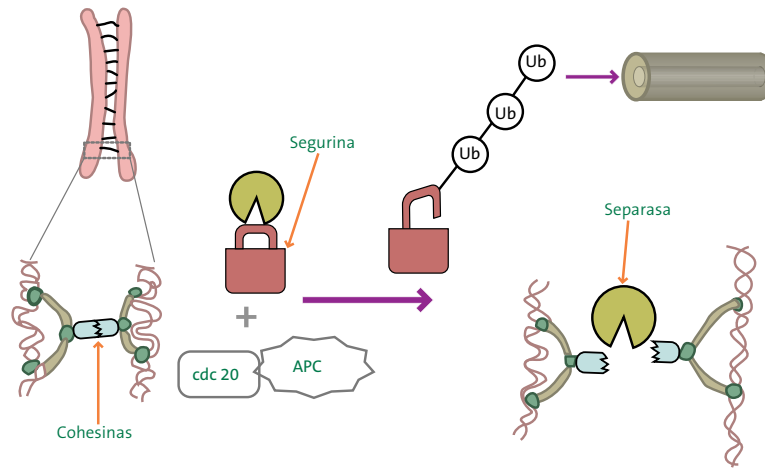


Figura 7. Mecanismos moleculares de la anafase.

rápida de las subunidades de tubulina que constituyen a los microtúbulos del cinetocoro, mientras que en los polos la eliminación de las subunidades es lenta, es decir, existe un mayor desprendimiento de subunidades al nivel del cinetocoro que al de los polos; el resultado neto es un acortamiento de los microtúbulos del cinetocoro con la subsecuente migración de las cromátidas hacia los polos. De 60 a 80% de la despolimerización se origina en el cinetocoro, y el resto en los polos (aproximadamente el mismo rango de despolimerización que ocurre en esta región durante la metafase).

El hecho de que el cinetocoro sea el mayor sitio de despolimerización, sugiere que también es el lugar en donde se genera la fuerza para el movimiento de las cromátidas. Se han propuesto dos modelos mediante los cuales el cinetocoro pudiera generar la fuerza necesaria para el movimiento anafásico de las cromátidas:

- En el primer modelo se plantea la existencia, a nivel del cinetocoro, de una serie de proteínas motoras que utilizan la energía de hidrólisis del ATP para jalar a las cromátidas a lo largo de los microtúbulos a los que está unido; de tal forma que la hidrólisis del ATP dirige el movimiento de las cromátidas.
- En el segundo modelo se considera que el movimiento de las cromátidas es dirigido por el desensamblaje de los microtúbulos del cinetocoro (sin la participación del ATP); conforme las subunidades de tubulina se separan, el cinetocoro se desliza a lo largo del microtúbulo; esto se debe a la existencia en el cinetocoro de proteínas con gran afinidad a la tubulina polimerizada, de tal manera que, con la finalidad de restaurar la unión con las paredes de los microtúbulos, el cinetocoro avanza en dirección a los polos (figura 8).

Recientemente se ha supuesto que en el cinetocoro existe una *catastrofina* dependiente de ATP que es la responsable del proceso de despolimerización de los extremos más.

Probablemente las proteínas motoras que participan en la anafase A sean semejantes a la *dineína* citoplasmática asociada a los cinetocoros de células de mamíferos.

En todos los casos, las cromátidas se comportan como los muertos en un funeral, ya que son el motivo primordial del acontecimiento, pero no participan activamente en él.

Anafase B

La anafase B comienza una vez que las cromátidas hermanas se separan, es decir, cuando la anafase A ha comenzado.

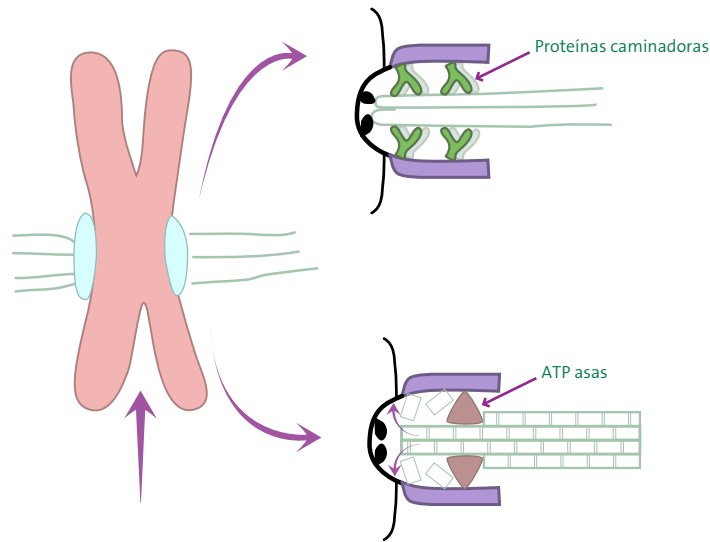


Figura 8. Anafase A. Mecanismos propuestos para la migración de los cromosomas hacia los polos.

Durante la anafase B se incrementa la distancia entre los dos polos de la célula y se contrapone a la anafase A, ya que existe una *elongación* de los microtúbulos polares.

Se han identificado dos fuerzas distintas responsables de la anafase B.

Los microtúbulos solapados se traslapan en la zona ecuatorial del huso en forma antiparalela; la primera fuerza está situada en esta zona media (en la zona de traslape), en ella los microtúbulos se *deslizan* entre sí en las porciones de superposición, gracias a la presencia de *proteínas motoras* dirigidas hacia el extremo más, pertenecientes a la familia de la *cinnesina*; esta proteína realizará fuerzas de empuje en direcciones opuestas que van a deslizar los microtúbulos entre sí dirigiéndose hacia los polos; aunado a este proceso, los microtúbulos solapados aumentan su longi-

tud a partir de sus extremos más, incrementando igualmente la distancia entre los polos. Esta fuerza parte de la porción central de la célula.

La segunda fuerza que contribuye a la separación de los polos se sitúa en los *microtúbulos astrales*; esta fuerza depende de proteínas motoras dirigidas hacia el extremo menos, por lo que van a interactuar no sólo en los microtúbulos astrales, sino también con el *córtex celular* (proteínas situadas por debajo de la membrana plasmática y unidas a ella a manera de red), alejando los polos del huso. Esta fuerza de tracción pudiera estar presente también durante la profase, cuando los centrosomas se comienzan a dirigir hacia los polos de la célula.

Resumiendo lo anterior, la anafase es esencialmente el resultado de dos movimientos distintos: en la anafase A las cromátidas son traccionadas hacia los polos, mientras que en la anafase B los polos se separan entre sí a causa de dos fuerzas: una que desliza los microtúbulos polares entre sí al mismo tiempo que éstos crecen, y la otra, una tracción en cada uno de los polos, en dirección a la membrana plasmática (*figura 9*).

Telofase

Es la etapa final de la mitosis. En este periodo los fragmentos de la envoltura nuclear se asocian en la periferia de los dos grupos de cromátidas, rodeándolos parcialmente; posteriormente se fusionan entre sí para formar de nuevo dos núcleos, cada uno correspondiente a las células hijas. La repolimerización (ensamblaje) de la envoltura nuclear es determinada por *fosfatasa*s que desfosforilan a las laminas A, B y C, lo que determina su reconstrucción. La activación de las *fosfatasa*s se presenta por la inactivación de las Cdk-M.

Un tipo de proteínas unido a los fragmentos vesiculares de las membranas nucleares se autoensambla, con lo que los otros dos tipos proteínicos solubles en el citoplasma, que conforman igualmente la lámina

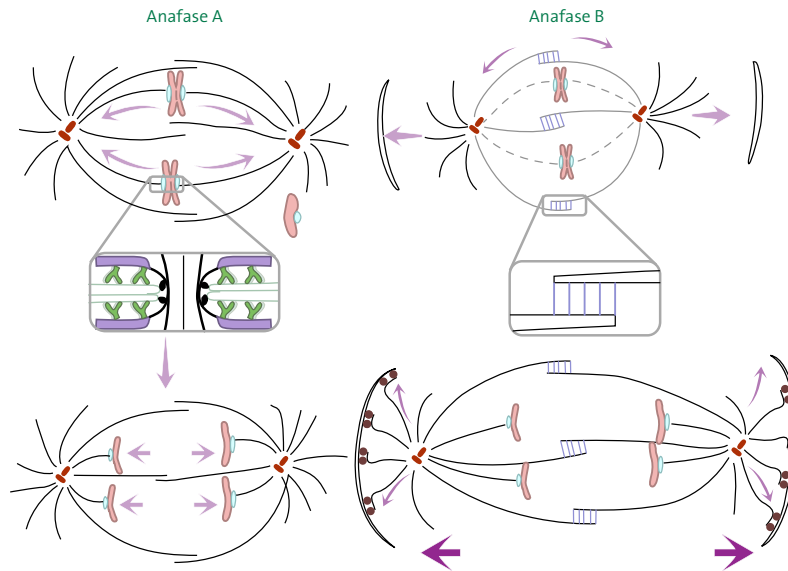


Figura 9. Anafases A y B.

nuclear, permiten el restablecimiento no sólo de esta última, sino además de los poros nucleares que, como se recordará, constituyen uno de los tres elementos estructurales fundamentales de la envoltura nuclear.

Durante la telofase el *nucléolo* se reorganiza a partir del NOR y de los *cuerpos perinucleares* (PNB), que se forman por coalescencia de material nucleolar disperso; una vez que la síntesis del ARNr se ha reactivado, a este proceso se le llama *nucleogénesis*. Los PNB se asocian con el NOR después de iniciada la transcripción del pre-ARNr, ya que si ésta se inhibe no se lleva a cabo la reconstrucción del nucléolo.

En la telofase se reanuda la síntesis del ARN, una vez que las envolturas nucleares se han completado, reagrupándose los elementos que conforman el nucléolo en cada uno de los núcleos hijos, con lo cual se hacen visibles y funcionales.

Citocinesis

La citocinesis corresponde a la división citoplasmática de las células hijas; suele iniciarse durante los primeras etapas de la *anafase*, continúa a lo largo de la *telofase* y culmina en el momento en que las células comienzan la interfase (y en particular G1).

En las células animales se forma el *surco de división celular*, que traza un ángulo recto en relación con el eje longitudinal de la célula.

Formación del surco de segmentación

La presencia de un material electrodensito en la porción media de la célula (una vez que las cromátidas han comenzado su migración hacia los polos) constituye el primer signo de la *citocinesis*. El huso mitótico desaparece gradualmente, excepto en la porción media de la célula, en la que se observa un mayor número de microtúbulos que atraviesan la región electrodensa en ambos lados, mientras algunos otros terminan en el ecuador. Se ha observado la sobreposición de gran cantidad de microtúbulos en el centro de la célula, además de mitocondrias y material vesicular llamado *cuerpo medio*.

La segmentación de las células hijas es debida a la participación de filamentos de actina, la agrupación de estos elementos en haces forma el *anillo contráctil*, que se relaciona con la región citoplasmática de la membrana plasmática.

El anillo contráctil inicia su formación al principio de la anafase; éste se ensambla espontáneamente alrededor de la célula, en el cuerpo medio, de tal manera que la superficie celular se pliega hacia el interior, lo cual constituye la profundización del surco que da comienzo a la división celular en dos mitades. Con este mecanismo se comprime el cuerpo medio estrechándose, y de esta manera persiste durante algún tiempo, de tal forma que se observa un pequeño istmo que mantiene comunicación citoplasmática entre las dos células hijas, hasta separarlas finalmente.



Las fuerzas que determinan la constricción del anillo son ejercidas, según diversas evidencias experimentales, por *filamentos de actina y filamentos de miosina-II*.

La formación del surco ocurre de manera simétrica en la mayor parte de los casos, produciendo dos células hijas del mismo tamaño. La región donde se forma el surco corresponde a la parte media entre ambos centrosomas; estas estructuras y en particular los microtúbulos del áster son los responsables de dar una señal intracelular a la corteza celular, alterando la región adyacente a los ásteres y provocando la acumulación de filamentos de actina entre los dos ásteres, de tal forma que la posición de estas estructuras (centrosomas y microtúbulos del áster) determinan la posición del surco de división; si la situación entre los dos ásteres no es simétrica, la división tampoco lo es. A lo largo del desarrollo embrionario suelen darse divisiones asimétricas dirigidas por cambios programados en regiones de la corteza celular que desplazan los ásteres (o regiones polares) por medio de los microtúbulos del huso.

Es importante señalar que de todos los elementos del citoesqueleto, sólo los microtúbulos y los microfilamentos (de actina y miosina II) tienen una participación activa en la división celular, de tal forma que los filamentos intermedios (a excepción de los que constituyen la lámina nuclear) no son utilizados, y permanecen estáticos alrededor de los núcleos hijos hasta que son separados por efectos de la segmentación.

Durante la citocinesis de las células animales se requiere una mayor cantidad de la membrana plasmática; la síntesis de ésta se da poco antes del inicio de la división y este material permanece almacenado en forma de vesículas por debajo de la superficie celular durante la fase M.

Meiosis

El éxito de la reproducción sexual en el proceso evolutivo queda demostrado por su presencia desde niveles muy simples de complejidad de los organismos, como las levaduras, que son seres unicelulares, hasta los grupos de mayor complejidad de animales y plantas.

El mecanismo sexual de reproducción aparece junto con la diferenciación del compartimento nuclear en las células (aparición de la envoltura nuclear) y es simultáneo a la organización del material genético (ADN) en varias moléculas, cada una de las cuales está organizada y asociada a proteínas histónicas en estructuras denominadas cromosomas.

La división especial que se produce en las células que originarán los gametos, llamada *división meiótica*, es el eje del proceso de diferenciación celular que culmina en las células que podrán formar un nuevo individuo de la especie, pues es durante esta doble división, con una sola duplicación del material genético, que se produce la reducción del número cromosómico (de *diploide* a *haploide*), y el reordenamiento del material genético procedente de cada uno de los progenitores.

Meiosis en griego significa “hacer más pequeño”, en alusión al hecho de que el número cromosómico disminuye a la mitad. Meiosis es, pues, el proceso mediante el cual se va a reducir el número de cromosomas, de manera que las células resultantes sólo van a contener un cromosoma de cada par de homólogos y un cromosoma sexual (*célula haploide*); así, durante la fertilización se va a completar nuevamente el número de cromosomas propios de la especie en cuestión.

Otro hecho de suma importancia durante la meiosis es la recombinación de los cromosomas homólogos, que produce cromosomas con



nuevas combinaciones de alelos maternos y paternos, lo cual permitirá la variabilidad de los individuos, es decir, la información genética de ambos progenitores se mezcla, de modo que cada célula haploide resultante tiene una combinación virtualmente única de genes.

En los mamíferos machos la meiosis está íntimamente relacionada con la formación de los gametos y ocurre justo antes de la diferenciación de los espermatozoides. En las hembras, para la formación de los ovocitos, la meiosis sólo termina si existe el proceso de fertilización.

En resumen, podemos decir que la meiosis consiste en dos divisiones nucleares y citoplasmáticas, designadas *primera y segunda divisiones meióticas*, o simplemente *meiosis I y meiosis II*; los miembros de cada par homólogo de cromosomas se unen primero y se aparean, y luego se separan y se distribuyen en núcleos distintos. Los cromosomas homólogos son los miembros de cada par de cromosomas, en los que uno de ellos proviene del padre y lleva su versión de los genes, y el otro miembro del par proviene y es portador de los genes de origen materno.

En la meiosis II, las cromátidas hermanas que constituyen cada cromosoma se separan y se distribuyen en los núcleos de las células hijas, es decir, ocurren pasos muy similares a los de una mitosis, en donde finalmente se va a reducir a la mitad la cantidad de ADN en relación a la célula original.

En animales, las células que van a iniciar la meiosis se conocen como espermatocono primario en el macho y ovocito primario en la hembra.

Etapas de la meiosis

Las células precursoras de gametos, antes de entrar al proceso de la meiosis, experimentan una etapa de interfase, en donde el material genético se duplica en la etapa de S. Cada cromosoma duplicado consta entonces de dos *cromátidas*.

Profase I

La primera división meiótica tiene una profase muy larga, que se divide en cinco estadios.

En el primer estadio, que es el *leptonema* (del griego *leptos*: fino, delgado, angosto, y *nema*: hilo o hebra) o *leptoteno* (adelgazado), los cromosomas se encuentran como filamentos largos y finos (hebras delgadas), que gradualmente se hacen visibles al microscopio fotónico. Al microscopio electrónico se observa que los cromosomas se componen de pares de cromátidas. Los cromosomas homólogos se disponen lado a lado en toda su longitud y permanecen separados entre sí por un espacio de 300 nm.

La compactación de los cromosomas continúa en el *leptonema* hasta alcanzar un punto en donde los cromosomas homólogos están listos para asociarse.

En esta etapa el núcleo aumenta ligeramente de volumen y el centríolo se hace aparente.

En el *cigotema* (del griego *cigos*: unión, y *nema*: hebra) o cigoteno (unidos), los cromosomas homólogos se acercan, forman parejas y se aparean. Este apareamiento de cromosomas se denomina *sinapsis* (del griego *synapsis*: ligamento). La sinapsis causa la asociación de cuatro cromátidas; el complejo resultante se conoce como *bivalente* o *tétrada*. El número de tétradas por célula en la profase I es igual al número haploide de cromosomas.

Durante la sinapsis los cromosomas homólogos se asocian en forma estrecha, dejando aún una separación entre ellos de 100 nm. Al microscopio electrónico, en la sinapsis se forma una estructura conocida como *complejo sinaptonémico* (o *sinaptenemal*), la cual mantiene juntos a los cromosomas.

El complejo sinaptonémico es una estructura proteínica parecida a una escalera, compuesta de tres barras paralelas con muchas fibras trans-



versales que conectan la barra central con las dos barras laterales. La cromatina de cada homólogo está íntimamente relacionada con una de las barras laterales del complejo sinaptonémico que sostiene unidos a los pares de cromosomas. El complejo sinaptonémico participa en el *entrecruzamiento* o *crossing over*, proceso en el cual las cromátidas homólogas intercambian material genético. En el entrecruzamiento, determinadas enzimas rompen cromátidas hermanas y vuelven a unir los fragmentos para producir nuevas combinaciones de genes. La *recombinación genética* resultante hace aumentar en gran medida la cantidad de variación genética entre la descendencia de los progenitores que se reproducen por vía sexual.

La *recombinación* permite que grandes secciones de la doble hélice de ADN se desplacen de un cromosoma a otro y es la responsable del entrecruzamiento de cromosomas que tiene lugar durante la división celular meiótica. La recombinación es esencial para el mantenimiento de los cromosomas en todas las células, y generalmente empieza con la rotura de la doble cadena, que luego es procesada exponiendo un extremo de ADN de cadena sencilla. La sinapsis entre esta cadena sencilla y una región homóloga del ADN de doble hélice está catalizada por la proteína *RecA* bacteriana y sus homólogas en células eucariontes.

El fin de la sinapsis marca la terminación del cigoteno y el inicio de la siguiente etapa de la profase I, llamada *paquinema*.

El *paquinema* es una etapa muy larga que dura de días a semanas, comparada con leptonema y cigonema, que sólo duran unas pocas horas.

En el *paquinema* (del griego *pakys*: grueso, y *nema*: hebra) o *paquitenio* (engrosado) se acortan y engruesan los cromosomas debido a condensación o espiralización, y los cromosomas se ven más gruesos, aunque siguen muy cercanos entre sí. Todavía cada par de cromosomas se deno-

mina bivalente y los cromosomas homólogos se mantienen unidos por un *complejo sinaptonémico*. Al microscopio electrónico se observan unas estructuras electrodensas a intervalos regulares en el centro del complejo sinaptonémico. Estas estructuras reciben el nombre de *nódulos de recombinación* porque se cree que contienen el mecanismo que facilita la recombinación entre los genes.

Continúa el intercambio de ADN entre cromosomas homólogos.

El *diploema* (del griego *diplos*: doble, y *nema*: hebra) o *diploteno* (duplicado) es la siguiente etapa de la profase I. Aquí los cromosomas comienzan a separarse, de tal forma que es posible observar por primera vez a los cromosomas homólogos separados e individualizados. Su cromatina está más condensada y se puede ver que están formados por *dos cromátidas*, por lo que cada *bivalente* se compone de *cuatro cromátidas*; es la denominada *tétrada*.

La separación de los cromosomas no es completa puesto que permanecen unidos en ciertas zonas llamadas *quiasmas*. Los quiasmas (del griego *chiasmós*: posición cruzada) por lo general se localizan en los sitios del cromosoma donde ocurre el intercambio genético durante el entrecruzamiento previo. Desaparece el complejo *sinaptonémico* y por lo tanto el entrecruzamiento.

Durante la ovogénesis las células que sufren la meiosis pueden permanecer largo tiempo en *diploema*. En la mayoría de las especies los ovocitos entran en profase I antes del nacimiento y así permanecen hasta la pubertad, momento en el cual se reinicia la meiosis cuando el folículo en desarrollo alcanza la etapa de madurez.

La separación y condensación de los cromosomas prosigue durante la *diacinesis* (del griego *dia*: a través de, y *kinesis*: movimiento). Los cromosomas tienden a separarse aún más, y permanecen unidos sólo en los



quiasmas, los cuales pueden moverse hacia las puntas de las cromátidas; a este proceso se le conoce como terminalización.

Hasta ahora se ha mencionado que el proceso de recombinación genética ocurre únicamente entre cromosomas homólogos, pero ¿qué sucede con los cromosomas sexuales? Las hembras de los mamíferos poseen dos *cromosomas X*, que se aparean y segregan de la misma forma que los otros pares de homólogos, a diferencia de los machos, que tienen un cromosoma X y uno Y, y tienen que aparearse durante la metafase I de meiosis, para que el espermatozoide contenga un cromosoma X o uno Y. El entrecruzamiento de este tipo de cromosomas es posible gracias a una pequeña *región de homología* entre ambos cromosomas, situada en uno de sus extremos. Los dos cromosomas se aparean y entrecruzan en esta región durante la profase I; el quiasma es la expresión morfológica resultante de esta recombinación genética y es suficiente para mantener apareados a los cromosomas X e Y en el huso; así, normalmente sólo se forman dos tipos de espermatozoides, uno con cromosoma Y que dará lugar a embriones masculinos y otro con cromosoma X que originará embriones femeninos.

La profase I de la meiosis ocupa más de 90% del tiempo total de la meiosis.

Para terminar la profase I, además de la *sinapsis* y el *entrecruzamiento*, ocurren también eventos similares a los de una profase mitótica. Se forma un huso de microtúbulos, duplicación y migración de centríolos y formación del aparato microtubular que conformará a las fibras del huso. La envoltura nuclear desaparece. La profase I termina cuando las tétradas se alinean en el plano ecuatorial (*figura 10*).

Metafase I

Los pares de cromosomas homólogos se orientan de tal manera que ambas cromátidas de los cromosomas se enfrentan al mismo polo (una

cromosoma frente a su homólogo). Por consiguiente, los centrómeros unidos de las cromátidas hermanas se sitúan lado a lado en relación al eje largo del huso, y las fibras cromosómicas de un polo dado están conectadas a ambas cromátidas de un solo cromosoma.

Anafase I

Los cromosomas homólogos de cada par se desunen y desplazan hacia polos opuestos. Cada polo recibe una combinación al azar de cromosomas maternos y paternos, pero sólo un miembro de cada par homólogo está presente en cada polo. Las cromátidas hermanas se encuentran unidas todavía en la región del centrómero.

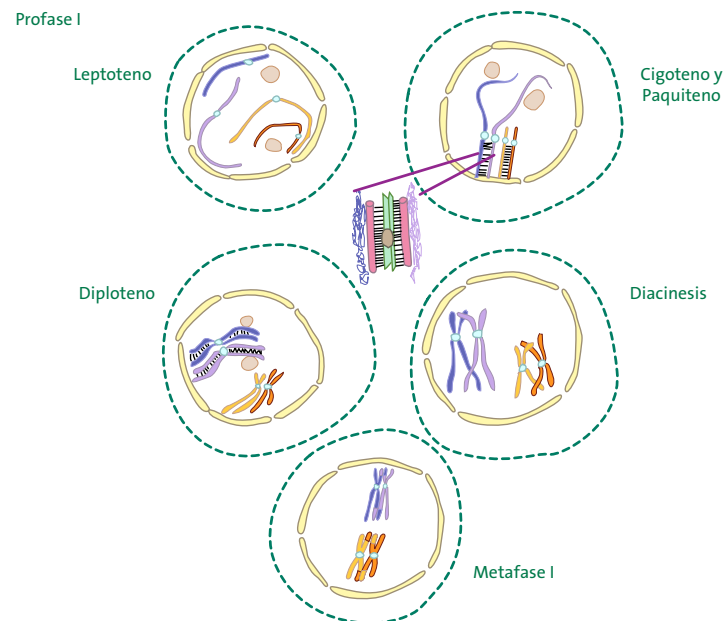


Figura 10. Diversas etapas de la profase I.



Telofase I

Las cromátidas se descondensan, la membrana nuclear se reorganiza y ocurre la citocinesis. En esta fase cada núcleo contiene el número haploide de cromosomas, pero cada cromosoma es un cromosoma duplicado.

En animales, las células resultantes de la citocinesis se conocen como espermatoцитos secundarios en el macho, y ovocitos secundarios en la hembra.

Por lo general, después de la citocinesis, sigue una etapa muy parecida a la interfase, que se conoce como *intercinesis*, la cual es muy breve en la mayor parte de los organismos, y está ausente en otros. Un aspecto clave en la meiosis es que durante la intercinesis no ocurre la duplicación del material genético o etapa de S o de síntesis. La intercinesis va seguida de la profase II.

Profase II

Como los cromosomas por lo general permanecen parcialmente condensados entre divisiones, la profase II es muy corta y similar a la profase mitótica. No existe apareamiento entre cromosomas homólogos (ya que sólo un homólogo de cada par está presente en cada núcleo), ni entrecruzamiento.

Los cromosomas se vuelven a condensar y comienzan a alinearse en el plano ecuatorial de la célula.

Metafase II

Los cromosomas se alinean en los planos ecuatoriales de las células (como en la mitosis) y se fijan a conjuntos opuestos de fibras cromosómicas del huso.

Es en esta etapa en mamíferos hembra ocurre una segunda interrupción de la meiosis, y sólo la fertilización permitirá que concluya.

Anafase II

Las cromátidas, unidas a fibras del huso en sus cinetocoros, se separan y desplazan a polos opuestos (como en la mitosis). Lo anterior se da por el desdoblamiento sincronizado de los enlaces que mantienen unidas a las cromátidas hermanas, lo que permite que se desplacen hacia polos opuestos de la célula.

Telofase II

Se reorganiza una nueva membrana nuclear alrededor de cada material genético, las cromátidas se alargan en forma gradual para formar hilos de cromatina y ocurre la citocinesis.

Las dos divisiones sucesivas producen cuatro células haploides con una combinación de genes distinta. Esta variación génica tiene dos fuentes: a) Durante la meiosis, los cromosomas maternos y paternos se “barajan”, de modo que uno de cada par se distribuye al azar en los polos en la anafase I; b) se intercambian segmentos de ADN entre los homólogos maternos y paternos durante el entrecruzamiento.

Las células resultantes de la meiosis son células haploides, tanto en el contenido de ADN nuclear como en el número de cromosomas, y son el espermatozoide en el macho y el huevo o cigoto en la hembra (*figura 11*).

Bibliografía

Ciclo celular

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Alberts B. Essential cell biology. EE.UU.: Garland, 1998.
- Alberts B. Introducción a la biología celular. 2ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2006.

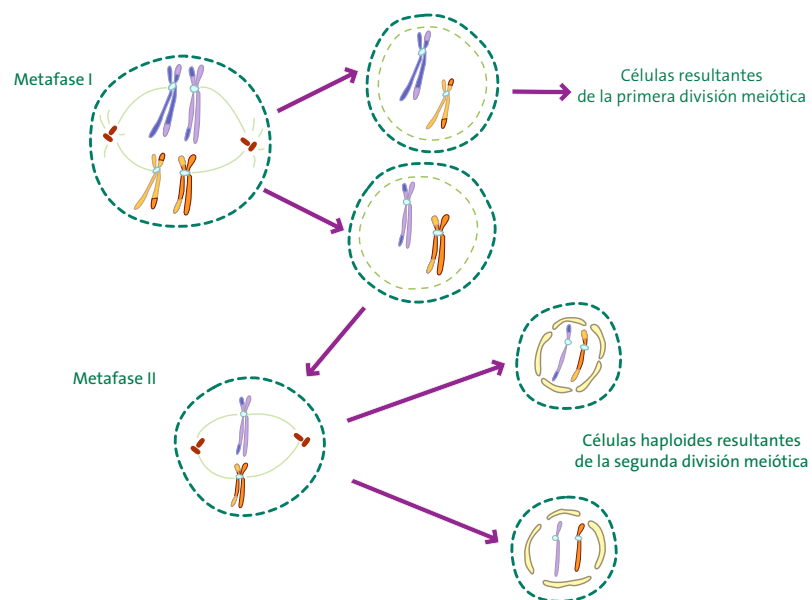


Figura 11. Células resultantes de la primera y segunda división meiótica.

- Honley-Hide J. Cyclins in the cell cycle; an overview. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992; 182:461-466.
- Kirschner M. The cell cycle and now. *TIBS* 1992; 17(281).
- Kirschner M. The cell cycle then and now. *Trends. Biochem. Sci.* 1992; 17: 281-285.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser ChA, Krieger M, Scout MP *et al.* *Biología celular y molecular.* 7ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 2005.

- Motoruka T, Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Birchim. Biophys. Acta* 1993; 1155: 63-78.
- Murray A, Kirschner M. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 1989; 246: 614-621.
- Pines V. Cyclins and cyclin-dependent kinases: Take your partners. *Trends Bichem. Sci* 1993;18: 195-197.
- Tolosa S, Ochoa V. *Morfología veterinaria.* 1 *Citología y embriología general.* México (D.F.): J. Tolosa Sánchez, 1984.

Diferenciación celular

- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser ChA, Krieger M, Scout MP *et al.* *Biología celular y molecular.* 7ª ed. México (D.F.): Médica Panamericana, 2005.

División celular

Mitosis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula.* 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Félix MA, Karsenti: *La división celular.* *Mundo Científico* 1995; 15 (154): 132-140.
- Tolosa S, Ochoa V. *Morfología veterinaria.* 1 *Citología y embriología general.* México (D.F.): J. Tolosa Sánchez, 1984.

Meiosis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula.* 4ª ed. Barcelona (España): Ediciones Omega, 2004.
- Félix MA. Karsenti: *La división celular.* *Mundo Científico* 1995; 15 (154): 132-140.
- Tolosa S, Ochoa V. *Morfología veterinaria.* 1 *Citología y embriología general.* México (D.F.): J. Tolosa Sánchez, 1984.

9

Señalización celular



Capítulo 9

Señalización celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda

Icela Palma Lara

Objetivos temáticos

- Principios de la señalización celular.
- Transducción de señal.
- Tipos de comunicación celular.

Introducción

Una de las características esenciales de los seres vivos es su capacidad de ajustarse a las condiciones que presenta el medio que los rodea. Ello implica que tienen la capacidad de percibir los cambios de su entorno y de responder a ellos. En los organismos más complejos, las células que lo forman se encuentran inmersas en un medio (el líquido extracelular o medio interno) a cuyos cambios también están respondiendo. Ahora bien, si consideramos al individuo como un todo, el conjunto de células que lo forman, para ser capaces de gobernar su comportamiento en beneficio del organismo, debe funcionar de una manera global, coordinada y armoniosa. Dado que de células de las que se está hablando son millones, dicha coordinación y armonía sólo puede lograrse mediante un complejo sistema de *comunicación o señalización celular*.

En los organismos multicelulares la comunicación se realiza y coordina por medio de dos sistemas: el *nervioso* y el *endocrino u hormonal*. Ambos operan básicamente por medio de mensajes químicos. En realidad, la interrelación entre ambos sistemas es tan estrecha, que pueden tomarse por uno solo: el gran *sistema neuroendocrino*. Este sistema capta los cambios en el medio externo, los ajusta al medio interno y permite la acción de cada célula de forma tal que la respuesta global se integre. Sin embargo, considerar que es sólo el sistema neuroendocrino el que interviene en la comunicación celular sería un grave error. En realidad hay comunicación celular entre todas las células y en todos los ámbitos. Actualmente, se plantea que “los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico son el principal sistema de comunicación entre los órganos y tejidos, y ellos deben integrarse a todos los niveles para mantener la homeostasis”.

Principios de la señalización celular

Mensajeros celulares

Los mecanismos de señalización celular dependen de *moléculas de señalización*, también llamadas *mensajeros*. Los mensajeros celulares son



moléculas producidas en una célula –*célula señalizadora*– para ser detectadas por otra célula –*célula blanco*–, la cual reconoce y responde específicamente a la molécula señal (mensajero).

Los organismos multicelulares usan cientos de clases de moléculas extracelulares para mandarse señales entre las células, que de acuerdo con su naturaleza química pueden ser (*tabla 1*):

- proteínas
- péptidos
- aminoácidos
- nucleótidos
- esteroides
- derivados de los ácidos grasos y
- gases disueltos (óxido nítrico, monóxido de carbono)

Tabla 1

Clasificación de las moléculas de señalización

Péptidos	ADH (vasopresina)
Proteínas	Trh, ACTH, insulina
Aminoácidos	Epinefrina, tiroxina
Esteroides	Cortisol, aldosterona, estradiol, testosterona, progesterona
Eicosanoides	Prostaglandinas
Nucleótidos	AMPc
Retinoides	Vitamina A
Gases	Óxido nítrico

Aunque son cientos las moléculas de señalización, sólo hay muy pocos estilos básicos de comunicación, de los cuales, el más común en los animales es el de la difusión de la señal sobre todo el organismo por medio de su secreción en la sangre. Las moléculas señales usadas por esta

vía son llamadas *hormonas*; las células que producen hormonas son las *células endocrinas*.

Las hormonas son mensajeros químicos que proporcionan una comunicación entre órganos y tejidos, y debido a su estructura química específica y a su diversidad de actividades biológicas integran a estos órganos y tejidos en una entidad denominada *organismo*. Las hormonas regulan la morfogénesis, crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos, y el patrón general de estos procesos es determinado por el genoma.

El término *hormona* (del griego *hormán*, "estimular") fue utilizado por primera vez en 1904 por William Bayliss y Ernest Starling para describir la acción de la secretina, una molécula secretada por el duodeno que estimula el flujo subsiguiente de jugo pancreático.

Desde el punto de vista teleológico, todas las hormonas presentan los siguientes rasgos generales: transfieren información (una señal), coordinan la actividad de varias células de un organismo multicelular, y son las principales reguladoras de los procesos vitales.

Las hormonas, por su naturaleza química, pueden pertenecer a alguna de las siguientes categorías:

1. *Aminas*: compuestos de bajo peso molecular que contienen nitrógeno unido a dos hidrógenos ($-\text{NH}_2$). Dentro de los mensajeros que son aminas hay algunos aminoácidos como el *ácido glutámico*, el *ácido aspártico* y la *glicina*, y productos del metabolismo de aminoácidos, esto es, de su transformación en el organismo. Entre estos últimos están las hormonas tiroideas, la adrenalina, la *serotina*, la *histamina* y la *dopamina*. Además, hay algunos compuestos sencillos como la *acetilcolina* (*figura 1*).

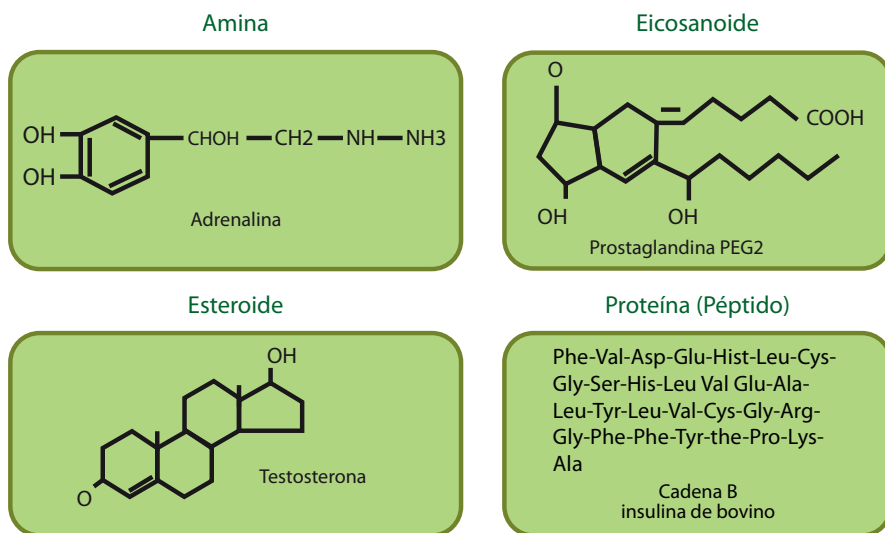


Figura 1. Estructura bioquímica de algunas moléculas de señalización celular.

2. **Eicosanoides:** son sintetizados en las membranas a partir del ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos, *ácido araquidónico*. Las tres subclases de eicosanoides (*prostaglandinas*, *leucotrienos* y *tromboxanos*) generalmente no actúan lejos del tejido donde se producen, sino principalmente en células muy cercanas al sitio de su liberación (figura 1).
3. **Esteroides:** son lípidos con una estructura química semejante a la del colesterol; de hecho, se sintetizan en las diversas glándulas a partir del colesterol. Entre los esteroides más importantes tenemos los siguientes: a) las *hormonas sexuales* masculinas y femeninas, b) los esteroides producidos por la corteza de la glándula suprarrenal, que regulan el metabolismo de la glucosa (*cortisol* y *cortisona*) y el manejo de iones como el sodio y el potasio (al-

dosterona), y una vitamina que es una prohormona: la *vitamina D* o *calciferol* (figura 1).

4. **Peptídicas y proteínicas (polipéptidos):** son compuestos formados por la unión de varios aminoácidos, los cuales se unen unos con otros mediante un enlace peptídico; cuando son pocos los aminoácidos que contienen se les llama peptídicas, y cuando son muchos, polipéptidos o proteínas (figura 1). Dentro del grupo se encuentran la *insulina*, el *glucagón*, la *hormona antidiurética*, la *oxitocina*, la *angiotensina*, los *factores de liberación de las hormonas hipofisiarias*, las *endorfinas*, los *factores de crecimiento* y de *transformación*, y otros.

Receptores: los “oídos” de las células

Sólo algunas células del organismo son receptoras de un mensaje. Es decir, el mensaje se concentra en aquellas células que posean *receptores* para éste.

Un receptor es una proteína capaz de recibir al mensajero y de transmitir el mensaje al interior de la célula para que ésta produzca una respuesta. El receptor como tal deberá cumplir dos características fundamentales: 1) reconocer al mensajero (también llamado ligando) para interactuar con él y 2) activar una secuencia de eventos que conduzcan a la respuesta celular.

Desde el punto de vista de su localización, en la célula los receptores se dividen en dos grupos: aquellos que se encuentran en el interior de la célula (intracelulares), y los que se encuentran en el exterior de ésta (de superficie celular, de membrana plasmática o externos). Se puede decir, entonces, que existen dos tipos básicos de “oídos celulares”: los internos y los externos (figura 2).

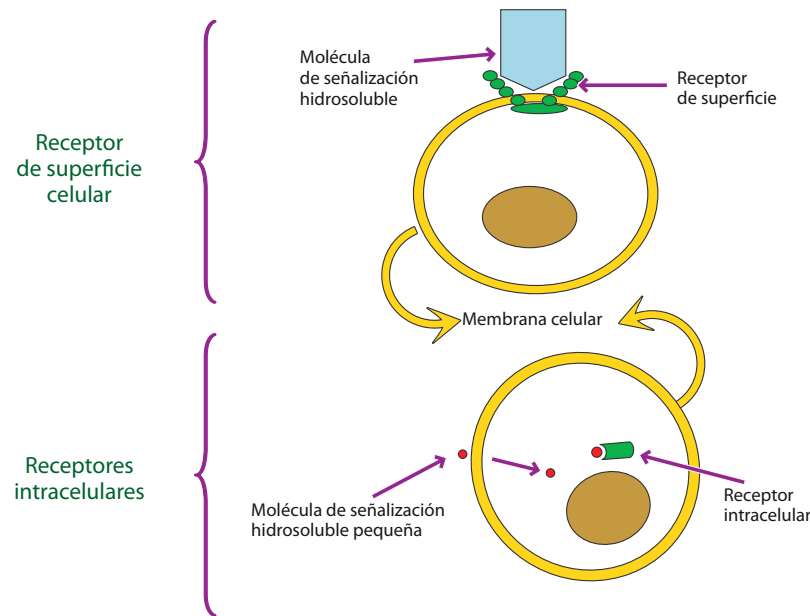


Figura 2. Receptores de superficie celular y los intracelulares y las moléculas de señalización.

Los primeros serán responsables de escuchar a los mensajeros liposolubles, como las hormonas esteroides, mientras que los segundos escucharán a los hidrosolubles.

Receptores externos (de superficie celular)

Son proteínas que se localizan en la *membrana plasmática*, algunas de ellas pueden atravesarla de lado a lado (proteínas transmembranales). Por lo general, la cara externa de los receptores transmembranales contiene el sitio de reconocimiento para el mensajero; mientras que el resto del receptor sirve para procesar y transmitir la información a la célula. Este tipo de receptores une a las moléculas de señalización solubles en agua (incluyen-

do los neurotransmisores) y, por lo tanto, actúan como transductores de una señal, ya que convierten la unión de un *ligando extracelular* en una *señal intracelular* que altera el comportamiento de la célula blanco. Por otra parte, los receptores de superficie presentan un gran dinamismo, puesto que pueden efectuar movimientos horizontales y verticales, agruparse, pasar a otras membranas en el interior de la célula o inclusive reciclarse.

Dependiendo del mecanismo de transducción que utilicen, los receptores de superficie se clasifican en: 1) *receptores acoplados a proteínas G*; 2) *receptores con actividad enzimática*, y 3) *receptores canal (ionotrópicos)*.

Acoplamiento del receptor con su ligando

De manera general, la acción de las moléculas de señalización comienza con la unión de éstas a su receptor específico. La *célula blanco* está definida por su capacidad para fijar de manera muy selectiva a la molécula de señalización, lo que está dado por los receptores.

Para que ocurra este acoplamiento debe existir una alta selectividad de los receptores para una molécula de señalización específica, es decir, una afinidad entre ambos. Por ello, hay dos conceptos importantes en la comunicación celular: la afinidad y la actividad. La afinidad puede definirse como una medida de la facilidad de interacción entre dos sustancias; en este caso, entre el receptor y el mensaje. La actividad es la capacidad del mensajero para producir un efecto. En términos generales, a cualquier compuesto que sea capaz de unirse con un receptor y producir una respuesta en la célula se le llama *agonista*; mientras que un *antagonista* es la sustancia que al interactuar con un receptor, pues presenta una buena afinidad con él, inhibe o antagoniza el acoplamiento mensajero-receptor y así bloquea la respuesta celular. Se desconoce qué determina que, de dos sustancias capaces de unirse con el mismo receptor, una sea agonista



y la otra antagonista. Lo que sí se sabe es que hay gran especificidad en los receptores y que existe, por lo menos, un receptor específico para cada mensajero. Sin embargo, en muchos casos hay varios tipos de receptores para un solo mensajero. Por ejemplo, para la adrenalina, en el ser humano existen por lo menos nueve tipos de receptores, por lo que se cree que cada receptor podría llevar un mensaje diferente a la célula, brindándole así una mayor capacidad para regular sus funciones (adaptación celular).

Una observación adicional es que el tipo de receptores para una hormona o molécula de señalización en un tejido en particular podría variar con la edad del animal. Es decir, la capacidad para responder a las moléculas de señalización o el tipo de sistema o receptores que se activan van cambiando conforme la célula envejece.

Receptores acoplados a proteína G

Los *receptores acoplados a proteína G* conforman una gran familia de receptores de superficie celular que media muy diversas señales moleculares (hormonas, neurotransmisores o mediadores locales). En los mamíferos han sido definidos más de cien miembros. Consisten en una sola cadena polipeptídica que atraviesa la membrana plasmática siete veces, por lo que también se les llama receptores de los siete dominios transmembranales o en “serpentina”.

Proteínas G

Entre la amplia variedad de proteínas G, las principales son las *triméricas* (proteínas G) y las *monoméricas* pequeñas (RAS). Ambas proteínas están acopladas a ciertos receptores de superficie y han recibido el nombre de proteínas G por requerir *nucleótidos de guanina* (GTP) para su funcionamiento.

La activación individual de una proteína G puede causar la activación o inhibición de un efector enzimático en particular y cambiar así la concen-

tración de una molécula de señalización en la célula (tabla 2). Las proteínas G que actúan sobre el efector en forma activadora se llaman *Gs* (“s” por *stimulation* = estimulación) y las que lo hacen en forma inhibidora se llaman *Gi* (“i” por inhibición). En términos generales, cuando un ligando activador se une a su sitio en el receptor, el cambio conformacional que le ocasiona causa que éste interactúe con una proteína *Gs*, que a su vez estimula la enzima *adenilato ciclasa* (o *adenilil ciclasa*); pero si se trata de un agente que inhibe la ciclasa, la interacción del receptor será con *Gi* (tabla 2).

Tabla 2
Proteínas G triméricas (tres familias principales)

Familia	Algunos miembros de la familia	Acción mediada por	Función
I	Gs	α	Activa adenilato ciclasa, activa canales de calcio
II	Gi	α $\beta\gamma$	Inhibe adenilato ciclasa, activa canales de potasio; inactiva canales de calcio
III	Gq	α	Activa fosfolipasa C- β

Las proteínas G se encuentran unidas a la cara citosólica de la membrana plasmática y están compuestas de tres cadenas polipeptídicas diferentes, llamadas alfa, beta y gamma (α , β y γ), respectivamente. En su estado trimérico todas las proteínas G son inactivas, su función depende de su disociación en un monómero α y un dímero $\beta\gamma$. La actividad de una proteína G es controlada por su unión al nucleótido guanina. El trímero inactivo tiene GDP unido a la subunidad α y en esta forma se encuentra asociado de manera constitutiva al receptor. Cuando el receptor se activa induce un cambio conformacional de la subunidad α que causa que el GDP sea liberado y su lugar sea ocupado por GTP. La unión del GTP provo-



ca que la subunidad α se disocie tanto del receptor como del complejo $\beta\gamma$ y que adopte una nueva conformación que le permite interactuar con sus proteínas blanco (enzimas o canales iónicos), que son las que finalmente liberan la señal al interior de célula. Todas las subunidades α son GTPasas, y cada una hidroliza al GTP a una velocidad característica, por lo que la duración de la actividad de la proteína G es controlada por esta subunidad, ya que cuando el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad α se reasocia con el dímero $\beta\gamma$ y con ello se inactiva la proteína. Por lo tanto, la subunidad α permanecerá activada mientras persista su unión al GTP. En el caso de las Gs, la subunidad α_s activa la adenilato ciclasa, mientras que las Gi la inhiben.

Sistema de la adenilato ciclasa

La activación de la adenilato ciclasa por una proteína Gs trae como resultado un aumento en la producción de AMPc por la célula; pero si se trata de una Gi, se inhibe la ciclasa y, por lo tanto, la producción de AMPc por la célula disminuye (figura 3).

El AMPc es un mediador intracelular pequeño sintetizado del ATP por la *adenilato ciclasa*. Aunque el AMPc puede activar cierto tipo de canales iónicos en la membrana plasmática, éste ejerce su efecto principal por activar a una *proteína cinasa A* (PKA). Hormonas como la *angiotensina*, *epinefrina*, *glucagón*, *melatonina*, *vasopresina* y las hormonas glucoproteínicas de la glándula pituitaria desencadenan una respuesta de este tipo.

Sistema fosfoinosítidos-calcio

La membrana plasmática en su porción lipídica está formada básicamente por *fosfolípidos*. Éstos son lípidos que contienen glicerol, dos ácidos grasos, fosfato y un alcohol frecuentemente aminado. Uno de estos fos-

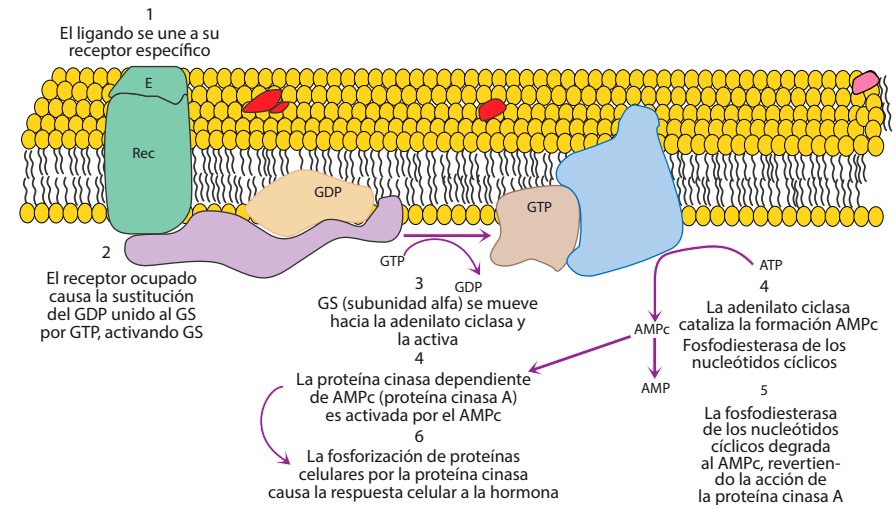


Figura 3. Sistema de la Adenilato ciclasa activada por proteínas G.

folípidos es el *fosfatidilinositol* (PI), el cual puede ser fosforilado a *fosfatidilinositol monofosfato* (PIP) y a *fosfatidilinositol bifosfato* (PI₂). Ciertos mensajeros, al acoplarse con receptores de la familia de los siete dominios transmembranales, activan otra clase de proteínas G llamadas Gq. Dichas proteínas activan la enzima *fosfolipasa C* β (PLC β), específica para el PI₂. La PLC β hidroliza al PI₂ en dos principales segundos mensajeros, el *inositol trifosfato* (IP₃) y el *diacilglicerol* (DAG).

El IP₃ es una molécula pequeña hidrofílica que es liberada en el citosol, donde se difunde rápidamente hasta alcanzar ciertos receptores localizados en el retículo endoplasmático (encargado de secuestrar el calcio). Estos son receptores de canal, y al encontrarse con el IP₃ se abren, permitiendo que el *calcio* salga del retículo y se difunda al citosol. Además, algunos productos de su metabolismo son capaces de inducir la apertura de proteínas de canal de la membrana plasmática, que dejan entrar más



calcio al citoplasma; el resultado es que se incrementa tres, cuatro o más veces la concentración de calcio en el citoplasma celular, lo que da lugar a la propagación del efecto en el citoplasma (figura 4).

El DAG, el otro segundo mensajero del sistema IP, es de naturaleza lipídica y permanece embebido en la membrana plasmática, donde desempeña dos funciones: en primer lugar, puede ser escindido para liberar ácido araquidónico, precursor de hormonas eicosanoides o, más importante, puede activar una proteína cinasa C (PKC). La activación de la proteína C por el DAG depende del Ca^{2+} y la fosfatidilserina (PS), otro constituyente fosfolipídico de la membrana. El calcio producido por el IP_3 altera a la PKC para que se transloque del citosol a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Ahí es activada por la combinación de Ca^{2+} y DAG y la carga negativa de la fosfatidil serina. La unión del DAG y de PS

a la PKC, localizada en la cara citoplasmática de la membrana, aumenta la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} ; como resultado, la proteína PKC se activa. Por lo tanto, la activación de la proteína cinasa C requiere de dos mensajeros intracelulares, DAG y Ca^{2+} , que pueden ser inducidos por la misma señal extracelular (figura 4). La PKC fosforila a su proteína blanco, la cual difiere dependiendo del tipo celular.

Transducción de la señal

Propagación intracelular y amplificación de la señal

Como ya se mencionó, la señal recibida en la superficie de una célula es liberada en el interior de ésta, por una combinación de moléculas de señalización intracelular o segundos mensajeros (AMPc , Ca^{2+} , DAG e IP_3) que, al difundirse rápidamente fuera de su fuente de origen, amplifican la señal en otra parte de la célula al pasar a las proteínas de señalización específicas (proteínas blanco). Estas últimas pueden ser consideradas como interruptores moleculares que al recibir la señal cambian de un estado inactivo a otro activo, hasta que otra señal las apaga.

Las proteínas blanco ayudan a liberar la señal recibida al activar a una siguiente proteína en la cadena de señalización o generando otros mediadores intracelulares pequeños. De acuerdo con su función, las proteínas blanco pueden ser clasificadas en:

1. *Proteínas de liberación* (pasan la señal o mensaje al siguiente componente de señalización en la cadena).
2. *Proteínas mensajeras* (llevan la señal de una parte de la célula a otra; por ejemplo, del citosol al núcleo).
3. *Proteínas adaptadoras* (unen una proteína de señalización con otra).

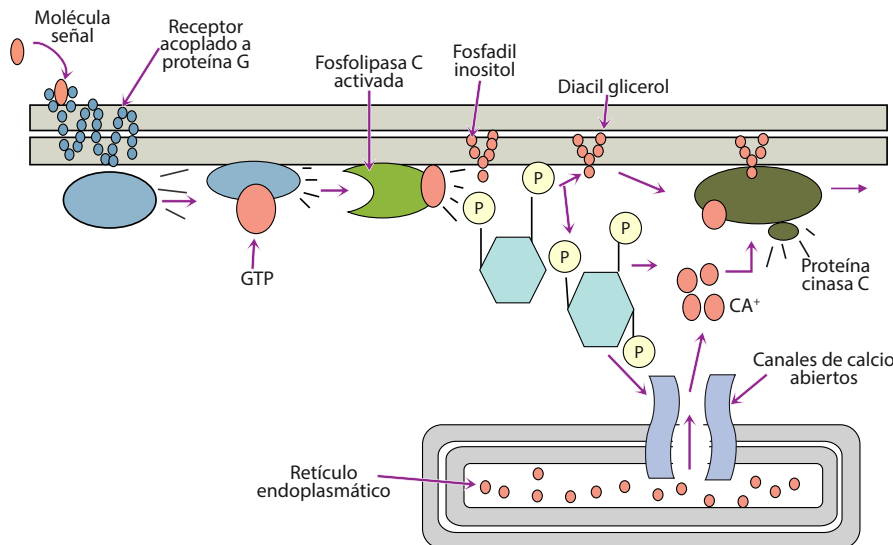


Figura 4. Sistema fosoinosítido-calcio.



4. *Proteínas amplificadoras* (pueden ser enzimas o canales iónicos; cuando existen múltiples pasos en la amplificación, forman parte de una cascada de señalización).
5. *Proteínas transductoras* (convierten la señal en una forma diferente; por ejemplo, pueden producir AMPc y por lo tanto convierten la señal y la amplifican).
6. *Proteínas de bifurcación* (esparcen la señal de una vía de señalización a otra).
7. *Proteínas integradoras* (reciben señales de dos o más vías de señalización y las integran antes de liberar la señal).
8. *Proteínas reguladoras latentes de genes* (son activadas en la superficie celular por un receptor activado y después migran al núcleo para estimular la transcripción de un gen).

Existen otras proteínas que también desempeñan una función importante en la señalización intracelular y que pueden ser clasificadas en:

- a) *Proteínas moduladoras* (modifican la actividad de las proteínas de señalización intracelular, por lo tanto, regulan la fuerza de la señal a lo largo de la vía).
- b) *Proteínas de anclaje* (mantienen una proteína de señalización específica en una localización precisa dentro de la célula, para lo cual debe permanecer unida a una membrana o al citoesqueleto).
- c) *Proteínas de andamiaje* (son proteínas adaptadoras o de anclaje que mantienen unidas a múltiples proteínas de señalización en forma de un complejo funcional y a menudo también las mantienen en una localización específica).

Por lo tanto, podemos decir que los segundos mensajeros tampoco actúan directamente, sino que son reconocidos ("oídos") por otros

receptores intracelulares con una extraordinaria afinidad y especificidad, participando así en la *propagación de la señal*. Dicha propagación no es tampoco un proceso lineal, sino que se lleva a cabo en forma de "*cascada de amplificación*"; esto quiere decir que, en cada paso que se da, el proceso se va haciendo más amplio (*figura 5*).

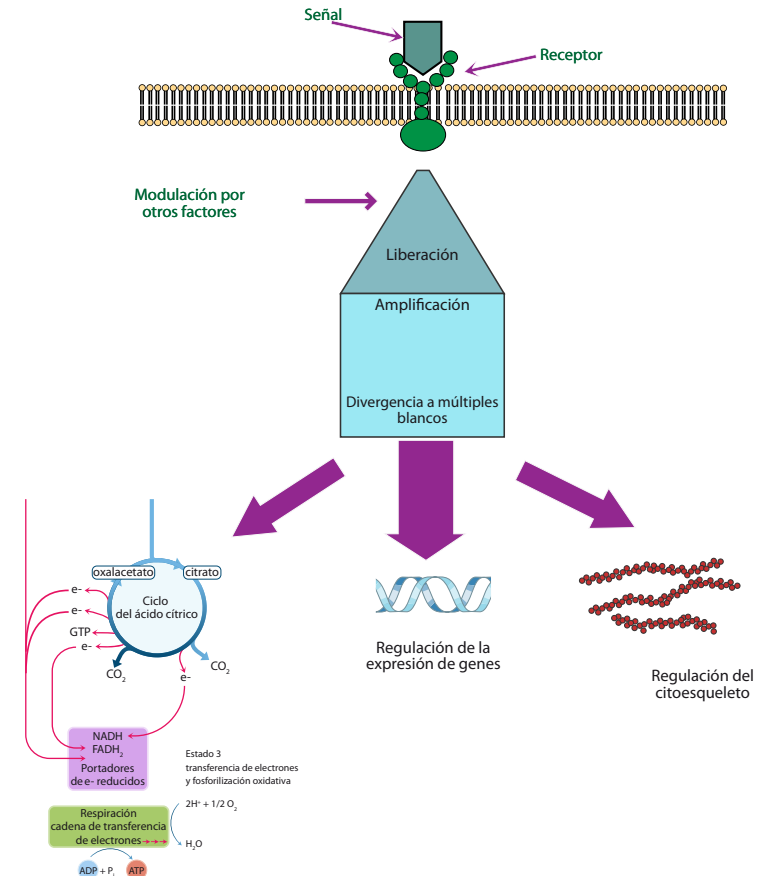


Figura 5. Propagación intracelular y amplificación de la señal.



Un tipo de proteínas blanco (de liberación) que existe en el citoplasma de las células son llamadas *proteínas cinasas*, las cuales fosforilan (añaden fosfatos) algunas proteínas de la célula, de modo tal que cambian su actividad: unas se inhiben y otras se activan. Este proceso es uno de los mecanismos moleculares de regulación de la función celular más importantes que existen, y se observa prácticamente en todas las funciones celulares: la regulación del metabolismo, la contracción, la secreción, la proliferación celular, la diferenciación, etcétera.

- *Amplificación de la señal en la vía del AMPc.* El AMPc generado de la señal producida por una hormona es reconocido por su proteína blanco en el citoplasma: la *proteína cinasa A* (para el AMPc; PKA). Esta proteína contiene dos tipos de subunidades, las R (reguladoras) y las C (catalíticas, las cuales tienen la propiedad de proteína cinasa). En su estado inactivo, la PKA consiste en un complejo de dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Cuando los niveles de AMPc aumentan, éste se pega a las subunidades R y altera su conformación, causando que se disocien del complejo, y dejen libres a las subunidades C de la PKA para fosforilar las proteínas efectoras (blanco). Las proteínas fosforiladas modifican su actividad (la aumentan o disminuyen); algunas de ellas son proteínas cinasas a su vez, y al activarse van a fosforilar a otras proteínas, las que también se modifican y van a actuar sobre otras proteínas. Así sigue desencadenándose esta cascada de fosforilaciones y, por lo tanto, amplificándose la señal en el interior de la célula. Este tipo de respuesta mediada por el AMPc, a través de la PKA, se clasifica como rápida. Sin embargo, el AMPc puede mediar respuestas lentas (horas), que involucran la expresión de genes.

En las células existen genes que contienen una secuencia corta de ADN denominada *elemento de respuesta al AMPc* (CRE); una proteína específica, llamada proteína unidora de CRE (CREB), reconoce la secuencia, cuando CREB es fosforilada por PKA, y recluta a un coactivador de la transcripción, llamado proteína unidora de CRE (BP), el cual estimula la transcripción de estos genes.

Es conveniente aclarar que las *proteínas cinasas* sólo provocan la fosforilación de aquellas proteínas que constituyen su sustrato y que, así como el sistema se activa rápidamente, también se desactiva con facilidad. De esta forma, la respuesta celular a las señales extracelulares, transducidas por el AMPc, pueden ser controladas por la rápida destrucción del AMPc a causa de una o más *AMPc-fosfodiesterasas* (que transforman el AMPc en 5'-AMP); por la desfosforilación de las proteínas efectoras fosforiladas o por la desfosforilación de la PKA provocada por una fosfoproteína *fosfatasa*. La desfosforilación es catalizada por cuatro tipos de *proteinfosfatasas*: *proteinfosfatasa I* (desfosforila proteínas fosforiladas por PKA e inactiva CREB), *proteinfosfatasa IIA* (desfosforila proteínas fosforiladas por cinasas en serina/treonina), *proteinfosfatas IIB* y *proteinfosfatasa IIC*.

- *Amplificación de la señal en la vía calcio-IP₃ y DAG.* Muchas señales extracelulares inducen un incremento del calcio citosólico por abrir canales de calcio, de los cuales existen tres tipos:
 - a) Canales de calcio voltaje dependientes (disparan la liberación de los neurotransmisores).
 - b) Operados por IP₃ (localizados en el retículo endoplasmático).



- c) Receptor de rianodina (sensibles al alcaloide rianodina) en el retículo sarcoplasmático; participan en la contracción muscular (activados por cambios en el potencial de membrana).

Como se mencionó, el IP_3 es generado junto con el DAG cuando un receptor activado por su ligando estimula a una PLC- β a través de la familia Gq. El IP_3 causa la liberación del Ca^{2+} que entonces ejerce su acción como segundo mensajero, activando una serie de proteínas cinasas y otras enzimas cuya acción depende de la concentración de este ion. De las proteínas unidoras de calcio que sirven como transductoras del ion están:

- a) La troponina C (en músculo esquelético).
- b) La calmodulina (CaM), que funciona como un receptor de Ca^{2+} intracelular multipropósito, mediando muchos procesos regulados por Ca^{2+} . Esta proteína consiste en una cadena polipeptídica con cuatro sitios de alta afinidad para unir calcio, de tal forma que sufre cambios de conformación y adopta su forma activa, excepto que no tiene actividad enzimática por sí misma, pero actúa al unirse a otras proteínas y regula su actividad.
- c) Las CaM-cinasas (proteínas cinasas dependientes de CaM- Ca^{2+}), son cinasas que en ausencia de CaM- Ca^{2+} permanecen inactivas; la unión del complejo CaM- Ca^{2+} altera su conformación permitiendo que el dominio catalítico fosforile el dominio inhibitorio de la subunidad vecina, autoactivándose y fosforilando otras proteínas.

Por lo tanto, la cascada de amplificación de la señal se lleva a cabo por medio de la fosforilación de enzimas, a semejanza para el AMPc. La PKC activada en forma conjunta por el Ca^{2+} y el DAG también colabora en el proceso de propagación y amplificación de la señal hormonal, junto con las cinasas dependientes de calcio.

Este mecanismo, al igual que en el AMPc, la señal se transmite en segundos y se suspende también rápidamente. Para eliminar esta respuesta existen tres mecanismos:

- 1) El IP_3 es rápidamente desfosforilado por fosfatasa específicas, formando IP_2 .
- 2) El IP_3 es fosforilado a IP_4 .
- 3) Bajar la concentración intracelular del calcio, ya sea bombeándolo fuera de la célula (bombas de Ca^{2+} en membrana plasmática y RE) o por su secuestro por algunas proteínas.

Receptores con actividad enzimática

Son el segundo tipo principal de receptores de superficie; responden a señalizadores extracelulares que promueven el crecimiento, proliferación, diferenciación o sobrevivencia de las células de un tejido animal. Las proteínas de señalización reciben el nombre de factores de crecimiento y generalmente actúan como mediadores locales a muy baja concentración. El dominio citosólico de estos receptores tiene una actividad enzimática intrínseca o se asocia con una enzima (figura 6). Estos receptores se dividen en varios subgrupos:

- a) los receptores fosforiladores, es decir, que tiene actividad de proteína cinasa,

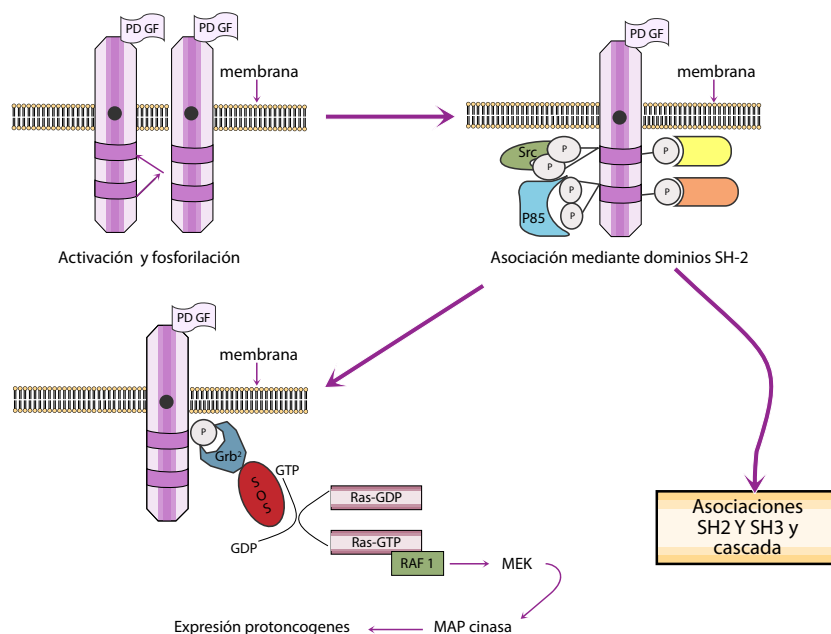


Figura 6. Receptores con actividad enzimática.

- b) los receptores que tienen actividad de proteína fosfatasa, y
- c) los que tienen actividad de *guanilato ciclasa*.

Sus respuestas típicamente son lentas (horas).

- a) **Receptores fosforiladores.** Son receptores que tienen la capacidad de fosforilar a otras proteínas y aun a sí mismos. Hay receptores con actividad de tirosina cinasa (son los más numerosos, existen más de 16 subfamilias), es decir, que fosforilan proteínas en residuos de tirosina; otros tienen actividad de serina/treonina cinasa, ya que fosforilan a las proteínas en estos aminoácidos, y un tercer tipo, con actividad de *histidina cinasa*.

Dentro de los receptores con actividad de tirosina cinasa podemos mencionar a los receptores de insulina, del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Estos receptores tienen una porción extracelular con la que fijan el ligando, una zona transmembranal y la porción citoplasmática. En el caso de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico y del derivado de plaquetas, se trata de una sola cadena polipeptídica. En el caso del receptor de insulina, éste está formado por dos cadenas denominadas beta y dos denominadas alfa, localizadas en el exterior de la célula; las cuatro cadenas están unidas por puentes disulfuro (S-S).

Todos estos receptores, al ser activados, se autofosforilan; es decir, un receptor fosforila a otro igual, y esto ocurre en varios lugares. Después de fosforilarse adquieren una enorme afinidad por una serie de proteínas que se fijan al receptor y forman un enorme complejo. Estos lugares han sido identificados y corresponden a dominios llamados SH2. Entre las proteínas que se han determinado están una cinasa citoplásmica llamada Src, la MAP cinasa (*mitogen activated protein kinase*) y la fosfolipasa C-γ (PLC-γ), las cuales aumentan su actividad y esto los conduce a los efectos finales. La MAP cinasa activada viaja al núcleo para favorecer la expresión de algunos genes de respuesta rápida. Otra de las proteínas activadas es la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI-3 cinasa).

- b) **Receptores con actividad de proteína fosfatasa.** Existen fosfatasas de tirosina que se encuentran ancladas a la membrana. Algunas de ellas tienen una estructura que parece corresponder a un receptor. Así, el antígeno común de los leucocitos llamados CD45 en apariencia tiene la estructura propia de un receptor. Este antígeno CD45 es una glucoproteína abundante en células he-



matopoyéticas; consta de un largo segmento extracelular, una porción corta transmembranal y un segmento largo intracelular con actividad de proteína fosfatasa de tirosina. Se ha planteado la posibilidad de que no sea un ligando soluble el que interactúe con CD45, sino una molécula de la superficie de otras células, es decir, que participara en un tipo de comunicación yuxtacrina. La asociación física entre células del sistema inmune parece tener un papel muy importante en los procesos de diferenciación celular y procesamiento de los antígenos, por lo que esta hipótesis resulta de gran interés.

- c) **Receptores con actividad de guanilato ciclasa.** En las aurículas del corazón se produce y secreta una familia de hormonas peptídicas estrechamente relacionadas, conocidas como natriuréticas auriculares (ANPs). Estos péptidos reciben el nombre de natriuréticos porque favorecen la eliminación de sodio por el riñón, además de agua, lo que induce la relajación de las paredes de los vasos sanguíneos. Estas hormonas son secretadas cuando la presión sanguínea se eleva. El receptor de ANP está presente en el riñón y el músculo liso de los vasos sanguíneos; se forma por una sola cadena polipeptídica y tiene un sitio de unión extracelular para ANP y un dominio catalítico intracelular *guanilato ciclasa*. Así, el receptor con actividad *adenilato ciclasa* una como mensajero intracelular al GMPc en la misma forma que los receptores acoplados a proteína G generan AMPc, excepto que el receptor activado activa directamente a la *adenilato ciclasa*.

Receptores canal

Estos receptores son proteínas integrales de membrana y están formados por varias subunidades. Son proteínas que funcionan como canal que

permite el paso de iones a través de la membrana plasmática. También son llamados *canales activados por ligando*. Al activarse, su función es formar un canal en su estructura, que permita el paso selectivo, a través de la membrana de un ion, lo que desencadena una despolarización de la membrana.

Receptores intracelulares

Las hormonas liposolubles esteroideas y tiroideas son transportadas en el torrente circulatorio formando un complejo con proteínas transportadoras. Una vez que las *hormonas esteroideas* y tiroideas se disocian de sus proteínas, pueden atravesar la membrana por difusión pasiva. Aunque la difusión de las hormonas hacia el interior y el exterior de las células es un proceso al azar, estas hormonas ejercen su efecto sólo sobre las células blanco específicas (*figura 7*). Esto indica que las células blanco deben contener receptores específicos para las hormonas esteroideas que están ausentes en otras células. Los receptores internos son una superfamilia de proteínas que se encuentran en el citoplasma celular y que son referidas como receptores nucleares o esteroideos. Estas proteínas receptoras comparten una organización estructural y funcional con distintos dominios: un dominio de activación transcripcional hormona-independiente (AF-1) localizado en la porción amino-terminal, un dominio interno de unión al ADN (DBD) y un dominio carboxilo terminal de unión a la hormona (HBD). Existen varios subdominios localizados entre HBD y DBD que son importantes para la función del receptor (*figuras 2 y 7*). En ausencia del ligando, estos receptores se unen a una proteína inhibidora, que bloquea el dominio de unión al ADN del receptor, inactivándolos. La unión del ligando al receptor provoca la separación de la proteína inhibidora; de ese modo activa al receptor por la exposición de su lugar de unión al ADN. Una vez que el complejo hormona-receptor penetra en el núcleo,

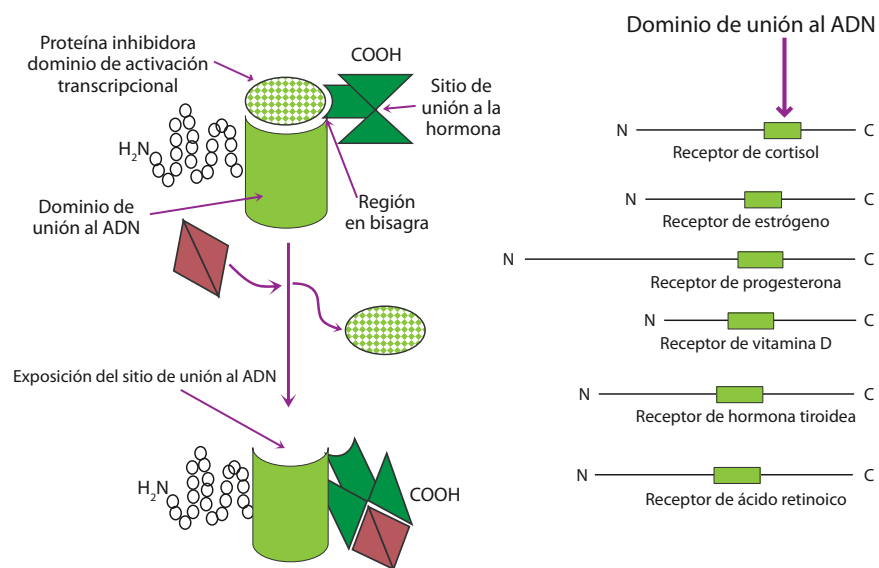


Figura 7. Receptores intracelulares.

el dominio de unión al ADN del receptor se une a las secuencias reguladoras específicas en el ADN (llamados *elementos de respuesta hormonal*), de esta manera regula la transcripción de genes específicos y finalmente la producción de sus proteínas codificadas. La acción de estas hormonas no ocurre de inmediato; los procesos de transcripción (síntesis de ARNm) y traducción (síntesis de proteínas) tardan varios minutos en las células de los mamíferos (figura 8). No obstante lo anterior, un receptor intracelular sólo podrá activar genes si está en la combinación correcta con otras proteínas reguladoras; más aún, muchas de ellas son específicas del tipo celular.

Resulta claro, entonces, que los receptores citoplasmáticos tampoco permanecen estáticos, sino que cambian su localización en la célula, y su

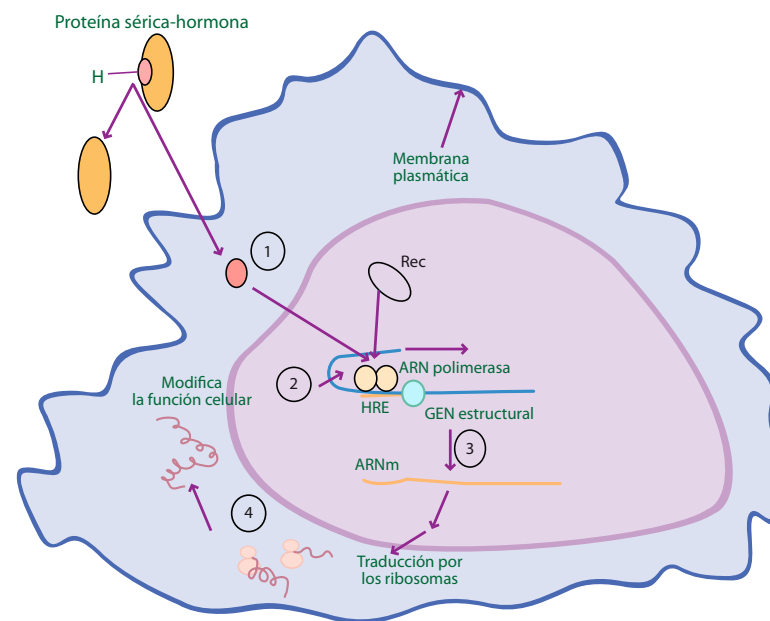


Figura 8. Receptores intracelulares en los procesos de transcripción y traducción.

translocación al núcleo es parte fundamental del mecanismo de transmisión del mensaje.

Hormonas eicosanoides

Las *prostaglandinas* y otros *eicosanoides* son hormonas locales, puesto que son de vida libre breve. Alteran las actividades de las células donde se sintetizan y de las adyacentes. En algunas células las prostaglandinas estimulan la *adenilato ciclasa*, mientras que en otras impiden que sus niveles aumenten.

En respuesta a un estímulo hormonal o de otro tipo, una *fosfolipasa* específica, presente en muchos tipos celulares, libera el ácido araquidónico de



la membrana plasmática. Este ácido es convertido en prostaglandinas por unas enzimas del retículo endoplasmático, con lo que se inicia la formación de PGH₂, el precursor inmediato de otras prostaglandinas y tromboxanos.

Las prostaglandinas, al regular el AMPc, participan en muchas funciones celulares: estimulan la inflamación, regulan el flujo sanguíneo a órganos particulares, controlan el transporte iónico a través de la membrana y modulan la transmisión sináptica.

Tipos de comunicación celular

Comunicación celular: tipos y funciones

La comunicación entre las células se puede clasificar según la distancia a la cual tiene efecto el mensajero químico.

- a) Comunicación *autocrina*: se refiere a sustancias (mensajeros) que afectan a la propia célula secretora, es decir, la célula se comunica consigo misma. Un ejemplo es la noradrenalina liberada por las terminaciones nerviosas adrenérgicas, que inhibe la secreción de más noradrenalina de ese nervio.
- b) Comunicación *paracrina*: se atribuye a sustancias que ejercen su efecto en las células vecinas. Esta comunicación tiene un carácter netamente local. Los mensajeros en este tipo de comunicación celular son las llamadas hormonas locales o mediadores locales; se les ha dado el nombre de autacoides (del griego *autos* = propia y *akos* = remedio), que pretende dar la idea de que son sustancias que produce el mismo organismo para su propia curación o alivio. Por ejemplo, durante la respuesta inflamatoria local se induce vasodilatación por la histamina liberada de los mastocitos del área del tejido dañado.

- c) Comunicación *endocrina u hormonal*: se refiere a una sustancia que es liberada al torrente circulatorio y actúa sobre un tejido blanco distante (células que son “receptoras” del mensaje dado). Ello indica que el mensaje es selectivo, esto es, que va dirigido a alguna célula que pueda captarlo.
- d) *Neurotransmisión (neuronal)*: es la comunicación química a través de las células nerviosas; el lugar de la transmisión de las señales es la sinapsis. Una *sinapsis* es el punto de contacto entre dos neuronas, en ella hay un espacio (el espacio sináptico) que separa a una célula de la otra. El flujo o sentido de la información es unidireccional y va de la neurona, o célula presináptica (que está antes de la sinapsis), a la célula receptora o postsináptica. En esta forma de comunicación, la célula presináptica vierte su mensaje (el cual es llamado neurotransmisor) al espacio sináptico, y este viaja e interacciona con la célula postsináptica, la cual lo recibe y responde.
- e) Comunicación *yuxtacrina o dependiente de contacto*: es la forma de comunicación que existe entre células adyacentes, donde hay moléculas ancladas a la cara externa de la superficie de una célula contigua.
- f) Comunicación *neuroendocrina*: es la llamada secreción neuroendocrina o neurosecreción. En este caso, una célula formada a partir de tejido nervioso secreta su mensaje a la circulación. La neurohormona viaja en el torrente sanguíneo para interaccionar con las células blanco.

Tipos de respuesta a las moléculas de señalización

Las respuestas que producen las moléculas de señalización, dependiendo del mecanismo celular que utilicen, pueden clasificarse en *genómicas*



y *extragenómicas*. Las primeras incluyen acciones directas sobre el ADN que conllevan cambios en el proceso de transcripción para modificar la tasa de producción de proteínas específicas, trátase de enzimas o proteínas estructurales. Este tipo de respuestas son generalmente de latencia larga (minutos, horas o aun días), ello es debido a que las moléculas de señalización que las generan son insolubles en agua, por lo que pueden persistir por un periodo mayor en la sangre o en los fluidos. Además, también pueden modificar el funcionamiento de los tejidos blanco por lapsos muy prolongados; por ejemplo, la diferenciación sexual del cerebro resulta de una acción breve de los esteroides sexuales sobre el órgano en desarrollo, pero se mantiene a lo largo de toda la vida del individuo. De manera general, las respuestas genómicas dan lugar a una respuesta primaria que lleva a la activación directa de un número específico de genes (lo que ocurre en 30 minutos), cuyas proteínas encenderán otros genes para dar lugar a una respuesta tardía o secundaria.

Por su parte, las acciones extragenómicas son de latencia breve y se realizan por medio de interacciones con receptores membranales, donde el hecho de que la molécula de señalización pueda o no atravesar la membrana es intrascendente, ya que el factor crucial que desencadena el efecto es la interacción ligando-receptor; así, aunque dicha interacción ocurra en el exterior de la célula, los efectos tendrán lugar en el interior. En otras palabras, la membrana es una barrera, no tanto para la permeabilidad, sino para el flujo de información. Por ello, son los cambios de conformación del receptor, producto de la interacción con su ligando, los que determinan que esté activo o en reposo. Si bien el mecanismo membranar extragenómico es principalmente usado por aquellas moléculas que no penetran en el interior de la célula, los esteroides pueden actuar sobre ambos mecanismos (como la progesterona en el ovocito).

Finalmente, aunque la respuesta de las células a las moléculas de señalización depende de la combinación en la que actúen (que puede haber millones), ésta será alguna de las siguientes:

- a) diferenciación
- b) división
- c) realización de una función especial (por ejemplo la contracción del tejido o la secreción de otra molécula de señalización)
- d) sobrevivencia
- e) muerte

Sin embargo, una misma molécula de señalización, dependiendo del tipo de célula blanco sobre la que actúe, podría tener efectos diferentes, debido a que la maquinaria intracelular para interpretar e integrar la señal que reciben las células es diferente.

Adaptabilidad

Las células deben ajustar su sensibilidad a una señal; esto requiere que la célula realice un proceso reversible de adaptación y desensibilización, donde un estímulo prolongado disminuye la respuesta celular. En la señalización química la adaptabilidad capacita a la célula para responder a cambios en la concentración de un ligando. La desensibilización puede ocurrir de diferentes formas.

De manera particular, bajo la acción de agonistas algunos receptores migran; el fenómeno más común es que primero se desplacen en la membrana hasta agruparse y formar zonas de alta densidad de receptores; enseguida ocurre la formación de una invaginación de la membrana y se forma así una vesícula endocítica rica en receptores (internalización de receptores), y en un tercer momento esta vesícula se fusiona con los liso-



somas, lo que puede conducir, ya sea a la degradación, o al reciclamiento de los receptores, nuevamente a la membrana plasmática. En el caso de que la molécula de señalización sea internalizada con el receptor, el pH ácido del lisosoma hace que ésta se separe del receptor para que sea destruida. Posiblemente, una de las señales para que un receptor sea internalizado es su fosforilación, mientras que su desfosforilación ocasionará que salga nuevamente a la superficie de la membrana plasmática (*figura 9*).

Además, tanto los receptores intracelulares como los de superficie están sujetos a modificaciones químicas por diversas enzimas (*quinasas*, por ejemplo). Dos modificaciones químicas que regulan los procesos de señalización son la **inactivación del receptor por fosforilación y la inactivación de la proteína de señalización y producción de proteínas inhibidoras**.

Adicionalmente, se sabe que varios receptores pueden ser liberados de las células (receptores solubles), a través de la proteólisis de receptores de superficie o por la expresión de un ARNm “madurado” de manera alternativa. La función de este tipo de receptores es inhibir la actividad biológica del ligando, aunque a bajos niveles pueden potenciar la actividad de este último.

Importancia biomédica

La investigación básica en bioquímica, biología celular, microbiología, genética, fisiología y otras ciencias de la vida ha llevado al hombre a comprender mejor las causas de muchas enfermedades y a encontrar posibles remedios. Los resultados de esta labor apuntan a una premisa general: muchas enfermedades son consecuencia de la presencia de genes que

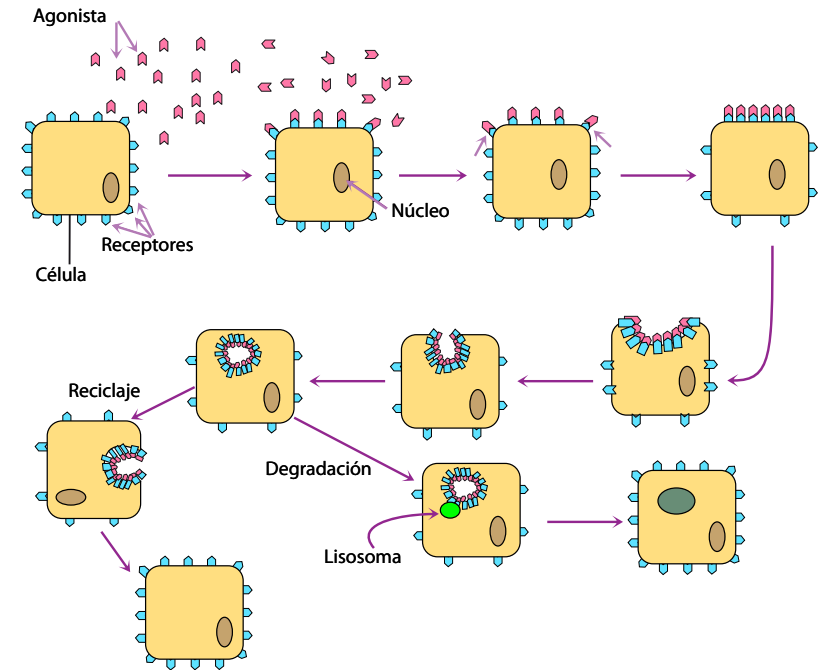


Figura 9. Acción de agonistas en los procesos de agrupación, internalización, reciclaje y degradación de receptores.

acarrear mensajes equivocados (mutaciones) o de un mal funcionamiento en la transmisión del mensaje (transducción de la señal celular).

Conocer los aspectos generales de la acción hormonal y comprender los efectos fisiológicos y bioquímicos de hormonas individuales permite reconocer los síndromes de enfermedades endocrinas causadas por su desequilibrio y aplicar el tratamiento adecuado.



Bibliografía

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell signaling. Molecular biology of the cell. 5ª ed. Nueva York (EE.UU.): Garland Publishing, 2008:721-786.
- Lewin B. Signal transduction. Genes VII. Nueva York (EE.UU.): Oxford University Press, 2000: 800-834.
- Nelson DL, Cox MM. Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism. Lehninger Principles of Biochemistry. 4ª. ed. Nueva York (EE.UU.): W.H. Freeman and Company, 2005: 881-916.
- García-Sainz JA. Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. México (D.F.): Fondo de Cultura Económica, 1998.

10

Bases celulares de la inmunidad



Capítulo 10

Bases celulares de la inmunidad

Mario Pérez Martínez
Olivia Rodríguez Morales

Objetivos temáticos

- Células de la respuesta inmune.
- Características funcionales de la respuesta inmune.
- Inmunodetección de moléculas.

Introducción

El término inmunidad se refiere a la protección de un organismo contra una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas que participan en la respuesta inmune constituyen el sistema inmunológico; sin embargo, las sustancias extrañas no infecciosas también pueden desencadenar respuestas inmunitarias. Por lo tanto, una definición más completa de inmunidad sería: una reacción frente a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos y las macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, independientemente de las consecuencias fisiológicas o patológicas de dicha reacción.

La inmunología es la disciplina que se aboca al estudio de la inmunidad de los seres vivos que, como ya se explicó, es el conjunto de mecanismos que normalmente protegen a los individuos de las infecciones y

eliminan las sustancias extrañas. La respuesta inmunológica permite al individuo interactuar con el medio ambiente, pero a veces, lamentablemente, tiene consecuencias patológicas secundarias.

El animal cuenta con los componentes necesarios para sustentar la vida y, por ello, sus tejidos son sumamente atractivos para los microorganismos que deseen invadirlo y aprovechar en su propio beneficio todas esas fuentes de nutrimentos y de condiciones microambientales óptimas. Aquí se incluyen las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos, que de manera general se consideran agentes infecciosos. No obstante, en la mayoría de los casos los tejidos son altamente resistentes a la invasión microbiana y esta capacidad se debe a la participación de múltiples mecanismos de defensa interconectados entre sí.

Células de la respuesta inmune

Respuesta inmune innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo; está constituida por mecanismos de defensa del hospedero que no son adquiridos tras la exposición a los agentes extraños, no involucran una prolife-



ración de linfocitos clonales en respuesta al antígeno y no requieren de un periodo de activación prolongado.

El mecanismo de defensa más importante dentro de la inmunidad innata es la inflamación aguda de los tejidos, en respuesta a los microorganismos invasores o a un daño físico o mecánico, que consiste en un reclutamiento rápido de leucocitos y moléculas, que se activan y migran desde el torrente circulatorio hasta el sitio de la invasión o del daño. Dentro de las células que participan en el proceso inflamatorio se cita a los *neutrófilos* y *macrófagos*, que en conjunto son llamados fagocitos (*cuadro 1*). Además participan las *células dendríticas*, los mastocitos o células cebadas, las *células asesinas naturales* o *linfocitos NK* (del inglés *natural killer*). También intervienen proteínas de la sangre, que incluyen componentes del *sistema del complemento*, otros mediadores de la inflamación y proteínas que de manera genérica se conocen como *citocinas*, las cuales regulan y coordinan diversas funciones de las células del sistema inmunitario.

Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune adaptativo está compuesto por millones de clones de linfocitos, con receptores específicos hacia los diferentes agentes extraños y con una respuesta de larga duración en contra de éstos.

Las principales células del sistema inmune adaptativo son los *linfocitos*, las *células presentadoras de antígenos* y las *células efectoras*. Los linfocitos reconocen y responden de forma específica a antígenos extraños, para lo cual adoptan una de las dos clases de respuestas que son capaces de emitir: la respuesta mediada por la síntesis de anticuerpos, llevada a cabo por los linfocitos denominados *células B*, y que se conoce como *inmunidad humoral*; y la respuesta mediada por células, llevada a cabo por linfocitos llamados *células T*, que se denomina *inmunidad celular*.

Cuadro 1

Características generales de los leucocitos

Leucocito	Diámetro (µm)	Marcadores de superficie	Núcleo	Función
Neutrófilo	8-9	Receptores para Fc, factor activador de plaquetas	3 a 4 lóbulos	Fagocitosis
Eosinófilo	9-11	Receptores de IgE, receptor del factor quimiotáctico para eosinófilos	Bilobulado	Fagocitosis y reacciones de hipersensibilidad
Linfocito	7-8	Moléculas CD, receptores para citocinas, receptores para las células T o B (TCR o BCR), inmunoglobulinas de superficie	Redondo y prominente	Inmunidad celular e inmunidad humoral
Monocito	10-12	Receptores para Fc, HLA de la clase II	En forma de riñón	Presentación de antígenos y fagocitosis

En la inmunidad humoral, las células B son activadas para secretar unas proteínas denominadas *anticuerpos* o *inmunoglobulinas (Ig)*, que circulan en el torrente sanguíneo y son solubles en otros fluidos corporales, donde pueden unirse específicamente al antígeno extraño que estimuló su síntesis. En la inmunidad celular, las células T activadas reaccionan directamente en contra de un antígeno extraño, que es presentado a ellas sobre la superficie de una célula hospedera, y su función consiste en destruir a los microorganismos intracelulares o a las células infectadas por éstos. En otros casos, la célula T produce moléculas que actúan como señales para activar a los macrófagos y, a su vez, destruir al agente invasor que estos últimos han fagocitado.



Células de la respuesta inmune innata

Las principales células efectoras de la inmunidad innata son los *neutrófilos*, los *fagocitos mononucleares* o *macrófagos*, los *mastocitos* o *células cebadas* y los *linfocitos NK*. Cada uno de estos tipos celulares interviene de modo diferente en la respuesta frente a los patógenos. Algunas de las células de la inmunidad innata, sobre todo los macrófagos y los linfocitos NK, secretan citocinas que activan a los fagocitos y estimulan la reacción celular de la inmunidad innata, lo que se conoce como inflamación. La inflamación consiste en la atracción de leucocitos y la extravasación de varias proteínas plasmáticas en las zonas de la infección, así como en la activación de estos leucocitos y proteínas para eliminar al agente infeccioso.

Neutrófilos

Los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares, constituyen la población más abundante de leucocitos circulantes e intervienen en las primeras fases de la respuesta inmune. Los neutrófilos circulan en forma de células esféricas, de 12 a 15 μm de diámetro, con numerosas proyecciones membranosas. El núcleo de un neutrófilo está segmentado entre tres y cinco lóbulos conectados por puentes de cromatina, de ahí el término de leucocito polimorfonuclear. El citoplasma contiene gránulos con diversas proteínas, enzimas y sustancias microbicidas que participan durante el proceso inflamatorio.

Los neutrófilos se originan en la médula ósea y proceden de una estirpe común a la de los fagocitos mononucleares. Los neutrófilos pueden migrar a las zonas de infección en pocas horas, tras la entrada de los microorganismos. Si un neutrófilo circulante no se atrae hacia una zona de inflamación en este periodo, sufre una muerte programada (*apoptosis*) y suele ser fagocitado por macrófagos residentes en el hígado o en el bazo.

Macrófagos

El sistema mononuclear fagocítico está formado por células que tienen un linaje común, cuya función más importante es la fagocitosis. Las células del *sistema mononuclear fagocítico* se originan en la médula ósea, circulan en la sangre y maduran y se activan en diferentes tejidos.

El primer tipo celular que entra en la circulación periférica después de abandonar la médula ósea no está totalmente diferenciado y se denomina monocito, el cual presenta un diámetro entre 10 y 15 μm y está formado por un núcleo en forma de alubia y un citoplasma granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos del citoesqueleto. Los MF son formas maduras de los monocitos, que se establecen en los tejidos y pueden adoptar diferente forma cuando son activados por estímulos externos. Algunos desarrollan un citoplasma abundante y reciben el nombre de células epitelioides debido a su parecido con las células epiteliales de la piel. Los macrófagos activados pueden fundirse para formar células gigantes multinucleadas.

Los fagocitos multinucleados están presentes en todos los órganos y tejidos conectivos y reciben nombres especiales para designar su localización específica. Por ejemplo, en el sistema nervioso central se llaman *células microgliales* (o *microgliocitos*); cuando revisten a los sinusoides vasculares del hígado, *células de Kupffer*; en las vías respiratorias pulmonares, *macrófagos alveolares*, y los que se encuentran en el hueso reciben el nombre de *osteoclastos*.

Células cebadas o mastocitos

Las células cebadas o mastocitos son células del tejido conectivo de forma redonda, grandes (de 15 a 20 μm de diámetro) distribuidas a través del cuerpo en el tejido conectivo, debajo de las superficies mucosales,



en la piel y alrededor de los nervios. Se reconocen con facilidad porque su citoplasma presenta un denso empaquetado con grandes gránulos que se tiñen intensamente con colorantes como el azul de toluidina y que a menudo enmascaran al núcleo. Las células cebadas responden a los microorganismos y a diferentes mediadores secretando sustancias que estimulan la inflamación. Los mastocitos del tejido conectivo y de la piel, así como los de las paredes intestinales, difieren, tanto química como estructuralmente.

Linfocitos asesinos naturales (NK)

Los linfocitos NK están implicados en la inmunidad innata contra virus y otros microorganismos intracelulares. Morfológicamente son células grandes y contienen un citoplasma extenso y abundantes gránulos citoplasmáticos. Las células NK se originan probablemente de las mismas células madre de las que provienen las células T, pero no sufren procesamiento tímico. Los linfocitos NK se derivan de precursores de la médula ósea, poseen la apariencia de linfocitos grandes y tienen numerosos gránulos citoplasmáticos, motivo por el que a veces se denominan *linfocitos granulares grandes*. Estas células se encuentran en pequeños números en la sangre y están ampliamente distribuidos en los órganos linfoides. Los linfocitos NK constituyen de 5 a 20% de las células mononucleares de la sangre y del bazo.

Las células NK secretan citocinas, en especial interferón gamma (IFN- γ). El término asesino natural deriva del hecho de que si se aíslan estas células de la sangre o del bazo, destruyen diferentes células blanco sin necesidad de una activación adicional, en comparación con los linfocitos T CD8⁺ (ver más adelante), los cuales deben estar activados para poder diferenciarse en células T citotóxicas, con capacidad para destruir células blanco.

Células de la respuesta inmune adaptativa

Linfocitos

Morfología

Los linfocitos son las células centrales del sistema inmunológico y las únicas células capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes *determinantes antigénicos* o *epítomos*. Los determinantes antigénicos o epítomos son las porciones de los antígenos que son reconocidas de forma específica por los linfocitos individuales y que estimulan una inmunorreacción específica.

Los linfocitos son células redondas u ovoides que miden entre 7 y 15 μm de diámetro y presentan un núcleo redondo grande, que ocupa la mayor parte del citoplasma y que está rodeado por un anillo delgado de citoplasma que contiene retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, ribosomas libres y el aparato de Golgi. El núcleo de los linfocitos se puede observar mediante la tinción con el colorante de hematoxilina y otros. La microscopía electrónica de barrido permite notar que algunos linfocitos presentan superficie lisa, mientras que otros están cubiertos por muchas proyecciones pequeñas.

Las diferencias que existen en el diámetro de los linfocitos dependen del estadio del ciclo celular en el que se encuentren. Los linfocitos vírgenes, que son células que no han sido estimuladas previamente por antígenos, son de menor diámetro (de 7 a 10 μm) y se encuentran en estado de reposo o etapa G₀ del ciclo celular. Como respuesta a un estímulo antigénico, estos linfocitos pequeños pasan a la etapa G₁ del ciclo, en la que aumentan de tamaño (de 10 a 15 μm de diámetro) y reciben entonces el nombre de *linfoblastos* o *linfocitos grandes*.



Tipos de linfocitos

Los linfocitos se localizan principalmente en los órganos linfoides, en la sangre y en el epitelio y lámina propia de las mucosas del organismo (*figura 1*). En términos generales, se puede decir que hay dos tipos de linfocitos, las células T y las células B; sin embargo, dentro de estos dos tipos principales existen diversas subpoblaciones con funciones y características diferentes (*cuadro 2*).

Los nombres de células T y células B se derivan de los órganos en los cuales se diferencian. Las células T lo hacen en el *timo*, el cual es un órgano linfoide lobular localizado en la cavidad torácica, enfrente y debajo del corazón; y las células B en los mamíferos se desarrollan en la médula ósea,

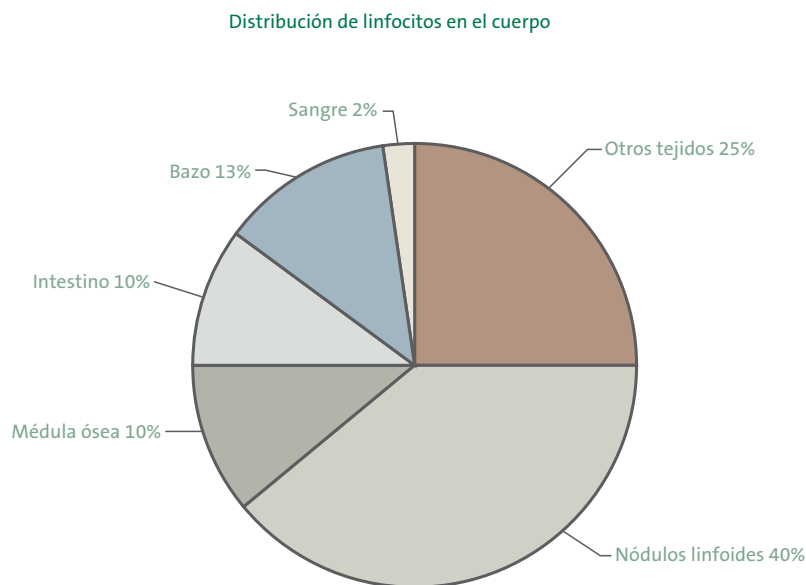


Figura 1. Distribución de linfocitos en el cuerpo.

Cuadro 2

Características generales de los linfocitos B y los linfocitos T

Característica	Linfocitos B	Linfocitos T
Sitio de desarrollo	Médula ósea, bolsa de Fabricio, placas de Peyer	Timo
Distribución	Corteza de los nódulos linfoides y folículos esplénicos	Paracorteza de los nódulos linfoides y hoja periarteriolar del bazo
Circulante	No	Sí
Receptores antigénicos	BCR inmunoglobulina	TCR-heterodímero proteico
Antígenos de superficie importantes	Inmunoglobulinas	CD2,CD3,CD4 o CD8
Antígenos reconocidos	Proteínas extrañas libres	Proteínas extrañas procesadas en antígenos MHC
Inducción de tolerancia	Difícilmente	Fácilmente
Progenie celular	Células plasmáticas y células B de memoria	Células T efectoras y células T de memoria
Productos secretados	Inmunoglobulinas	Citocinas

y en las aves, en la *bolsa de Fabricio*, que es un órgano linfoide con forma de saco redondo, localizado justo por encima de la cloaca.

El patrón de moléculas expresado en la superficie de un linfocito determinado constituye su inmunofenotipo. Al analizar los inmunofenotipos celulares es posible demostrar la gran diversidad de las subpoblaciones de linfocitos.

Existe otra población de linfocitos denominados células asesinas naturales o NK (descritas anteriormente). Los linfocitos NK son una subpoblación de linfocitos que destruyen las células infectadas y las que ya no expresan moléculas del *complejo principal de histocompatibilidad* (MHC)



de clase I (ver más adelante). En función del fenotipo de superficie y de la estirpe celular, los linfocitos NK no son linfocitos T ni B, ni tampoco expresan receptores antigénicos con distribución clonal y reordenamiento somático, como las inmunoglobulinas o los receptores de linfocitos T.

Moléculas de superficie de los linfocitos

Los linfocitos T tienen una especificidad restringida por los antígenos; sólo reconocen antígenos peptídicos que se unen a las proteínas del hospedero codificadas por genes del *complejo principal de histocompatibilidad MHC* (del inglés *major histocompatibility complex*) y que se expresan en la superficie de otras células. Como resultado, estas poblaciones T reconocen a los antígenos asociados a la superficie celular y responden a ellos, pero no a los antígenos solubles. Los linfocitos T presentan subpoblaciones funcionalmente distintas, entre las cuales las mejor definidas son los *linfocitos T cooperadores*, denominados también *Th* (del inglés *helper*) o CD4+, debido a la molécula de superficie que presenta (ver más adelante) y los *linfocitos T citotóxicos*, llamados también *Tc* (del inglés *T cytotoxic*) o CD8+. En respuesta a la estimulación antigénica, los linfocitos Th sintetizan unas proteínas llamadas *citocinas*, cuya función es estimular la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T y B, los macrófagos y otros leucocitos. Los Tc destruyen las células que producen antígenos extraños, como células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares.

Hasta que se identificaron las proteínas existentes en la superficie de los linfocitos fue posible percibir sus subpoblaciones. Muchas de estas moléculas de superficie han sido caracterizadas, especialmente en humanos y en ratones. Cada molécula tiene un nombre químico o funcional, así como una designación de *grupos de diferenciación* o *CD* (del inglés *cluster of differentiation*). En la actualidad, el sistema de nomenclatura CD proporciona números secuenciales a cada molécula: CD4, CD8, CD16, y así

sucesivamente. Debido a que los números son difíciles de recordar, se ha adoptado el principio de que si el nombre de la molécula describe su función o está totalmente aceptado, ese nombre puede usarse. Por ejemplo, FcαR (CD89), interleucina-6R (CD126) y L-selectina (CD62L).

Las moléculas CD presentes en las células de los mamíferos domésticos caen en dos categorías. La gran mayoría de ellas tienen homólogos en humanos y en ratones y por eso tienen el mismo número de CD. Sin embargo, en estas especies se han encontrado varias moléculas de superficie celular en las que no se ha detectado un homólogo en el humano o en el ratón, por lo que se les asigna una abreviación que hace alusión a la especie y el prefijo WC (del inglés *workshop cluster*), como las BoWC1 y BoWC2 en el ganado bovino.

Moléculas de superficie del linfocito que forman parte del Complejo Receptor del Antígeno

Las estructuras más importantes sobre la superficie de los linfocitos son sus receptores para el antígeno. Estos se abrevian como *TCR* (del inglés *T-cell antigen receptor*) o *BCR* (del inglés *B-cell antigen receptor*). Estos receptores son estructuras complejas que contienen muchas proteínas diferentes, algunas de las cuales se unen al antígeno, mientras que otras tienen la función de enviar señales químicas al interior de la célula. Las subpoblaciones de las células T y B pueden diferenciarse unas de otras por sus TCRs o sus BCRs, respectivamente.

El receptor CD4 se encuentra sólo sobre células T que reconocen antígenos exógenos procesados, las células T colaboradoras o *Th*; CD4 es un receptor para moléculas del *complejo principal de histocompatibilidad clase II* o *MHC clase II*. Por otra parte, CD8 sólo se encuentra sobre células T que atacan y matan células anormales, células T citotóxicas o *Tc*. CD8



es un receptor para moléculas del *MHC clase I*, que se requiere para el reconocimiento del antígeno endógeno procesado. La relación entre células que contienen CD4 en su superficie ($CD4^+$) y las que contienen CD8 ($CD8^+$) en la sangre puede usarse para estimar la función del linfocito. Una cuenta elevada de CD4 implica una reactividad linfocítica incrementada debido a la predominancia de células colaboradoras; mientras que una cuenta alta de CD8 conlleva una reactividad linfocítica disminuida. Es de llamar la atención que en otras especies animales el receptor CD4, además de contenerlo las células Th, también puede encontrarse en monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos.

Células presentadoras de antígeno (CPA)

Las células presentadoras de antígenos (CPA) son poblaciones celulares especializadas en captar microorganismos y otros antígenos, exponerlos a la acción de los linfocitos y secretar señales que estimulen la proliferación y la diferenciación de éstos. Por acuerdo, el término CPA se refiere a una célula que presenta antígenos a los linfocitos T. El tipo más importante de CPA que interviene en el inicio de las respuestas celulares T es la célula dendrítica. Los macrófagos presentan antígenos a los linfocitos T durante las respuestas inmunitarias celulares, y los linfocitos B actúan como CPA para los linfocitos T colaboradores (Th) durante las respuestas inmunitarias humores. Un tipo de célula especializada, denominada célula dendrítica folicular, presenta antígenos a los linfocitos B durante determinadas fases de la respuesta inmune humoral.

Células dendríticas (DC)

Las células dendríticas o DC (del inglés *dendritic cell*) desempeñan una función importante en la captación del antígeno y en la inducción de las respuestas de linfocitos T a antígenos proteínicos. Las DC se localizan

por debajo del epitelio y en la mayor parte de los órganos, donde están preparadas para captar antígenos extraños y transportarlos a los órganos linfáticos periféricos. Las DC se caracterizan por tener un cuerpo relativamente pequeño y muchas proyecciones citoplasmáticas largas, las cuales le confieren el nombre. Se considera que las DC incrementan la eficiencia de captación del antígeno y maximizan el contacto entre las DC y las otras células. De estas células existen dos subpoblaciones: las DC mieloides, que incluyen a las células de Langerhans (DC epidermales) y se derivan de los monocitos de la sangre, y las DC linfoides, que se encuentran en los órganos linfoides y en la sangre.

Las DC se producen en la médula ósea a partir de células madre. Las DC inmaduras migran así a todo el cuerpo, por lo que pueden encontrarse en casi todos los órganos, excepto en el cerebro, partes del ojo y en los testículos. Predominan especialmente en los nódulos linfoides, la piel y las superficies mucosales, donde con frecuencia se localizan los microorganismos invasores.

Macrófagos

Sus características morfológicas ya fueron descritas en la sección “Células de la Inmunidad Innata”, como fagocitos profesionales; sin embargo, el macrófago puede ser considerado también como una CPA “semiprofesional” debido a que, una vez que los antígenos son captados por ellos, una porción es procesada y presentada a las células T sensibilizadas; esto se debe a que gran parte del antígeno ingerido es destruido por las proteasas y oxidantes lisosomales en su interior, por lo que su procesamiento del antígeno es ineficiente, de ahí el calificativo de “semiprofesional”. No obstante, son las CPA más accesibles y, por lo tanto, también las más estudiadas.



Células B

Los linfocitos o células B también pueden funcionar como CPA, ya que tienen receptores capaces de unir moléculas completas del antígeno. Estas células ingieren y procesan los antígenos antes de presentarlos a los linfocitos T sintetizados, en asociación con las moléculas del MHC de clase II. Las células B probablemente tienen un papel de menor importancia en el procesamiento del antígeno para la respuesta inmune primaria, pero de mayor relevancia para la respuesta secundaria cuando el número de células B aumenta.

Células efectoras

Células plasmáticas (CP) o plasmocitos

Estas células se desarrollan a partir de las células B que han sido estimuladas por un antígeno. El mayor número de éstas se observan en el bazo, la médula de los nódulos linfoides y la médula ósea. Morfológicamente son células ovoides de 8 a 9 μm de diámetro. Tienen un núcleo característico, redondo excéntrico con la heterocromatina dispuesta en forma radial con respecto al centro y le proporciona una apariencia de “rueda de carreta” o “carátula de reloj”; además, tiene un citoplasma abundante con un retículo endoplasmático rugoso denso, donde se sintetizan los *anticuerpos* (inmunoglobulinas o gammaglobulinas) y un aparato de Golgi muy desarrollado, en el que las moléculas de anticuerpos adquieren su forma final y se preparan para ser secretadas. Se calcula que la mitad o más del ARN mensajero de las células plasmáticas codifica las proteínas de anticuerpos. Las células plasmáticas pueden producir y secretar hasta diez mil moléculas de inmunoglobulinas (Ig) por segundo.

Las CP se encuentran en el tejido conjuntivo de los órganos linfoides y en los sitios de respuesta inmunológica. Estas células tienen la capaci-

dad de sintetizar y secretar diferentes tipos de inmunoglobulinas y la de tipo IgA es la más abundante en las secreciones de las mucosas.

La presencia de CP en el endometrio se debe a la estimulación antigénica *in situ* y a la migración de linfocitos B (células precursoras) localizados en sitios distantes.

La vida media de una CP va de unos pocos días a varios meses. Es probable que algunas puedan sobrevivir por más de un año en la médula ósea y continuar secretando anticuerpos durante este tiempo.

Anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig)

Los anticuerpos se conocen colectivamente como *inmunoglobulinas* (Ig), y representan los componentes proteínicos más abundantes de la sangre, ya que constituyen cerca de 20% del peso de proteína total en el plasma. Los mamíferos producen cinco clases o isotipos de Ig, cada uno de los cuales media una respuesta biológica característica en consecuencia de la unión con el antígeno. El isotipo más abundante en el suero de la sangre es la IgG, le sigue la IgM y luego la IgA. Además, la IgA es el anticuerpo predominante en secreciones como saliva, leche o fluido intestinal, y la IgE generalmente se encuentra en concentraciones muy bajas en el suero; esta última media las reacciones alérgicas.

Los anticuerpos, sintetizados exclusivamente por las células B, son producidos en billones de formas, cada una con una secuencia diferente de aminoácidos y un sitio de unión al antígeno diferente. Cada célula B produce una especie única de anticuerpo, el cual presenta sólo un sitio de unión al antígeno. Cuando una célula B de memoria es activado por un antígeno (con la ayuda de una célula T colaboradora), ésta prolifera y se diferencia en una célula efectora que secreta anticuerpos. Estas células producen y secretan grandes cantidades de anticuerpos solubles. Los an-



ticuerpos se pueden encontrar en muchos fluidos corporales, pero están presentes en las más altas concentraciones en el suero sanguíneo.

Todas las inmunoglobulinas tienen variantes; por lo tanto, pueden existir, además de las subclases o isotipos, también alotipos e idiotipos, dependiendo de las variaciones en las cadenas ligeras y pesadas que las constituyen como resultado de la duplicación génica o de la variación entre individuos de la misma especie, por la homocigosis o heterocigosis, y de las variaciones en la secuencia de aminoácidos existentes en la estructura de sus cadenas ligeras y pesadas.

Células de memoria

Una característica principal del sistema inmunitario es su capacidad de *memoria inmunológica*. La memoria inmunológica es la respuesta inmune aumentada que se desencadena como resultado de la exposición a un antígeno al que ya antes había sido expuesto el organismo.

La respuesta inmune primaria termina en gran parte porque muchas células B de respuesta y células plasmáticas son simplemente removidas por apoptosis. Si todas las células del sistema inmunitario murieran, no se podría establecer la memoria inmunológica, por lo que algunas células B deben sobrevivir para llegar a ser *células de memoria*. Las células de memoria forman una reserva de células sensibles al antígeno para ser llamadas ante una exposición posterior a un antígeno de las mismas características.

Linfocitos T citotóxicos (Tc)

Como ya se mencionó, las células T citotóxicas (Tc) (del inglés *T cytotoxic*) (CD8+) proveen protección en contra de patógenos intracelulares, tales como virus y algunas bacterias y parásitos que se multiplican en el citoplasma de la célula hospedera, donde están protegidos del ataque de los anticuerpos. Los linfocitos Tc combaten a estos patógenos al destruir la

célula infectada antes de que los microorganismos puedan proliferar y escapar de la célula infectada para contagiar otras células. Una vez que los linfocitos Tc han sido activados por una célula presentadora de antígeno, para transformarse en una célula efectora, pueden destruir cualquier *célula blanco* infectada con el mismo patógeno.

Linfocitos T colaboradores (Th)

En contraste con los linfocitos T citotóxicos (Tc), las células T colaboradoras (Th) (del inglés *T helper*) (CD4+) son cruciales en la defensa, tanto en contra de patógenos intracelulares como de extracelulares. Los linfocitos Th ayudan a estimular a las células B para producir anticuerpos que ayuden a inactivar o eliminar a los patógenos extracelulares y sus productos tóxicos. Las células Th activan a los macrófagos para destruir cualquier patógeno intracelular que se multiplica dentro del fagosoma del macrófago, y ayudan a activar a los linfocitos Tc para matar a las células blanco infectadas. Esto lo hace de dos maneras: secretando una variedad de citocinas y desplegando proteínas coestimuladoras sobre su superficie. Una célula Th virgen o nativa activada por una célula presentadora de antígeno, puede diferenciarse en dos tipos distintos de célula colaboradora efectora: 1) *células T_H1*, y 2) *células T_H2*. Las células T_H1 ayudan principalmente a activar macrófagos y células Tc, mientras que las células T_H2 ayudan a activar células B.

Al igual que una parte de la progenie de los linfocitos B, una parte de la de los linfocitos T es estimulada por antígenos, para diferenciarse en células de memoria.

Características funcionales de la respuesta inmune

La manera en que el sistema inmunológico responde ante un estímulo es diversa y depende de las características del estímulo y del tiempo que



se mantiene. Este sistema utiliza distintos mecanismos para neutralizar o eliminar del organismo a los antígenos extraños.

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmunológico puede responder de dos maneras: la respuesta inmune innata, también llamada natural, y la respuesta inmune adaptativa, también llamada adquirida o específica. La primera constituye el primer sistema de defensa contra antígenos patógenos y actúa en forma inmediata. Dentro de las células que participan en este tipo de respuesta se encuentran los macrófagos, los neutrófilos, las células asesinas naturales o NK y los factores humorales como el *interferón gamma* (IFN- γ) y el *factor de necrosis tumoral* (TNF).

Por otra parte, la respuesta adaptativa se caracteriza por ser específica y desarrollar memoria inmunológica, por lo que necesariamente requiere de la exposición del sistema inmunológico a un antígeno. El sistema inmunológico tiene la capacidad de distinguir entre las moléculas propias y extrañas. A esta propiedad se le denomina *especificidad*.

Aspectos generales

De manera general, existen dos tipos de respuesta inmunológica adaptativa o específica: la de tipo celular y la de tipo humoral.

Los linfocitos B y T inician una respuesta sólo después de que reconocen a unas moléculas de superficie extrañas al organismo, denominadas *determinantes antigénicos* o *epítomos*, que son las porciones de los antígenos que los linfocitos individuales reconocen de forma específica y que estimulan una inmunorreacción determinada.

Las respuestas inmunitarias específicas se desarrollan en tres fases. La primera de ellas se conoce como *fase de reconocimiento*, en la que se lleva a cabo la unión de los antígenos extraños a sus receptores específicos localizados en la superficie de los linfocitos maduros.

En la segunda fase ocurre la *activación de la respuesta inmunitaria*. En ésta los linfocitos proliferan, por lo que en cada exposición al antígeno se expanden los clones de los linfocitos. Posteriormente, los linfocitos pasan de ser células de reconocimiento a células que llevan a cabo la eliminación de los antígenos extraños; de esta manera, los linfocitos B se diferencian en células secretoras de inmunoglobulinas y éstas se unen al antígeno soluble activando de esta manera los mecanismos que los destruirán.

La *fase efectora* es la tercera etapa de la respuesta inmunitaria y consiste en la eliminación de los antígenos que desencadenaron la respuesta. Es decir, se lleva a cabo la amplificación de los mecanismos efectores.

La respuesta adaptativa requiere primeramente del procesamiento y la presentación de los antígenos. Esta tarea la llevan a cabo células accesorias conocidas como células presentadoras de antígeno (CPA), las que expresan en su superficie moléculas del *complejo principal de histocompatibilidad* (MHC).

El proceso de englobamiento de material particulado grande lo llevan a cabo unas células especializadas que se conocen como fagocitos. Los fagocitos más comunes son los neutrófilos y los macrófagos.

Los fagocitos pueden captar material particulado porque poseen receptores que reconocen ciertas características de la superficie del material a englobar. Dentro de éstas reviste particular importancia la región variable del anticuerpo (V), que se une a la superficie de un microorganismo, y la región constante (Fc), que se proyecta lejos de la superficie.

Los macrófagos y los neutrófilos poseen *receptores Fc* que se unen a las regiones Fc del anticuerpo en el momento de iniciar el contacto. De esta manera, los fagocitos extienden pseudópodos que rodean al microorganismo y lo capturan para formar un fagosoma.



En la degradación de las bacterias fagocitadas participan los lisosomas, que contienen enzimas líticas. Estas enzimas se unen a las vacuolas de fagocitosis y forman una *vacuola digestiva*, conocida como *fagolisosoma*, que degrada las bacterias. Posteriormente, los componentes no solubles del microorganismo degradado que quedaron dentro de la vacuola constituyen un *cuerpo residual*. Los fagocitos utilizan dos mecanismos generales para destruir los microorganismos que quedan atrapados en el interior de sus fagosomas. Estos mecanismos se diferencian dependiendo de si requieren o no el consumo de oxígeno, por lo que existen mecanismos de tipo oxidativo y de tipo no oxidativo.

En los *mecanismos oxidativos*, ocurre un aumento en el metabolismo de la glucosa que va acompañado de la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la formación de metabolitos que resultan tóxicos para los microorganismos. Por otra parte, aumenta la síntesis de óxido nítrico (NO) por parte de los fagocitos.

Respecto a los *mecanismos no oxidativos*, éstos van acompañados de la disminución del pH al interior del fagosoma y de la síntesis de *lactoferrina* y *lisozima*.

Se ha calculado que un macrófago ingiere 25% de su volumen en una hora y 100% de su membrana plasmática en media hora, lo que indica que debe aumentar la cantidad de membrana en la misma proporción por exocitosis.

Por otra parte, en el proceso de desarrollo de los organismos se presenta la necesidad de eliminar ciertas células, por diversas causas, por mediante un mecanismo conocido como *muerte celular programada* o *apoptosis*. En algunas ocasiones, la eliminación de células se debe a que se produjeron células en exceso o a que éstas formaron parte de estructuras transitorias necesarias en alguna etapa del proceso de formación del

organismo adulto. Una vez muertas las células, se forman restos celulares que son eliminados por medio del mecanismo de la fagocitosis.

En el caso de restos celulares, la fagocitosis de éstos se denomina *autólisis* o *autofagia*. La formación de vesículas fagocíticas va acompañada de la contractilidad del citoesqueleto de la célula. Además, las células fagocíticas contienen importantes cantidades de actina y miosina, que constituyen los microfilamentos que se observan debajo de la vesícula fagocítica en formación.

Procesamiento y presentación del antígeno

Un *antígeno* es cualquier sustancia extraña que puede unirse a receptores específicos de linfocitos e inducir así una respuesta inmune; por ello presenta sitios que el sistema inmunológico reconoce, llamados determinantes antigénicos o epítomos; es decir, las porciones de los antígenos que son reconocidas de forma específica por linfocitos individuales y que estimulan una inmunorreacción específica.

La mayoría de las proteínas con peso molecular superior a los 1 000 daltons, que son ajenas a un organismo, tienen una buena capacidad antigénica. Los polisacáridos simples, como el glucógeno, no son buenos antígenos debido a que se degradan antes de que el sistema inmunológico reaccione contra ellos. Asimismo los carbohidratos más complejos, cuando están unidos a proteínas, son de importancia antigénica, como es el caso de la envoltura celular de las *bacterias gram negativas* y de los antígenos de los grupos sanguíneos de los eritrocitos.

Una vez que son procesados los antígenos, éstos se presentan a los linfocitos T del tipo colaboradores (Th o CD4+). Las CPA atrapan a los antígenos extraños para digerirlos, utilizando para ello las enzimas que contienen sus lisosomas.



Las principales células que llevan a cabo esta función son los fagocitos mononucleares (monocitos-macrófagos), las células dendríticas (interdigitantes y foliculares), los linfocitos B y en algunos casos las células epiteliales o endoteliales.

Los macrófagos (MF) son células que llevan a cabo diversas funciones, que incluyen la fagocitosis, la degradación de antígenos extraños, la remodelación tisular, la producción y secreción de *citocinas*, *quimiocinas* y *factores de crecimiento*. Los MF fagocitan partículas grandes, por lo que son células fundamentales en la presentación de antígenos.

Los macrófagos que han ingerido microorganismos exhiben antígenos microbianos a los linfocitos T efectoros diferenciados (Th o Tc). A continuación, estas células activan a los macrófagos para destruir a los microorganismos.

Los MF se caracterizan por presentar receptores de superficie, dentro de los que se cita el antígeno CD14 para los lipopolisacáridos de las bacterias gramnegativas.

Los residuos de naturaleza peptídica que resultan de la digestión enzimática incluyen a los epítomos de la molécula extraña. Posteriormente, los péptidos obtenidos se dirigen al aparato de Golgi, sitio en el que se unen a ciertas proteínas (*antígenos de histocompatibilidad*) y forman un complejo que después será expuesto en la superficie externa de la membrana celular.

Función de las células T y el reconocimiento del antígeno

El linfocito es la célula central de la respuesta inmunológica. Cuando un linfocito es activado responde dividiéndose y se diferencia en célula efectora.

Los linfocitos T llevan a cabo la *inmunidad de tipo celular o citotóxica*, debido a que su función da como resultado la muerte de células propias

que presentan antígenos de membrana que son reconocidos como extraños; el reconocimiento de un antígeno por la célula T colaboradora o Th es un proceso común para la respuesta inmune de tipo celular y de tipo humoral.

Los linfocitos T que han sido sensibilizados por un antígeno se multiplican y dan origen a subpoblaciones celulares que tienen como función mantener la memoria inmunológica. Como ya se dijo, los linfocitos T presentan el receptor de membrana TCR en su superficie, lo que les permite reconocer antígenos, y el linfocito Th además expresa en la superficie de su membrana la molécula CD4, también llamada antígeno de superficie CD4.

Los antígenos de superficie de la membrana de los linfocitos Th o CD4+ y Tc o CD8+ son glucoproteínas que intervienen en el reconocimiento del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células T de tipo colaboradoras o Th presentan en su superficie el antígeno CD4 que reconoce a las moléculas MHC de la clase II, y los linfocitos T citotóxicos o Tc expresan el antígeno CD8 que reconoce a las moléculas MHC de la clase I.

Cuando la célula T efectora reconoce a un antígeno microbiano en la superficie de la célula blanco infectada, puede emplear al menos dos estrategias para destruir dicha célula. En uno de los mecanismos de muerte de una célula infectada (vía de la perforina), el linfocito Tc generalmente libera una proteína formadora de poro llamada *perforina*, la cual es homóloga al componente C9 del complemento y polimeriza en la membrana plasmática de la célula blanco para formar canales transmembranales. La perforina es almacenada en vesículas secretoras de la célula Tc y es liberada por exocitosis local en el punto de contacto con la célula blanco.

En la segunda estrategia de muerte (vía CD95 o Fas), la célula Tc también activa una muerte programada por la inducción de una cascada de



una familia de proteasas llamadas *caspasas* en la célula blanco, pero de una manera indirecta donde se involucra la unión de una proteína receptora transmembranal llamada *Fas* sobre la célula blanco.

Activación de la célula B y la síntesis de anticuerpos

La *respuesta de tipo humoral* ocurre por la síntesis y la secreción de las moléculas proteínicas denominadas anticuerpos, a partir de los linfocitos B que se diferencian en células plasmáticas (CP) o plasmocitos.

Esta proliferación celular de los linfocitos B que conduce a la síntesis de anticuerpos tiene lugar en los sitios conocidos como *centros germinales* de los tejidos linfoides. Las células B estimuladas por el antígeno y por las células Th, migran al centro germinal aproximadamente seis días después de que la respuesta comienza. Ahí se dividen rápidamente y los genes de la región variable o región V del BCR que sufren mutaciones somáticas, posteriormente migran a la periferia del centro germinal, donde se encuentran con el antígeno sobre las células dendríticas. Si de la mutación resultó una mayor afinidad del BCR con el antígeno, las células B con estos receptores se dividirán otra vez y dejarán el centro germinal para formar las CP o las células de memoria. Las CP darán lugar a los anticuerpos o inmunoglobulinas, las cuales están previamente determinadas por otra mutación de los BCR en los centros germinales, y esto favorecerá la presencia de las diferentes subclases o subtipos conocidos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Regulación de la respuesta inmunológica: factores humorales

El sistema del complemento (SC)

Está constituido por un conjunto de proteínas séricas, aproximadamente 20 proteínas solubles, que interactúan entre sí de modo regulado y

funcionan secuencialmente a manera de cascada. Este SC es una de las barreras más eficaces en contra de la infección, ya que permite una amplificación de la respuesta de tipo humoral.

Este sistema atrae a las células inmunitarias al sitio en el que se está desarrollando un proceso inflamatorio y, por otra parte, activa dichas células para que lleven a cabo la destrucción del agente agresor. En algunos casos el SC destruye directamente a los agentes agresores mediante la formación de agujeros en su membrana.

El SC es activado por la presencia de anticuerpos en la superficie de un microorganismo o por la existencia de carbohidratos en su superficie, por lo que este sistema funciona como intermediario entre los sistemas inmunológico innato e inmunológico adaptativo, inducido mediante la síntesis de anticuerpos. Cuando ocurren fallas en los mecanismos de control del funcionamiento del SC las consecuencias pueden ser fatales en el organismo, debido a que la activación descontrolada ocasiona destrucción celular o tisular masiva.

Las citocinas

Son proteínas que median las interacciones celulares y regulan la multiplicación y secreción de las células inmunitarias, por lo que modulan así la respuesta inmune. Los linfocitos B y T requieren de múltiples señales para ser activados y desencadenar este proceso. En este sentido las citocinas constituyen todo un grupo de proteínas que funcionan como moléculas coestimuladoras y reguladoras de la respuesta inmune. De manera general, entre las citocinas que tienen una participación crucial en la respuesta inmunológica se encuentran la *interleucina 1* (IL-1), la *interleucina 6* (IL-6), la *interleucina 12* (IL-12), la *interleucina 18* (IL-18) y el *factor de necrosis tumoral alfa* (TNF- α), entre otras.



Las citocinas actúan básicamente de tres maneras diferentes sobre las células del sistema inmune. En algunas ocasiones tienen un *efecto autocrino* al unirse a receptores de las mismas células que las sintetizaron; en otros casos, tienen un *efecto de tipo paracrino* al unirse a receptores de células localizadas muy cerca de las células que las produjeron; y una tercera forma en la que estas proteínas actúan consiste en inducir efectos en sitios distantes a su lugar de síntesis, lo que en este caso funciona como un mecanismo de comunicación intercelular de tipo endocrino.

Función del tejido linfoide asociado a las mucosas (TLAM)

Entre los componentes del tejido linfoide asociado a las mucosas (TLAM) reviste particular importancia el *sistema inmune mucosal* del intestino. Se ha calculado que 25% de la mucosa intestinal está compuesta por tejido linfoide, ya que a partir de estimaciones cuantitativas se considera que el intestino es de los órganos con mayor densidad de células inmunológicas del organismo.

La función del TLAM se ha dividido en tres categorías principales: 1) el desarrollo linfoide primario, 2) la inducción y amplificación de las respuestas inmunitarias mucosales, y 3) los mecanismos efectores de la inmunidad local.

El trabajo experimental sobre este tema se ha centrado en el estudio de la inducción de la respuesta inmune local y de los mecanismos efectores de la inmunidad local. Por otra parte, llama la atención que el tejido linfoide asociado a las mucosas puede funcionar como un órgano inmunológico primario.

Inmunodetección de moléculas

Muchas técnicas de laboratorio utilizadas de forma habitual en la investigación y en la clínica se basan en el uso de anticuerpos. Asimismo, las técnicas de biología molecular moderna han proporcionado una información fundamental sobre el sistema inmune.

La *inmunodetección de moléculas* se utiliza para el diagnóstico clínico en el laboratorio, básicamente en dos sentidos: primero, un anticuerpo específico puede ser usado para detectar o identificar un antígeno, dicho antígeno puede estar asociado con un agente infeccioso, o simplemente ser una molécula que necesita ser localizada o cuantificada; segundo, al detectar la presencia de un anticuerpo específico en el suero, es posible determinar si un animal ha estado expuesto a un organismo en particular. Con esto se dispone de una herramienta útil para establecer un diagnóstico clínico o determinar el grado de exposición de un individuo o población a un antígeno infeccioso.

Por otra parte, la detección de otras moléculas del sistema inmune que no son anticuerpos, como las citocinas, o bien, reacciones bioquímicas que se llevan a cabo mediante el sistema inmunológico, como la fijación del sistema del complemento, es de gran utilidad en el área científica y diagnóstica.

La medición de las interacciones antígeno-anticuerpo con fines diagnósticos se denomina *serología*. Las *técnicas serológicas* pueden clasificarse en tres amplias categorías: 1) las *pruebas primarias de unión*, las cuales miden directamente la unión del antígeno al anticuerpo, 2) las *pruebas secundarias de unión*, que miden los resultados de la interacción antígeno-anticuerpo *in vitro*. Estas pruebas son generalmente menos sensibles que las primarias, pero su aplicación puede resultar más simple y requieren de una tecnología más sencilla, y 3) las pruebas *in vivo*,



en donde los anticuerpos se pueden utilizar como una herramienta para localizar antígenos tisulares *in situ*. Para este fin, los anticuerpos se combinan con sustancias que los hagan visibles, procurando que esta sustancia no interfiera con la especificidad de su reacción.

Cuando se utiliza un microscopio para la detección de anticuerpos *in situ*, éstos se acoplan con moléculas fluorescentes y se incuban con las células o los tejidos en los que se desea identificar directamente al (los) antígeno(s) determinado(s).

En la inmunodetección de un antígeno y observación de la reacción por microscopía electrónica se utilizan anticuerpos unidos con sustancias electrodensas, como la ferritina. Asimismo, se puede unir el anticuerpo con oro coloidal (sonda electrodensa), lo que permite observar el antígeno.

Inmunocitoquímica

En la década de los sesenta se utilizaron por primera vez enzimas como marcadores para evidenciar las uniones *antígeno-anticuerpo*. Esta reacción se logra al poner en contacto una enzima con un sustrato determinado, con lo que se forma un precipitado coloreado, que es visible al microscopio óptico. Actualmente se dispone ampliamente de las técnicas *inmunoenzimáticas*, cuyo principio radica en el uso de *anticuerpos monoclonales* contra antígenos de superficies membranales o intracelulares y enzimas como marcadores; dentro de éstas destacan la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina, entre otras. La técnica de *inmunoperoxidasa* puede efectuarse en la modalidad directa e indirecta. Asimismo, existen otras técnicas muy sensibles como el complejo *biotina-avidina-peroxidasa* (ABC) y el complejo *peroxidasa-antiperoxidasa* (PAP). De esta manera se ha avanzado en la caracterización inmunofenotípica de las poblaciones y subpoblaciones del sistema inmunológico.

Electroforesis

La *electroforesis* es una herramienta de gran utilidad para la visualización de proteínas en general, ya sea aquellas que tienen propiedades inmunobiológicas, o bien, las de tipo constitutivo de varios tipos celulares, tanto de la respuesta inmune como de las células del organismo en su totalidad.

Las proteínas generalmente poseen una carga neta positiva o negativa, dependiendo de la mezcla de aminoácidos cargados que contengan. Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución que contiene moléculas proteínicas, las proteínas migran en una tasa que depende de su carga neta y de su tamaño y forma. Esta técnica se llama *electroforesis* y fue usada originalmente para separar mezclas de proteínas tanto en solución acuosa libre como en soluciones inmersas en una matriz porosa, como el almidón.

Actualmente esa matriz porosa es un *gel de poliacrilamida*, que se prepara por la polimerización de sus monómeros constituyentes, y el tamaño del poro del gel puede ser ajustado al tamaño deseado, lo suficientemente pequeño como para retardar la migración de las moléculas proteínicas de interés.

Las proteínas por sí solas no están en una solución acuosa simple, sino que la solución contiene un detergente poderosamente cargado negativamente, el *dodecil sulfato de sodio* o SDS (por sus siglas en inglés *sodium dodecyl sulfate*). Este detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteínicas, causando que se desplieguen en cadenas extendidas o que las proteínas se liberen de sus asociaciones con otras moléculas proteínicas o lipídicas y, que de esta manera, queden libres en la solución.

Cada molécula proteínica se une a grandes números de moléculas del detergente cargadas negativamente, lo cual enmascara la carga intrínseca de la proteína y causa que ésta migre hacia el electrodo positivo



cuando se aplica el voltaje. Como resultado, una mezcla compleja de proteínas se fracciona en una serie de discretas bandas proteínicas acomodadas de acuerdo con su peso. Posteriormente, las proteínas se tiñen para ser detectadas con colorantes específicos como el azul de Coomassie o con una tinción de plata, para una mayor sensibilidad.

Citometría de flujo

Esta técnica es de gran utilidad en el área de la inmunología, ya que se pueden aislar células individuales y clasificarlas en grupos con características en común a partir de una muestra de células heterogénea. Con el *citómetro de flujo* o FACS (del inglés *fluorescence-activated cell sorter*) es posible analizar características morfológicas de un gran número de células fluorescentes que pasan una por una en un flujo a través de un tubo muy angosto mediante mediciones electrónicas de emisión de luz. El citómetro de flujo proporciona datos del tamaño y textura celular, así como de su complejidad interna.

La citometría de flujo constituye una técnica cuantitativa rápida para el análisis de mezclas complejas de células y la identificación de inmunofenotipos.

A partir de la invención de este equipo se han desarrollado técnicas de tinción que aprovechan la sensibilidad de la fluorescencia (cromogenicidad) y del uso de anticuerpos monoclonales.

El aprovechamiento de esta tecnología en la inmunodetección de moléculas cada vez es mayor. Entre sus aplicaciones actuales están: la cuantificación del contenido celular de ADN, la determinación del estado proliferativo de una célula *in vivo* e *in vitro*, determinación del flujo de iones a la célula con relación a su etapa funcional, identificación de subpoblaciones celulares que permiten conocer la etapa de maduración de una célula o su condición funcional, entre otras.

Pruebas primarias de unión antígeno-anticuerpo

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA

Este ensayo consiste en tener disponible un antígeno o un anticuerpo puro, cuya cantidad pueda medirse mediante una molécula indicadora. Cuando la molécula indicadora se une de forma covalente a una enzima, es posible cuantificarla determinando la tasa con que la enzima convierte un sustrato incoloro en un producto coloreado con un espectrofotómetro.

La forma más común de este ensayo es el ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* indirecto en placas de poliestireno de mi-

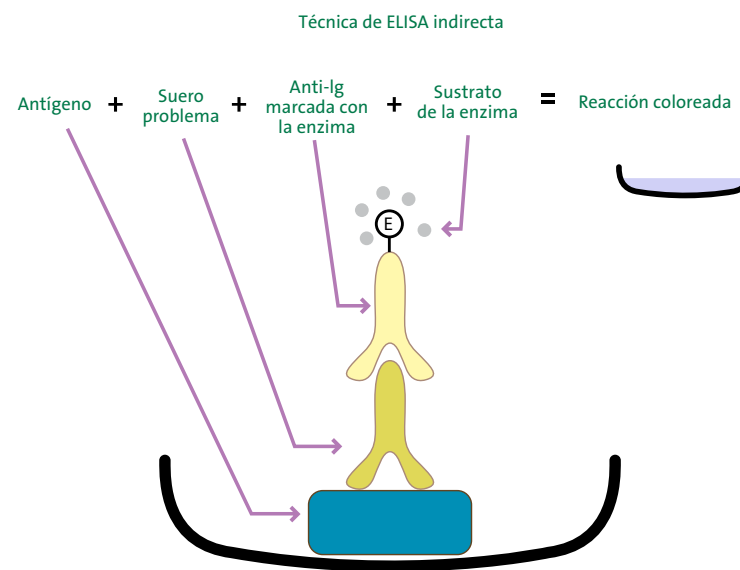


Figura 2. El antígeno está unido a las paredes de un micropozo de la placa de poliestireno. La presencia del anticuerpo problema unido se detecta por una antiinmunoglobulina marcada con una enzima. La adición del sustrato enzimático conduce a un cambio de color proporcional a la cantidad del anticuerpo problema unido.



cropozos (figura 2). En esta técnica primero se cubren los micropozos con la solución del antígeno puro disponible. Las proteínas del antígeno se unen firmemente al poliestireno para que éstos permanezcan cubiertos por una capa antigénica. Posteriormente se adiciona el suero problema, de manera que los anticuerpos en el suero puedan unirse a los antígenos de los micropozos. Los anticuerpos, así unidos al antígeno, se detectan por la adición de una antiinmunoglobulina químicamente unida a una enzima. Este complejo se une al anticuerpo y puede ser detectado y medido por la adición del sustrato enzimático. La enzima y el sustrato desarrollan un producto coloreado en el micropozo, cuya intensidad de reacción es proporcional a la cantidad de antiinmunoglobulina unida a la enzima, la cual, a su vez, es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero problema.

El ELISA de tipo sándwich (figura 3) es una forma modificada de la técnica usada para detectar antígenos. Aquí se agrega la solución del antígeno problema, con el fin de que el anticuerpo puro de captura disponible se una a éste. Después de agregar el antígeno problema se adiciona el anticuerpo puro específico disponible, la antiinmunoglobulina marcada con la enzima y el sustrato, como se describió para la técnica indirecta. En la variante de tipo sándwich se forman tres capas en el fondo del micropozo: anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Este tipo de ELISA se usa, por ejemplo, para encontrar los virus circulantes en la sangre de gatos con leucemia felina.

Radioinmunoensayo

Estos ensayos involucran el uso de radioisótopos como marcadores, y tienen la ventaja de ser técnicas altamente sensibles, pero la desventaja de resultar muy costosas. Una modalidad del radioinmunoensayo es la prueba radioalergoabsorbente (REST) (del inglés *radioallergosorbent test*),

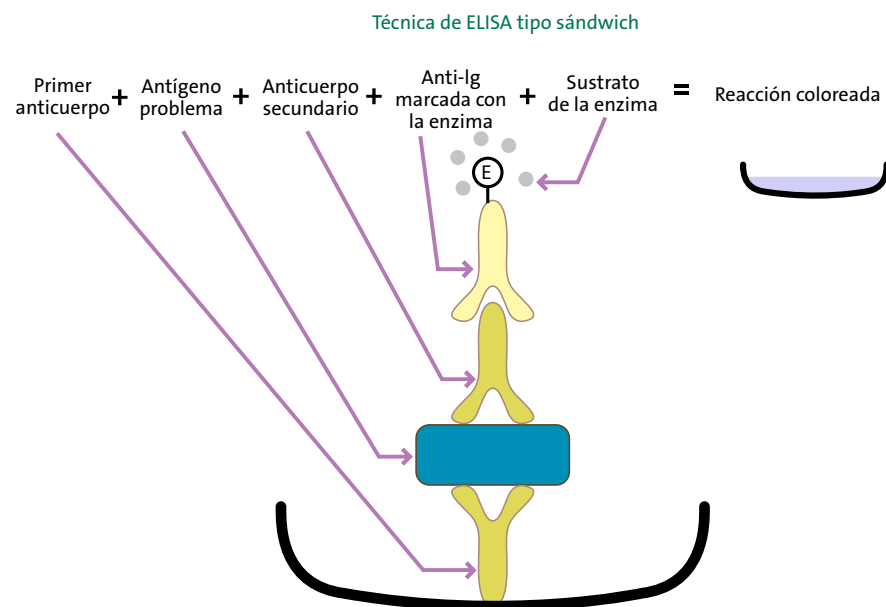


Figura 3. El antígeno problema se une al micropozo mediante un anticuerpo específico. La presencia del antígeno problema unido es detectada por la adición secuencial de un anticuerpo secundario y una antiinmunoglobulina marcada con una enzima. La adición del sustrato enzimático conduce a un cambio de color proporcional a la cantidad del antígeno unido.

la cual mide niveles de IgE específica en animales alérgicos. En esta técnica, unos discos de celulosa impregnados con el antígeno se sumergen en el suero que se va a probar, de tal manera que el anticuerpo se una al antígeno. Posteriormente, el disco se pone en una solución con antiinmunoglobulina E radiomarcada (anti-IgE). Esta antiinmunoglobulina sólo se une al disco si los anticuerpos ya se unieron al antígeno. La cantidad de radiactividad unida al disco es una medida del nivel de actividad del anticuerpo en el suero problema.

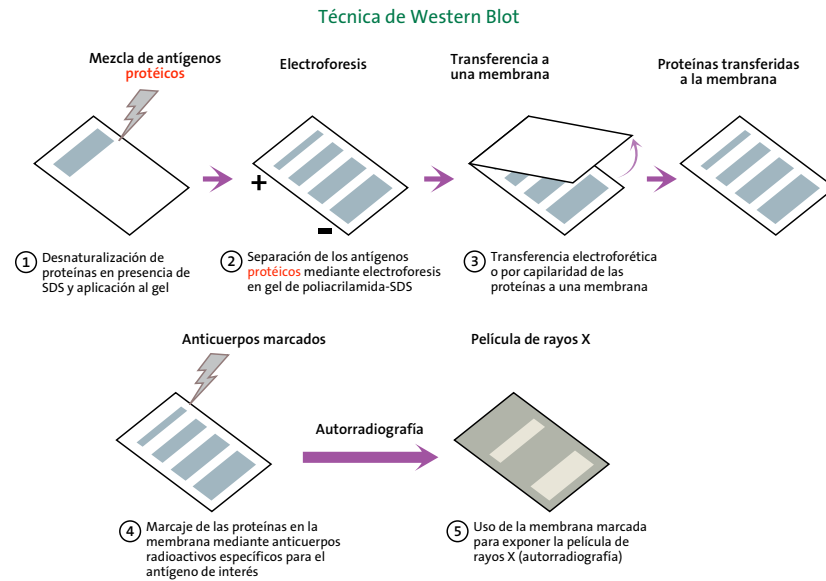


Figura 4. Los antígenos proteicos contenidos en el suero problema son separados por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) (del inglés *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel*) y transferidos a una membrana; las bandas del antígeno son reveladas por el uso de un anticuerpo específico y una antiinmunoglobulina marcada con un isótopo radiactivo o con una enzima. La transferencia puede realizarse de manera pasiva (por capilaridad) o mediante un potencial eléctrico para acelerar el proceso.

Inmunotransferencia tipo Western blot

Esta técnica se utiliza para determinar la cantidad relativa y el peso molecular de una proteína en una mezcla de proteínas u otras moléculas (figura 4). La mezcla se somete primero a una separación analítica, para lo que suele utilizarse una electroforesis en un gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio SDS-PAGE, (del inglés *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel*) descrito previamente, de forma que las posiciones finales de

las distintas proteínas en el gel dependen del tamaño de sus moléculas. A continuación se transfiere el conjunto de proteínas separadas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de soporte mediante acción capilar (transferencia) o por electroforesis, lo que hace que la membrana adquiera una réplica del conjunto de macromoléculas separadas existentes en el gel. La posición del antígeno proteínico en la membrana puede detectarse gracias a su unión con el anticuerpo marcado específico para esa proteína, lo que proporciona información sobre el tamaño y la cantidad de antígeno. La sensibilidad y especificidad de esta técnica pueden incrementarse comenzando con proteínas inmunoprecipitadas en lugar de con mezclas proteínicas crudas. Esta técnica secuencial es sumamente útil para determinar las interacciones entre distintas proteínas.

El nombre de *Western blot*, para referirse a la técnica de transferencia de proteínas desde un gel a una membrana, es un juego de palabras bioquímicas. Southern es el apellido del científico que estudió por primera vez el ADN mediante transferencia desde un gel de separación a una membrana, técnica que desde entonces se llama método Southern (Southern blot). Por analogía, se aplicó el nombre de método Northern (Northern blot) a la técnica usada para transferir el ARN de una gel a una membrana, y el de Western, a la transferencia de proteínas.

Inmunofluorescencia

Los colorantes fluorescentes se emplean comúnmente como marcadores en las pruebas primarias de unión directas e indirectas. Dentro de los más comunes está el *isotiocianato de fluoresceína* (FITC) (del inglés *fluorescein isothiocyanate*), el cual es un componente amarillo que puede ser unido a anticuerpos sin afectar su reactividad. Cuando es irradiado con luz invisible ultravioleta o con luz azul a 290 y 145 nm, el FITC reemite luz visible verde a 525 nm.



La *inmunofluorescencia directa* se usa para identificar la presencia del antígeno. La técnica consiste en incubar las células o el tejido con anticuerpos en contra del antígeno específico, que son marcados con FITC para hacerlos evidentes en el momento que se forme el complejo antígeno-anticuerpo.

La inmunolocalización de antígenos en los tejidos o en cultivos celulares, y la detección de anticuerpos en el suero se pueden realizar mediante una técnica de *inmunofluorescencia indirecta*. A grandes rasgos, esta técnica consiste en incubar las células con anticuerpos no marcados (*anticuerpo primario*), lo que da lugar a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Para evidenciar la formación de dicho complejo se utiliza un segundo anticuerpo (*anticuerpo secundario*), el cual está conjugado con un fluorocromo, lo que permite notar la unión del segundo anticuerpo con el primario. Asimismo, con el desarrollo de la microscopía confocal es posible cuantificar la intensidad de tinción de una célula, así como obtener imágenes tridimensionales, mediante la integración de un sistema computarizado especial.

Pruebas secundarias de unión

Las reacciones entre antígenos y anticuerpos son comúnmente seguidas por una reacción secundaria. Si los anticuerpos se combinan con antígenos solubles en solución, los complejos resultantes pueden precipitarse. Cuando los antígenos son particulados (por ejemplo, bacterias o eritrocitos), en ocasiones los anticuerpos forman cúmulos o se aglutinan. Si un anticuerpo es capaz de activar la vía clásica del complemento, y el antígeno está sobre su superficie, puede ocurrir una lisis celular.

Precipitación

La mezcla de una solución de antígeno soluble con un antisuero fuerte se torna nebulosa en pocos minutos, y posteriormente, floculente; fi-

nalmente, en el transcurso de una hora, un precipitado se deposita en el fondo del tubo. El precipitado consiste en complejos antígeno-anticuerpo. Cuando hay bajas concentraciones de antígeno el precipitado no se forma tan evidentemente, lo mismo ocurre si hay un exceso del mismo.

Inmunodifusión

Una variante de la precipitación es la *inmunodifusión* o la *difusión en gel*, en la que se hacen pozos redondos de aproximadamente 5 mm de diámetro y 1 cm de distancia entre uno y otro, sobre una capa de agar claro. Un pozo se llena con el antígeno soluble y otro con antisuero, de tal manera que los reactantes se difunden radialmente y, al momento en que éstos encuentran proporciones óptimas, aparece una línea blanca opaca de precipitación.

Aglutinación

Debido a que los anticuerpos son bivalentes, es decir, que pueden tener unión cruzada con dos epítomos al mismo tiempo, la unión con antígenos particulados como una bacteria o un eritrocito no propio da como resultado una aglutinación. Si se adiciona un exceso de anticuerpo a la suspensión de partículas antigénicas lo que sucede, al igual que en la reacción de precipitación es que cada partícula puede ser cubierta por un anticuerpo, de tal manera que la aglutinación se inhibe. Esta ausencia de reactividad a altas concentraciones de anticuerpo se denomina *prozona*.

Hemoaglutinación viral y su inhibición

Algunos virus pueden unirse y aglutinar células rojas sanguíneas de mamífero y de ave. Esta *hemoaglutinación* inducida por virus puede ser de ayuda para la caracterización de virus desconocidos. La inhibición de la hemoaglutinación viral por anticuerpos puede ser usada ya sea como un método de identificación de un virus específico, o bien, para medir niveles de anticuerpos en el suero del paciente.



Fijación de complemento

La activación de la vía clásica del complemento por el anticuerpo unido al antígeno causa la generación de complejos que atacan a las membranas, los cuales pueden llegar a interrumpir su integridad. Si el anticuerpo se une a los eritrocitos, éstos se rompen y ocurre una hemólisis. Este fenómeno puede ser usado para medir los niveles de anticuerpos en el suero sanguíneo, en una prueba llamada *prueba de fijación de complemento*.

Técnica de Fijación de Complemento

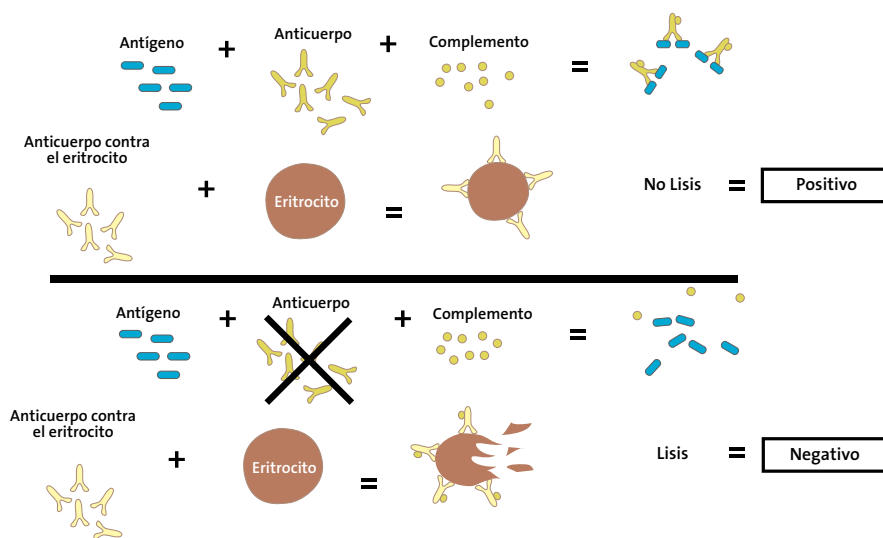


Figura 5. Si el complemento es fijado por el antígeno al anticuerpo problema, entonces no estará disponible para unirse al anticuerpo del sistema indicador (eritrocitos de carnero); por lo tanto, no habrá lisis de éste, dándose un resultado *positivo* de la prueba. En ausencia del anticuerpo problema, el complemento no se fija y, por lo tanto, está disponible para unirse al anticuerpo del sistema indicador y lisarlo, obteniéndose un resultado negativo de la prueba.

En la prueba de fijación de complemento (*figura 5*) se incuban el antígeno y los anticuerpos (el suero problema desprovisto de su complemento intrínseco por calentamiento a 56°C) en presencia de un suero normal de cuye, como fuente de complemento (el suero de cuye es el más comúnmente usado debido a que su complemento lisa bien los eritrocitos de carnero); cuando reacciona la mezcla antígeno-anticuerpo-complemento, la cantidad de complemento libre que permanece en la mezcla se mide adicionando un sistema indicador, que consiste en eritrocitos de carnero cubiertos de anticuerpo. La lisis de estas células (vista como una solución roja transparente) es un *resultado negativo*, porque indica que el complemento no fue activado y el anticuerpo estuvo ausente del suero problema. La ausencia de lisis (vista como una suspensión oscura de eritrocitos) indica que el complemento fue consumido (o fijado), y constituye un *resultado positivo*.

Pruebas citocidas o de citotoxicidad

El complemento puede causar daño a la membrana no sólo de los eritrocitos, sino de cualquier célula eucarionte y procarionte. Los anticuerpos dirigidos en contra de los antígenos de la superficie celular de estos organismos pueden ser medidos así, al hacerlos reaccionar con anticuerpos y con el complemento, estimando el resultado por muerte celular. Esta modalidad del ensayo se emplea en la identificación de moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC clase I).

Pruebas in vivo

Los anticuerpos pueden ser medidos por su capacidad de neutralizar la actividad biológica mostrada por los microorganismos o los antígenos. Las actividades que pueden ser neutralizadas incluyen la hemólisis de eritrocitos, la lisis de células nucleadas y la enfermedad o la muerte de



animales experimentales. Las reacciones de este tipo están sujetas a un alto grado de variabilidad, debido a que tienden a cambiar gradualmente a lo largo del amplio rango de dosis del organismo o del antígeno. Por esta razón, los resultados obtenidos de una prueba única positiva o negativa de neutralización son generalmente poco empleados. Por ejemplo, 0.003 mg de la toxina tetánica pueden matar a algunos ratones en un grupo problema, pero se requiere de aproximadamente cinco veces esa dosis para matar a todos los animales del mismo grupo. Además, si se desea probar la dosis mínima en que la toxina tetánica mata a todos los animales dentro del grupo problema (dosis letal mínima), será difícil porque es altamente variable. Resulta igualmente complicado estimar con precisión la dosis más alta de la toxina que mataría a todos los animales.

El método más preciso para medir efectos letales de una toxina ha sido la estimación de la dosis en la que se mata 50% de la población del grupo problema. En la práctica, es posible llegar a este punto de corte de 50% por experimentación directa, que se calcula graficando los resultados observados (mortalidad o sobrevivencia) en contra de la dosis de la toxina administrada y proyectando los puntos hasta obtener el punto de corte en donde cae el 50%, por simple estimación matemática. A esto se le llama LD_{50} (del inglés *letal dose 50%*). De manera similar, a la dosis del complemento que lisa 50% de los eritrocitos se le llama CH_{50} . La dosis de organismos que infecta 50% de los animales es la ID_{50} , la dosis que infecta 50% de los cultivos tisulares es la $TCID_{50}$ y la dosis de antisuero o vacuna que protege 50% de los animales retados es la PD_{50} .

Pruebas de neutralización

Estas pruebas estiman la habilidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad biológica de un antígeno cuando se mezcla *in vitro*, con éste.

Pueden usarse para identificar las toxinas bacterianas como la α -toxina de *Clostridium perfringens* o la α -toxina estafilocócica.

Pruebas de protección

Una prueba de protección es una variante de la prueba de neutralización llevada a cabo completamente *in vivo*. Las propiedades protectoras de un antisuero específico se miden por medio de la administración de diluciones crecientes de éste a un grupo de animales de experimentación, el cual puede entonces retarse con una dosis estándar de organismos patógenos o de alguna toxina.

Aunque las pruebas de protección proveen una medición directa de la eficacia terapéutica de un antisuero, están sujetas también a una gran variabilidad experimental, debido a las diferencias entre los animales del grupo; pues difieren en la sensibilidad a la infección, la tasa de absorción del antisuero, el nivel de actividad del *sistema fagocítico mononuclear* y la vida media de la inmunoglobulina administrada pasivamente.

Como en las pruebas de neutralización, los resultados significativos pueden obtenerse sólo si se emplea un gran número de animales en cada grupo experimental y si el reto está cuidadosamente estandarizado. Es común usar una dosis de organismos o de la toxina que contenga un número conocido de LD_{50} o ID_{50} .

Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5ª ed. Filadelfia, EE.UU.: Elsevier, 2004.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. 4ª ed. Nueva York (EE.UU.): Garland Science, 2002.
- Gartner LP, Hiatt JL. Texto atlas de histología. 2ª edición. Querétaro (México): McGraw-Hill, 2002.



- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology. 5ª ed. Nueva York (EE.UU.): Garland Publishing, 2001.
- Karp G. Biología celular y molecular. 3ª edición. México (D.F.): McGraw-Hill, 2002.
- Tizard I. Veterinary immunology. 7ª ed. Nueva York (EE.UU.): Saunders, 2004.
- Young B, Heat J. Wheater's functional histology. 4ª ed. Nueva York (EE.UU.): Churchill Livingstone, 2000.

11

Muerte celular y cáncer



Capítulo 11

Muerte celular y cáncer

María de Lourdes Juárez Mosqueda
Olivia Rodríguez Morales

Objetivos temáticos

- Características del proceso de apoptosis y necrosis.
- Aspectos morfológicos, celulares y moleculares del cáncer.

Introducción

La muerte de las células en los tejidos y organismos fue reconocida por los histólogos y anatomistas del siglo XIX, y en su inicio fue tomada como un proceso de poca importancia o como un fenómeno enteramente pasivo, que ocurría a consecuencia del daño o la senescencia celular. Este punto de vista permaneció sin cambio por más de un siglo, hasta que se identificó que la muerte de las células era parte del contrabalanceo de la división celular que determina el crecimiento de los tejidos. Lo anterior fue originado del estudio de los tumores, donde se estableció que la pérdida celular, además de la proliferación celular, contribuía de manera notoria en la velocidad de crecimiento de los tumores.

Muerte celular

¿Cómo saber si una célula está viva o muerta? Para responder a esta pregunta primero es necesario determinar qué se entiende por *vida*. De for-

ma convencional, la vida ha sido definida como la capacidad que tiene un organismo para mostrar las siguientes funciones:

- a) movimiento
- b) metabolismo
- c) percepción sensorial
- d) reproducción

Si estas cuatro actividades son los rasgos básicos de la vida, entonces, la muerte debe caracterizarse por la ausencia de algunos de estos rasgos. Sin embargo, las células podrían dejar de moverse, pero mantener el metabolismo; dejar de reproducirse, pero ser capaces de mantener el metabolismo y el movimiento; dejar de reproducirse y de moverse, pero ser metabólicamente activas.

Estas consideraciones se aplican tanto a las células individuales como a las que forman parte de los tejidos de un animal. Pero entonces, ¿en qué momento una célula muere y cuáles son las funciones que más apropiadamente deben tenerse en cuenta para definir la pérdida de la vida? Claramente es sabido que las células entran en fases de quiescencia o inactivación, durante las cuales muchas de sus funciones de vida pueden estar resguardadas o ausentes (ejemplos extremos de ello son las esporas y las semillas). Sin embargo, aun después de largos periodos



o de condiciones ambientales adversas, en un ambiente o con señales adecuadas, pueden regresar a la vida. En los tejidos del cuerpo animal las células en ocasiones se vuelven quiescentes cuando no continúan el progreso a través de los procesos secuenciales conducentes a la división celular; durante esta fase deben disminuir o detener su movimiento no sólo en relación con las otras células del tejido, sino también internamente. También deberán adquirir más resistencia a los cambios ambientales (perder la sensibilidad) y, además, dejar de reproducirse.

Por otra parte, también se debe considerar que la muerte celular puede ser a menudo caracterizada diferencialmente, dependiendo del interés científico que lo motive. Para los bioquímicos, la vida puede ser simplemente definida por la presencia de actividad metabólica; sin embargo, para aquellos que trabajan con drogas anticancerígenas, es definida por la capacidad de la célula para dividirse varias veces.

No pocas veces es difícil la distinción entre la vida y la muerte; para ser más específicos, la muerte podría no ser permanente o irreversible, como siempre se ha pensado.

Por otra parte, se ha mencionado que todas las células de un organismo están programadas para morir, pero que son mantenidas vivas por un conjunto de señales y mensajes que las instruyen a sobrevivir, proliferar, diferenciarse y realizar sus funciones. Estas señales pueden provenir de una gran variedad de fuentes, como la matriz extracelular, las células vecinas del tejido en cuestión o de células situadas a gran distancia, y podrían derivarse de contacto físico o secreciones (por ejemplo, factores de crecimiento y hormonas). Se ha indicado que algunas de las señales de *sobrevivencia* son cruciales para evitar que la célula inicie la serie de procesos programados que la lleven a la *apoptosis*.

Para otros investigadores es más importante considerar la definición precisa de muerte que la de vida.

Desde tiempos remotos, en una gran variedad de situaciones del desarrollo de un organismo, se han descrito cambios morfológicos en las células, por ejemplo, durante el desarrollo normal de los tejidos sanos. A estos cambios se les ha dado una gran variedad de nombres. Es en 1972, en un artículo pionero publicado por los patólogos John Kerr, Alastair Currie y Andrew Wyllie en el *British Journal of Cancer*, cuando se menciona por primera vez que existen dos tipos de *muerte celular*, cada cual caracterizado por una apariencia propia; uno de éstos fue asociado con un elemento de autorregulación y control por parte de la célula misma; esto es, una *muerte programada* en cierta forma. Estos investigadores también fueron los primeros en utilizar el término “apoptosis” para este tipo de muerte celular controlada y en identificarla como un proceso fisiológico y patológico importante, distinto de la *necrosis*, que es el otro tipo de muerte celular.

Características del proceso de apoptosis y necrosis

Apoptosis versus necrosis

Necrosis

Este tipo de muerte se asocia sobre todo, pero no exclusivamente, con formas bastante severas de daño celular. Podría decirse que es parecida a la muerte que experimentaría un individuo al ser golpeado por un tren o atropellado por un autobús, donde se tiene poco tiempo para tomar una decisión, hacer un acuerdo o cualquier cosa con relación al fallecimiento. Desde el punto de vista celular, esta muerte es inducida por una alteración fisiológica o por un envenenamiento metabólico grave. A menudo la muerte se caracteriza por el hinchamiento de la célula y la desintegración



rápida del citoplasma y de los organelos, sin evidencia de que la actividad metabólica continúe. Si además se produce elevación de la temperatura, las proteínas y el citoplasma se coagulan (como en un huevo cocido), por lo que esta forma de muerte es referida como *necrosis coagulativa*. De manera particular, en el núcleo el ADN se condensa de forma irregular, particularmente en la periferia, y éste, junto con los demás constituyentes celulares, comienza a desintegrarse de forma fortuita e incontrolada. Los constituyentes vitales de la célula salen rápidamente, lo cual es reconocido por el tejido afectado e inunda el sistema con linfocitos para detener la infección y el daño en éste (respuesta inflamatoria). Finalmente, los restos celulares son engullidos y eliminados por los macrófagos (figura 1).

En otras palabras, la necrosis es inducida por aquellos procesos que tienden a producir un efecto radical e inmediato sobre el metabolismo y demás maquinaria celular, y el tipo de exposición afecta a un gran número de células simultáneamente. Como ejemplo está la respiración de venenos o la ruptura física de las membranas causada por cambios locales en el ambiente osmótico, pH extremo, elevación de la temperatura y traumas físicos. Los venenos metabólicos, como el cianuro, instantáneamente evitan que la célula mantenga los niveles suficientes de energía de su fuente principal, el ATP. Este último, entre otras cosas, es esencial para que la célula conserve el balance sales/agua. Inmediatamente, bajo estas circunstancias, grupos de células sufren cambios; las membranas celulares se alteran, por lo que los iones externos pueden atravesarlas hacia el interior de la célula. Generalmente, lo que se acumula son los iones de sodio y el agua y como consecuencia la célula se hincha; además, los iones de calcio pueden abandonar la célula, y en estadios más avanzados otros componentes citoplasmáticos, principalmente ciertas enzimas, pueden salir de la célula y afectar el tejido circunvecino. El metabolismo celular se

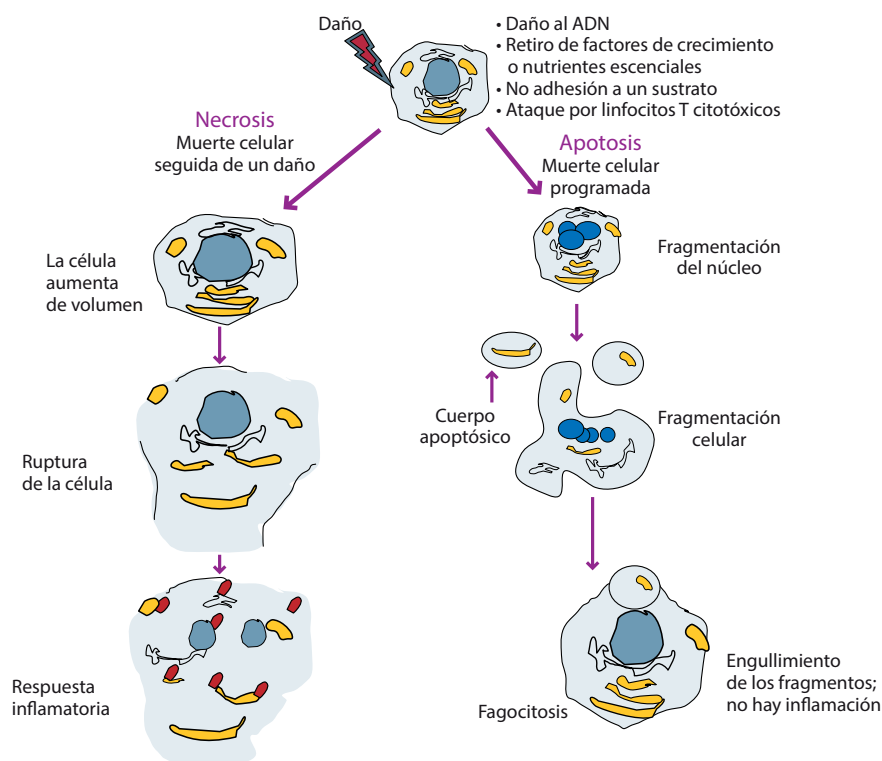


Figura 1. Esquema comparativo entre la necrosis y la apoptosis.

detiene y se inicia la degradación del ADN en una forma completamente inespecífica. Las membranas internas también son afectadas, por lo que las enzimas que contengan son liberadas al citoplasma y pueden también salir de la célula al tejido circunvecino. El reconocimiento del daño por las demás células del tejido dispara una operación de limpieza que involucra la infiltración de células sanguíneas inflamatorias al tejido.

Las células necróticas, como consecuencia de los defectos en las membranas celulares, pueden absorber ciertos colorantes y, por lo tanto,



teñirse. Ésta es la base de una técnica conocida como *tinción vital*, donde las células sanas excluyen el colorante y las células necróticas lo incorporan.

Apoptosis

Este proceso de muerte fue inicialmente referido como necrosis por encogimiento y subsecuentemente renombrado apoptosis, término que ha causado algunos conflictos entre la comunidad científica en cuanto a su definición precisa, derivación y pronunciación. El nombre fue sugerido por James Cormack y acuñado por Kerr, Wyllie y Currie, como ya se ha mencionado; en griego, su significado es “caída de las hojas caducas de los árboles”, o de los pétalos en las flores, y de ahí se generaliza a la caída de las células en los tejidos.

La apoptosis se caracteriza por un encogimiento inicial de la célula, por lo que en los tejidos significa que deberán romper los contactos con las células vecinas o con el medio que las rodea. La consecuencia de este proceso conlleva que el volumen de la célula se vuelva más pequeño, y se acumulen en el citoplasma mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y otros organelos y, en consecuencia, éste tiende a lucir más oscuro. Los organelos permanecen intactos y, hasta mucho después del proceso de muerte, la célula se ve saludable, lo cual sugiere que por un tiempo considerable la célula continúa metabólicamente activa. La apoptosis se caracteriza por involucrar células aisladas y no grupos, es decir es una muerte selectiva. Ya que la membrana plasmática permanece intacta, los constituyentes citoplasmáticos no pueden salir de la célula y no se produce una respuesta inflamatoria. En la parte marginal del núcleo, el ADN o la cromatina se condensa; pero en el caso de la apoptosis, esta condensación es extremosa y causa la formación de áreas de condensación con límites muy marcados, y comúnmente genera áreas de cromatina condensada en forma de media luna que siguen el contorno de la membrana

nuclear. Esto por lo general es referido como *pícnosis*. Al mismo tiempo, se produce la fragmentación del ADN. Este proceso involucra específicamente a una endonucleasa, la cual rompe el ADN en fragmentos de 200 pares de bases. Mientras este proceso de rompimiento del ADN está ocurriendo, el núcleo comienza también a fragmentarse y de la misma manera la célula comienza a dividirse en partes; así, la célula moribunda genera un número de fragmentos celulares llamados cuerpos o fragmentos apoptóticos (*figura 1*). Esto último también es referido como *cariorrhexis* o *cariólisis*. Finalmente, los fragmentos son engullidos o digeridos por los macrófagos o las células vecinas sanas. Uno de los rasgos de la apoptosis es que los organelos continúan luciendo saludables y ciertamente funcionales aun después de ser engullidos. Al final, el contenido de los *fagosomas* es degradado a *cuerpos mieloides*, así referidos por los microscopistas electrónicos.

La apariencia de las células que están sufriendo apoptosis no necesariamente sigue la misma secuencia hasta su fragmentación final. A veces, de la condensación del ADN resulta una esfera densa o una masa sola de cromatina en algunos de los extremos del núcleo. En otras situaciones la célula permanece como un *cuerpo apoptótico* único.

En los cultivos celulares, las células en apoptosis inicialmente tienden a redondearse y romper las uniones entre las células vecinas o de la superficie del plástico o del vidrio de la caja de cultivo en la cual están creciendo. Después sufren una serie de contorsiones en las que protruyen y retraen su superficie de manera rápida y violenta. Esta secuencia de muerte dolorosa ha sido llamada “danza de la muerte” y demuestra que la apoptosis es un proceso activo celular que requiere de una fuente considerable de energía para ejecutar las contorsiones, lo que indudablemente involucra a los elementos del *citoesqueleto*. Por lo tanto, esto aclara por qué una célula que está sufriendo apoptosis puede generar un nú-



mero de fragmentos apoptóticos: desde uno solo hasta docenas de ellos. Sin embargo, no está aclarado qué determina el grado de fragmentación.

Así, en comparación con la apoptosis, la necrosis puede ser vista como una forma de asesinato o sacrificio celular inducido por formas extremas de daño celular. Lamentablemente, el último estadio de digestión y degradación de las células apoptóticas puede ser morfológicamente semejante a la necrosis celular, haciendo difícil la distinción entre ambas formas. Esta situación es más complicada porque la necrosis suele ocurrir de manera natural bajo ciertas circunstancias; esto se observa durante el proceso de producción de los espermatozoides en el testículo. No obstante, la apoptosis es una muerte más compleja, pues constituye una forma de *suicidio celular* que involucra procesos controlados o programados de manera individual. En el proceso de producción espermática, ocurre un gran número de divisiones celulares para producir una cantidad potencial de espermatozoides; sin embargo, muchas de estas células mueren, algunas por apoptosis pero otras por necrosis, en diversos estadios de la secuencia espermatogénica.

Existen tres situaciones bajo las cuales se puede presentar la apoptosis. La primera podría ser considerada como el *suicidio celular utilitario*, es decir, la muerte de una célula en beneficio de la mayoría. Ésta es una situación donde células perfectamente saludables son instruidas por el ambiente en el cual se localizan, para autodestruirse, debido a que existen demasiadas células o a que se requiere espacio para el reposicionamiento y reorganización del tejido. Durante el proceso de desarrollo embrionario esto ocurre frecuentemente. Sin embargo, un mal funcionamiento de la muerte celular utilitaria durante esta etapa da por resultado alteraciones funcionales y deformidades en el embrión. En algunos tejidos adultos, para asegurar el tamaño correcto de un órgano, este tipo de apop-

tosis puede persistir como parte del proceso de regulación del número de células.

La segunda situación, considerada como un *suicidio celular por senescencia*, es la apoptosis asociada a las células gastadas o viejas. Una de las condiciones para que se presente es que las propias células reconozcan que están al final de su vida e inicien el suicidio programado. Otra posibilidad es que el tejido, u otras células, reconozcan que una célula en particular está al final de su existencia y la instruya para iniciar la apoptosis, lo que se podría tomar por una eutanasia facilitada o asistida.

La última situación en la cual se podría disparar la apoptosis en un tejido es a consecuencia de un daño celular. Este daño deberá ser de un tipo y nivel de severidad que no tenga como resultado la necrosis pero que sea compatible con la continuación de la actividad metabólica requerida por la apoptosis. Puede ser considerada como un *suicidio celular altruista*. Aquí nuevamente se debe hacer la distinción teórica de si la célula por sí misma reconoce que está dañada y que sin ninguna ayuda externa puede iniciar el proceso de apoptosis. Una alternativa teórica es que el tejido o las células vecinas reconozcan el daño y la instruyan a cometer el suicidio. El requisito es que la célula pueda detectar niveles mínimos de daño en estructuras vitales como el ADN u otros elementos como la membrana y que, en lugar de intentar reparar el daño, cometa un suicidio.

Para que una célula responda a un daño, éste debe involucrar de manera particular al material genético, al ADN, además de poseer mecanismos que involucren el rastreo lineal de la hélice, que la capaciten para reconocer que su ADN está dañado. Una vez que un defecto en el ADN sea reconocido, se deberá seleccionar entre reparar el daño o cometer el suicidio altruista para remover a la célula que contiene el ADN dañado.



Por otra parte, el tiempo que le toma a la célula el proceso de apoptosis no está claramente definido, pero mucho ha dependido de la eficiencia para determinar el inicio y terminación del proceso, de la técnica utilizada para identificarlo y del sistema estudiado. No obstante, estudios basados en cultivos celulares sugieren que el proceso es extremadamente rápido. Incluso, es de suponerse que las apoptosis que ocurren durante el desarrollo embrionario suceden rápidamente, ya que todos los procesos en esta etapa acontecen así. En el animal adulto, en el caso del epitelio que recubre el intestino delgado, la duración de la apoptosis va de tres a cuatro horas.

Adicionalmente, en los estadios muy tempranos del desarrollo embrionario, la apoptosis parece ser un proceso importante para la remoción de los embriones con anormalidades. También en los estadios posteriores la apoptosis es primordial, ya que conforme el embrión en desarrollo cambia de forma, el tamaño de los tejidos requiere de la remoción de muchas de las células para permitir la reconstrucción del tejido: algunas células deberán ser removidas para dar lugar a que otras se desarrollen; por ejemplo, en la boca, para la formación del paladar, o en las extremidades, para la formación de los dedos de pies y manos (en el embrión existe una membrana entre los dedos de los pies y de las manos y esta membrana interdigital es removida por apoptosis). Así, durante la etapa del desarrollo embrionario, en una gran variedad de animales, la apoptosis será inducida en las células sanas, ya sea porque no sean requeridas en ese momento o después.

Como se sabe, en todos los tejidos del cuerpo, la regulación del número total de células por el control de la división celular, de la apoptosis y de la diferenciación es exitosamente empleada a lo largo de la vida del individuo (por ejemplo, durante 60 años en el ser humano, o tres años en los ratones). Sin embargo, si la regulación se altera, los tejidos pueden

disminuir su tamaño, –como ocurre por la edad en el hombre– o expandirse, como en el cáncer.

Por otra parte, al igual que en el embrión temprano, en los tejidos adultos, –particularmente en el tracto reproductivo– la apoptosis parece desempeñar un papel primordial en la remoción de las células que presenten daño en el ADN. La eficiencia de este proceso, junto con el mecanismo de reparación del ADN, contribuye al hecho de que el cáncer sea un proceso extremadamente raro, si se tiene en consideración el enorme número de divisiones celulares que ocurren en el lapso de vida de un individuo y los billones de células que son producidos.

Otro ejemplo, donde está involucrada la apoptosis en la remoción de células perfectamente saludables, pero que ya no son necesarias, es en las hembras después de la lactación o durante el ciclo reproductivo. En el primer caso, las células funcionales de la glándula mamaria ya no son requeridas para la producción de leche, por lo que la glándula regresa a su tamaño normal; en este tejido la muerte celular es iniciada por señales sistémicas (hormonas) y la consecuencia es el suicidio de las células que ya no son requeridas.

Particularmente durante el desarrollo embrionario, para iniciar un proceso de apoptosis de forma específica, es necesario que las señales de apoptosis se generen en el momento apropiado, por medio de la síntesis de moléculas capaces de inducir la muerte, o bien, que haya una ausencia de señales para mantener la vida en la célula. La producción de estas señales está bajo el control especial de genes reguladores, y es necesario que sean detectadas sólo por las células adecuadas y que se detengan en el punto preciso.

Finalmente, es de tenerse en cuenta que no siempre la alteración del balance entre la producción y la pérdida celular da como resultado el



crecimiento tumoral, ya que es poco probable que sea un fenómeno de “todo o nada”. Por ello, un cáncer en desarrollo no representaría un caso en el que no ocurre la muerte celular o en el que existe simplemente más proliferación celular, pero sí un caso en el que se presenta, aunque ligeramente, menos muerte o más proliferación celular que con el paso del tiempo causa la expansión gradual del cáncer.

Degradación del ADN

En las células eucariontes el ADN está enrollado a intervalos regulares alrededor de las histonas, que son proteínas especializadas asociadas a la cromatina, con lo cual se forman unas pequeñas estructuras, denominadas *nucleosomas*. Durante el proceso de apoptosis, una *endonucleasa* es activada para cortar el ADN entre las regiones de los nucleosomas y producir, en consecuencia, múltiples fragmentos de ADN, generalmente de 200 pares de bases de largo. En las células que sufren apoptosis, el ADN puede ser extraído y separado de acuerdo con los fragmentos producidos. Cuando esto ocurre, el ADN de las células apoptóticas muestra un patrón de bandeo característico, referido como “escalera de ADN” (figura 2).

Sin embargo, en algunas células, la *endonucleasa apoptótica* que media la degradación del ADN produce fragmentos de 300 mil y 50 mil pares de bases. Se cree que estos fragmentos son generados por la enzima topoisomerasa II. Los fragmentos de 50 kilobases corresponderían a los *loops* o lazos de ADN, y los fragmentos de 300 kilobases, a estructuras en roseta formadas por la asociación de seis *loops*. De cualquier forma, alguno de estos fragmentos de ADN, de tamaño muy específico, será generado en las células que llevan a cabo la apoptosis, y que éste es el rasgo que principalmente permite la distinción entre la apoptosis y la necrosis.

Si bien un estadio temprano del proceso de necrosis puede involucrar la desnaturalización o rompimiento de las proteínas celulares como

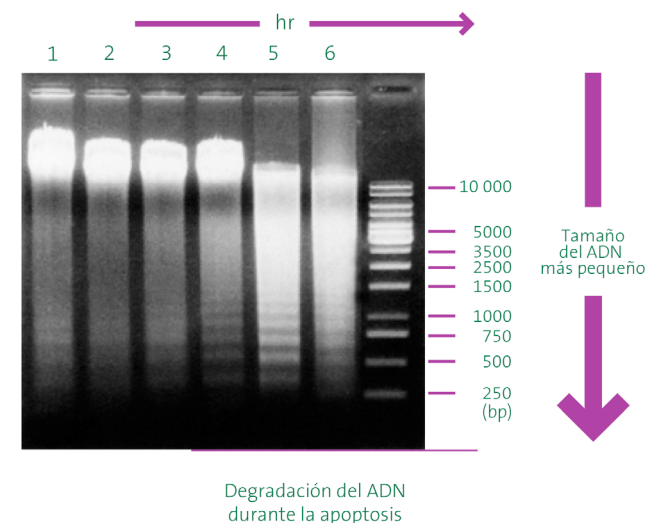


Figura 2. Esquema del rompimiento del ADN en una escalera característica de fragmentos. Con el tiempo (indicado en horas en la parte superior del esquema), los fragmentos del ADN de una célula apoptótica puede separarse por su tamaño en geles de agarosa y visualizados con bromuro de etidio.

son las histonas y con ello se podrían romper las estructuras nucleosómicas y el ADN en cualquier punto a lo largo de éstas, no se produce la activación de *endonucleasas específicas*; del mismo modo, muchas enzimas podrán cortar el ADN en sitios específicos, por lo que se podrían producir fragmentos de diferentes tamaños, pero no con el largo de la unidad nucleosómica, como sucede en la apoptosis.

Maquinaria de apoptosis

Existen muchas proteínas que regulan la apoptosis, cuyos niveles pueden aumentar o disminuir, o cuyo estado de activación o localización celular puede cambiar durante la apoptosis. Entre estas proteínas se incluye la

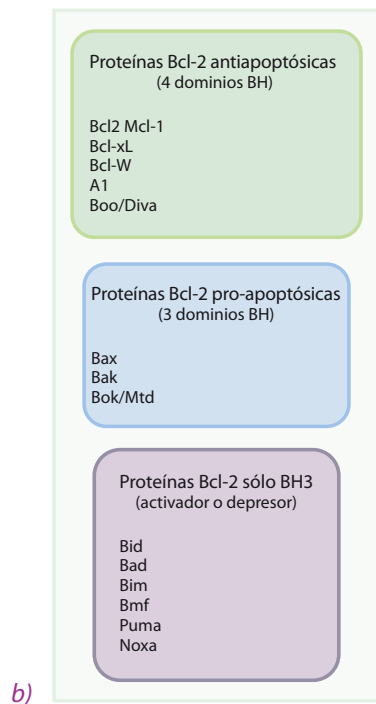
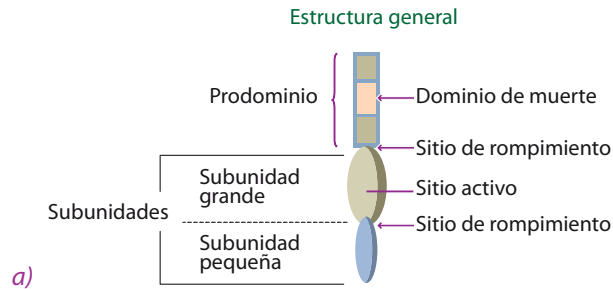


Figura 3. a) Estructura general de las caspasas.
b) Familia de proteínas de Bcl-2 en mamíferos.

proteína p53, la cual reconoce el daño en el ADN y promueve la respuesta de la célula. Otras son una familia específica de proteasas llamadas *caspasas*. Las caspasas son *proteasas* dependientes de calcio que rompen a su proteína blanco en residuos de ácido aspártico. El nombre es un acrónimo de cisteína-aspartasas, ya que presentan en su sitio activo un residuo de *cisteína* y rompen a la proteína blanco en residuos de *ácido aspártico*. Las caspasas existen como precursores inactivos (zimógenos) o procaspasas, pero tras la inducción de la apoptosis son activadas por rompimiento proteolítico. Existen tres tipos de caspasas: iniciadoras, ejecutoras o efectoras e inflamatorias. Las caspasas que actúan al inicio de la cascada proteolítica de la apoptosis son las iniciadoras, las cuales cuando se activan rompen y activan a las caspasas ejecutoras, las que a su vez rompen y activan otras caspasas ejecutoras, así como a proteínas diana específicas. Dentro de su estructura, las caspasas iniciadoras contienen un prodominio grande que a su vez contiene motivos de interacción proteína-proteína, como CARD, y el dominio efector de muerte (DED), colectivamente llamados "dobles de muerte" (*figura 3a*). Estos prodominios les permiten interactuar con moléculas adaptadoras específicas, lo que conlleva a su activación por rompimiento autoproteolítico; esta interacción es la que define la vía apoptótica a efectuarse (intrínseca o vía mitocondria, o la extrínseca o vía receptores de muerte). La activación de las caspasas ocurre por el rompimiento del zomógeno entre la subunidad grande (que contiene el sitio activo) y la subunidad pequeña, lo que permite su dimerización, indispensable para la exposición del sitio activo de la enzima. Otras proteínas son las de la familia *Bcl-2* (*figura 3*), llamada así porque el primer miembro fue descubierto en el linfoma de células B; algunos miembros de las *Bcl-2* suprimen la apoptosis y promueven la sobrevivencia de las células, por lo que en muchos sistemas celulares a menudo decae su ex-



presión durante la apoptosis. Otros miembros de la familia de Bcl-2, que incluyen a las proteínas llamadas *Bax* y *Bak*, promueven la apoptosis, de tal forma que su concentración se incrementa durante el proceso. Los niveles de p53 también se incrementan después de un daño al ADN celular y, de acuerdo con su nivel de incremento, puede iniciar el arresto del ciclo celular o inducir la apoptosis. Así, p53 podría ser la molécula que juzgue si la célula repara un daño o muere, y la familia Bcl-2 la que proporcione la información que ayude a determinar el destino celular, donde las proteasas actuarían como ejecutoras de la célula.

Se sabe que las caspasas rompen muchas proteínas durante la apoptosis y que son responsables de muchos de los rasgos clásicos que se presentan en las células en apoptosis.

Por otra parte el *citocromo-c*, una proteína de cadena respiratoria que reside en la mitocondria, es liberado al citosol durante la apoptosis. La salida del citocromo c de la mitocondria depende de la abertura de poros en la membrana mitocondrial. Estos poros se abren debido a la acción de *proteínas proapoptóticas* de la familia Bcl-2, como Bax, la cual se relocaliza del citosol a la membrana mitocondrial externa.

Además, durante la apoptosis también ocurren cambios en la organización de los componentes de la membrana plasmática. La *fosfatidilserina* (PS), un fosfolípido exclusivo de la capa interna de la membrana, es mantenida ahí de manera exclusiva por la acción de una enzima; sin embargo, en las células que están sufriendo apoptosis, este mecanismo es bloqueado y la PS aparece en la monocapa externa de la membrana, donde actúa como una señal para que otras células fagociten a la célula apoptótica. En los mamíferos, esto parece ser una señal en la superficie de las células apoptóticas de “cómeme”. Las macrófagos poseen en su superficie un receptor para PS que al unir a su ligando ini-

cia la fagocitosis, de las células apoptóticas, pero no sólo los macrófagos llevan a cabo la fagocitosis, sino también otras células como los linfocitos T y B. La *anexina-V* (una molécula anticoagulante) muestra gran afinidad por la carga negativa de la PS, propiedad que ha sido aprovechada como método para detectar las células apoptóticas.

De manera importante, la ingestión de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos no debe provocar una respuesta inmunológica inflamatoria. Para ello, cuando las células apoptóticas son engullidas por los macrófagos el receptor de PS estimula la producción de una molécula de señalización importante, el *factor de crecimiento transformante β* (TGF- β), el cual, de forma activa, inhibe la producción de moléculas proinflamatorias (como la del *factor de necrosis tumoral α*) por las células T. Por otra parte, la superficie de los linfocitos contiene una proteína llamada CD31, la cual puede unir a otra CD31 también presente en las células sanas de los tejidos, y esta interacción entre las dos células parece iniciar una clase de mecanismo activo de repulsión hacia los macrófagos para evitar la fagocitosis. En las células apoptóticas este mecanismo está ausente y, por lo tanto, no pueden repeler a los macrófagos. La falla parece deberse al desensamblaje de uno de los componentes de regulación de la vía de señalización de la CD31.

Adicionalmente, las fallas en la limpieza de los cuerpos apoptóticos, o para retirar a las células apoptóticas, pueden ocasionar una necrosis secundaria elevada a consecuencia de la liberación del contenido celular, dando lugar también a una respuesta inflamatoria. Del mismo modo, como respuesta a los antígenos derivados de las células apoptóticas en desintegración y de las toxinas relacionadas a la muerte celular, se producen autoanticuerpos, muchos de los cuales son generados en contra de las proteínas nucleares, rotas por la acción específica de *caspasas*.



Genes que controlan la muerte celular

Si una célula sobrevive, para proliferar o diferenciarse, o si muere por apoptosis, se debe a la expresión de una serie completa de genes que producen factores (proteínas) que instruyen a la célula a vivir o morir. En el curso de la evolución, muchos de estos genes se han conservado, es decir, existe una similitud considerable entre el ADN codificador y las proteínas que participan en estos procesos, desde los nematodos, moscas, anfibios y mamíferos, hasta el ser humano.

El gen p53 codifica una proteína que desempeña un papel importante en el monitoreo de la integridad genética de las células. Este gen ha sido clasificado como un *gen supresor de tumor*, lo cual significa que la proteína p53 participa en la prevención del cáncer. La p53 es una proteína efectora involucrada en la respuesta celular al daño al ADN, que transforma las señales de las proteínas que detectan radiaciones, daños químicos o errores en el ADN y en cambios en la expresión génica para que la célula los combata. El daño puede ser enfrentado, ya sea la vía de reparación o la de inducción de la apoptosis, removiendo así el daño potencial en el ADN o desapareciendo a la célula, ya que si no fuese así, podrían convertirse en células transformadas malignas. Esto le ha ganado el nombre de “guardián del genoma” (figura 4). La p53 se encuentra por lo común en concentraciones extremadamente bajas, a menudo no detectables, y tiene una vida media muy corta (pocos minutos). Ello se debe a la presencia de un eficiente proceso que marca a p53 para su degradación, facilitado por la unión de la proteína llamada mdm2. Sin embargo, después de la inducción de daño al ADN, la concentración de p53 se eleva rápidamente (entre una y dos horas). Sus niveles también aumentan en casos de hipoxia, aumento de la temperatura y falta de alimento.

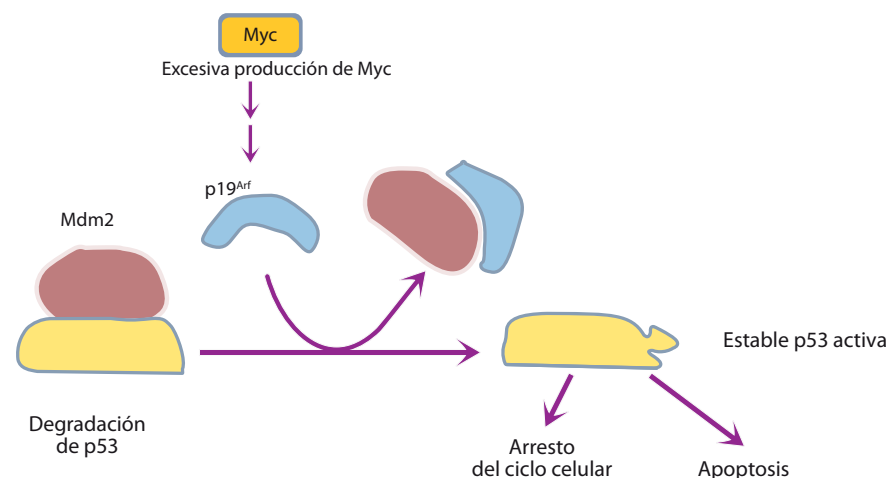


Figura 4. Inducción de arresto del ciclo celular o apoptosis por la excesiva estimulación de una vía mitogénica. Niveles altos de myc causan la activación de Arf, la cual une e inhibe a mdm2 y por lo tanto incrementa los niveles de p53. Dependiendo del ciclo, del tipo celular y de las condiciones extracelulares, p53 puede causar el arresto del ciclo celular o la apoptosis.

La proteína p53 regula de manera positiva la expresión de un gran número de genes, incluyendo aquellos que codifican p21, mdm2, gadd45 y Bax; pero también reprime la transcripción de genes como c-fos, c-jun, IL-6, rb y Bcl-2. La proteína p21 es un inhibidor de la *cinasa dependiente de ciclina I* (CDKI), para lo cual se une a ésta con la consecuente inhibición de la fosforilación y activación de otras cinasas dependientes de ciclinas, lo que lleva a las células a un arresto del ciclo celular. De esta forma, p53 puede arrestar a las células en G1 o G2 (figura 4).

La proteína Bcl-2 tiene un peso molecular de 25-26 kDa, su extremo carboxilo terminal presenta un dominio de anclaje a membrana que la une a la cara citoplasmática de organelos como mitocondrias, retículo endoplasmático y el núcleo. Su función es regular el flujo de iones a través



de las membranas de dichos organelos; por lo tanto, contribuye al mantenimiento del *gradiente electroquímico* de las células.

La primera proteína descubierta que unía a Bcl-2 fue llamada Bax (de *Bcl-2-associated X protein*), una molécula pro-apoptótica que antagoniza los efectos de Bcl-2; al mismo tiempo se descubrió la proteína Bcl-xL homóloga a Bcl-2. El hecho de que Bax pueda unir a Bcl-xL o la Bcl-2 condujo a la idea de que el equilibrio entre la forma de homo y heterodímeros de estas moléculas pro y antiapoptóticas es la que determina si una célula vive o muere. Por otra parte, ambos tipos de proteínas tienen entre sí regiones muy similares en cuanto a la secuencia de aminoácidos llamados dominios BH (*figura 3*). De los cuatro dominios identificados, los dominios BH1 y BH2 están involucrados en la dimerización de las proteínas de la familia Bcl-2. El dominio BH3 es esencial para las propiedades promotoras de muerte de las proteínas proapoptóticas como la Bax. Otros miembros de la familia proapoptótica como la proteína Bid, posee sólo un dominio BH3; mientras que el dominio BH4 se encuentra sólo en la familia de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas y es requerido para su interacción con la familia de proteínas diferentes a Bcl-2, entre las que se incluyen la proteína *cinasa Raf-1* y la *calcineurina*, una fosfatasa dependiente de calcio.

Otras proteínas que intervienen en el proceso de apoptosis son Apf-1 (del inglés, *apoptotic protease activating factor 1*) y las proteínas CARD (del inglés *caspase recruitment domain*).

Apaf-1 participa en la activación de la caspasa-9 y para ello es necesario que forme dímeros a través de un proceso dependiente de ATP y de la unión de un factor accesorio, el citocromo c. Para ello, la Apaf-1 se une al citocromo c mediante un arreglo específico de aminoácidos presente en su extremo carboxilo terminal, llamado secuencia repetida WD-40.

El citocromo c se libera por la abertura transitoria de poros voltaje-sensitivos presentes en la membrana mitocondrial externa. Estos poros (canales aniónicos dependientes de voltaje: VDAC) se abren en respuesta a un decremento en el potencial eléctrico entre el citoplasma y el espacio intermembranal de la mitocondria. La despolarización es inducida porque las Bax forman poros por medio de los cuales los iones cargados positivamente pueden atrevesarlos así, el citocromo c puede salir vía los VDAC abiertos y quizá a través de los poros producidos por las Bax. Junto con ello, otras moléculas proapoptóticas, incluyendo el *factor inductor de apoptosis* (AIF) y la *endonucleasa G*, son liberadas durante la despolarización de la membrana mitocondrial. La liberación del citocromo-c es bloqueada por Bcl-2 y Bcl-xL, por lo que éstas inhiben la activación de la caspasa-9.

En los mamíferos se han identificado 14 caspasas (*tabla 1*), cuya función es romper un amplio rango de proteínas, muchas de ellas estructurales, por lo que su rompimiento permite la condensación celular. También se inactivan muchas proteínas involucradas en el ciclo celular y se afecta la reparación del ADN. Sin embargo, una ADNasa específica es activada gracias al rompimiento, mediado por caspasas, de una proteína inhibitoria que normalmente se encuentra unida a la enzima. Esta ADNasa obviamente lleva el nombre de *ADNasa activada por caspasa* (CAD).

Tabla 1

Algunas caspasas de mamíferos

Caspasas iniciadoras	Caspasas ejecutoras	Caspasas inflamatorias
8	3	1
8	6	4
10	7	5
2		



Las caspasas iniciadoras pueden subdividirse en dos amplios grupos, con base en su habilidad para iniciar su autoactivación (autocatálisis) y por la de activar otras caspasas. Por ejemplo, la caspasa-9 es una caspasa iniciadora que es capaz de su autoactivación cuando se acompleja con Apf-1 y el citocromo c, formando un complejo que ha sido llamado *apoptosoma*. Otras caspasas iniciadoras son las 1, 2, 4, 5 y 11, pero éstas, para su activación, se unen a proteínas CARD; por ejemplo, la caspasa 1 se une a CARD 12, o incluso pueden activarse por señales de estrés. Existe un segundo grupo de caspasas iniciadores, la caspasas 8 y 10, que son activadas en respuesta a señales externas. Estas señales son polipéptidos secretados o unidos a membrana que se acoplan a receptores de superficie para iniciar una secuencia de eventos que provoca la activación de las caspasa. Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Los miembros de esta familia que pueden iniciar la apoptosis son llamados *receptores de muerte* (DRs).

El primer receptor de muerte caracterizado fue *Fas* (aka Apo-1/CD 95) y su ligando es llamado *FasL*. El ligando *Fas* (*FasL*) es expresado de manera considerable en los linfocitos T y en las células naturales asesinas que han sido activadas en respuesta a un estímulo inmune apropiado. La expresión de *Fas* puede ser incrementada por la presencia de infecciones virales. Así, cuando una célula que expresa *Fas* en su superficie entra en contacto con los linfocitos activados o con las células naturales asesinas, es señalada para su desaparición por apoptosis. Así, el sistema *Fas/FasL* está principalmente asociado con la vigilancia y destrucción de las células peligrosas para el organismo. El ligando *Fas* en la superficie de los linfocitos asesinos activa los receptores de muerte de la superficie de la célula blanco. La parte intracelular del receptor *Fas* recluta la proteína adaptadora FADD (del inglés

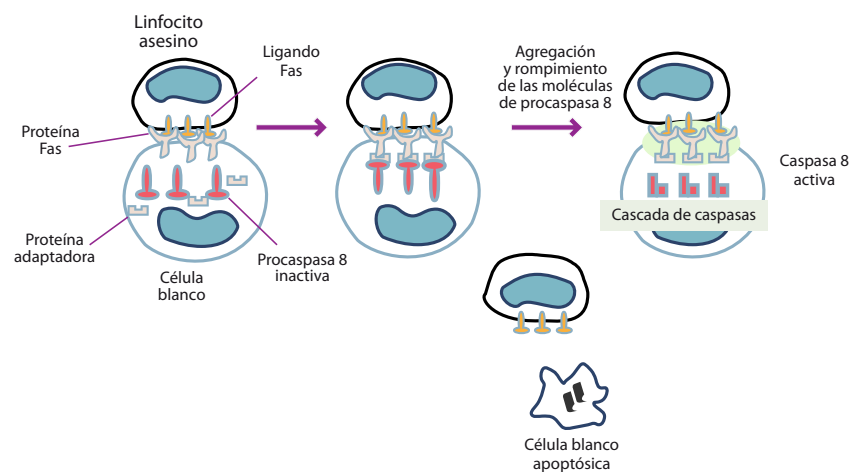


Figura 5. Estrategia por la cual las células T citotóxica inducen la muerte de su célula blanco.

Fas-Associated Death Domain, dominio de muerte asociado a *Fas*) vía el dominio de muerte en cada proteína. Cada proteína FADD recluta una procaspasa iniciadora (procaspasa 8 o 10) vía el dominio efector de muerte tanto de FADD como de la procaspasa, formando un complejo de señalización de muerte en el cual la procaspasa iniciadora es rota, lo cual la activa y permite de otras procaspasas iniciadoras, convirtiéndose en caspasas las cuales rompen y activan a las procaspasas ejecutoras, produciéndose una cascada de caspasas, lo que conduce a la apoptosis de la célula blanco (figura 5).

Los otros miembros más estudiados de la familia son el par receptor-ligando: TNF-R1-TNF- α y DR5 y el ligando inductor de apoptosis TNF-R (TRAIL). Cuando el ligando une a su receptor de muerte (RD), se induce la trimerización del receptor. Todos los receptores tienen un dominio citoplasmático conservado, llamado *dominio de muerte* (DD), gracias al cual pueden unir otras proteínas DD que actúan como adaptadoras para unir a la cas-



pasa 8 y/o 10. En orden de reclutar a las caspasas, el receptor Fas requiere una proteína adaptadora que contenga un dominio de muerte asociado a Fas (FADD); en el caso de TNF-R1 antes de que pueda unir FADD necesita unirse a proteínas con dominios de muerte asociados a TNF-R (TRADD). Por su parte, las FADD se unen a las caspasas por otro dominio conservado, el *dominio efector de muerte* (DED). El complejo entero de proteínas es llamado *complejo de señalización de inducción de muerte*, o DISC.

Adicionalmente, existen algunas *proteasas en serina*, como la *granzima B*, que tiene similitud con las caspasas. La granzima B es una enzima producida por los linfocitos T-citotóxicos que la inyectan a células blanco a través de proteínas formadoras de poros (*perforina*) que se insertan en la membrana plasmática de la célula blanco. La granzima B actúa de manera similar a la caspasa 8. Los linfocitos T citotóxicos (CT) liberan por exocitosis localizada perforina y enzimas sobre la superficie de una célula blanco infectada. La alta concentración de calcio en el fluido extracelular causa que las perforinas se ensamblen en canales transmembranales en la membrana de la célula blanco. Se ha propuesto que los canales permiten la entrada de las enzimas hidrolíticas al citosol de la célula blanco. Una de las enzimas es la granzima B, que rompe a la proteína Bid, la cual libera al citocromo c de la mitocondria para iniciar la cascada de caspasas que conducen a la apoptosis (Figura 6).

Está claro que tanto las células sanas como las que han sido expuestas a un agente nocivo poseen programas genéticos para recibir instrucciones (señales) y para responder a ellas. La respuesta puede ser la secuencia de eventos que conducen a la apoptosis o, alternativamente, al arresto del ciclo celular y reparación. Si la apoptosis es iniciada, procesos reguladores futuros actúan a nivel del tejido para asegurar que las células dañadas sean removidas y su pérdida sea compensada.

Participación de los linfocitos T citotóxicos en la apoptosis

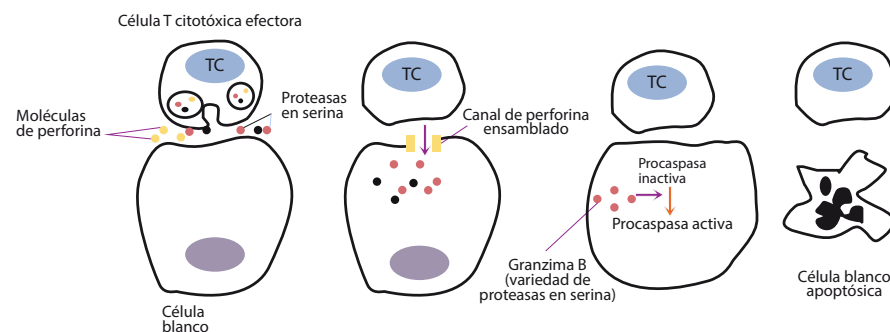


Figura 6. La vía extrínseca de la apoptosis activada por los receptores de muerte Fas.

Y resulta claro también que la apoptosis es crucial para el desarrollo de los mamíferos a través del control de los patrones del cuerpo y los órganos, así como del limbo la formación de los dedos. Precisamente las fallas en la regulación de la apoptosis durante el desarrollo embrionario se automanifiestan en un fenotipo observable. Por ejemplo, el paladar hendido parece deberse a una excesiva apoptosis de las células ectomesenquimatosas del paladar durante el desarrollo craneoencefálico. En contraste, una reducida apoptosis de las células mesodérmicas entre el limbo de los dígitos puede dar como resultado dedos unidos por una membrana.

Por su parte, en el mamífero adulto existen tejidos con sus propios controles de apoptosis, ejemplo de ellos son los dependientes de hormonas, como la glándula mamaria, el útero y la próstata. Así, el retiro de los andrógenos, o su disminución, puede inducir la regresión dramática de la próstata, lo cual ocurre por apoptosis.

Asimismo, en el sistema inmune la apoptosis desempeña una importante función al limitar la inflamación y la autoinmunidad y promover



la tolerancia a los antígenos encontrados comúnmente (por ejemplo, en las proteínas de la dieta). En el timo, durante el desarrollo y maduración de los linfocitos T, las células son constantemente expuestas a sus propios antígenos y las que reconocen a los antígenos propios mueren por apoptosis, a través de una vía dependiente de la proteína proapoptótica Bim.

Finalmente, las técnicas que están disponibles para la identificación de la apoptosis caen en las siguientes cinco categorías: 1) valoración de la integridad del ADN; 2) evaluación de la activación proteolítica apoptosis-específica; 3) métodos para determinar los cambios de proteínas clave que regulan el proceso de apoptosis; 4) métodos para identificar los cambios en la membrana, y 5) identificación de cambios en la morfología celular. Las técnicas empleadas para el ensayo de estos parámetros pueden ir desde el simple microscopio de luz, la bioquímica clásica o hasta el uso de máquinas sofisticadas y costosas, como los citómetros de flujo.

Aspectos morfológicos, celulares y moleculares del cáncer

Cáncer

El *cáncer* puede ser definido como un trastorno en los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación en las células de los organismos pluricelulares. El problema se manifiesta en la perturbación de la tasa de crecimiento (relación entre las células nuevas y las células que mueren) y no tanto en el incremento de la velocidad de la proliferación celular. En los tumores, no necesariamente hay una velocidad incrementada de la proliferación celular, lo que existe es una pérdida de equilibrio entre la proliferación, diferenciación y muerte. Así, el cáncer se caracteriza por una proliferación celular descontrolada, unida a una pérdida de rasgos

de diferenciación y a una mortalidad disminuida. La coordinación precisa entre estos tres procesos es vital para el desarrollo normal y la renovación de los tejidos.

Los oncólogos clínicos y los cirujanos, con frecuencia se reservan la palabra “cáncer” para referirse a crecimientos anormales que ya los catalogan con el término de malignidad (en el caso de tejidos epiteliales, el término *carcinoma* (véase más adelante) se aplica al crecimiento que ya ha adquirido cierto grado de invasividad). Esta disparada colección de crecimientos –tanto benignos como malignos– son llamados colectivamente *neoplasias* (nuevos tipos de tejido).

A lo largo de los años, la neoplasia ha sido definida en un gran número de sentidos. Ahora se conoce que las diferencias principales entre células normales y cancerosas son:

- La proliferación de células cancerosas es incontrolada y ocurre independientemente del requerimiento de nuevas células.
- El proceso de la diferenciación celular está mermado en las células cancerosas.

Los neoplasmas son tradicionalmente clasificados, de acuerdo con su crecimiento y las características de su comportamiento, como *benignos* o *malignos*. El cáncer se refiere exclusivamente a *neoplasmas malignos*, los cuales están caracterizados por una manera de crecer localizada, invasiva y destructiva, y la capacidad para causar *metástasis* a otros sitios en el cuerpo. Los tumores benignos tienden a crecer por expansión más que por invasión y no causan metástasis. Aunque esta división es útil para propósitos descriptivos, los neoplasmas despliegan un gran espectro de comportamientos. Algunos tumores, por ejemplo, el éupulis acantomatoso oral (carcinoma de células basales) y el hemangiopericitoma canino tienen



características localizadas de malignidad, pero no producen metástasis. Otros tumores, por ejemplo los tumores de células cebadas o mastocitos, pueden desplegar un amplio rango de comportamientos con algunos tumores, y algunos son benignos o de bajo grado y otros, altamente malignos. Histológica y citológicamente las características morfológicas de un tumor –por ejemplo, la tasa mitótica– y las características celulares y nucleares, pueden ser usadas para predecir su comportamiento. Este grado histológico o apariencia del tumor es, por tanto, importante en el pronóstico.

Aspectos morfológicos del cáncer

La mayoría de los tumores se originan en tejidos epiteliales. El epitelio está formado por hojas de células que delinean las paredes de las cavidades y los canales o, en el caso de la piel, sirve como la cubierta externa del cuerpo. Debajo de las capas de células epiteliales en cada uno de los tejidos descansa una membrana que sirve de base (llamada *lámina basal*), ésta separa a las células epiteliales de la capa subyacente de células de tejido conectivo, llamado *estroma*. Los epitelios son de especial interés aquí, porque constituyen los cánceres más comunes llamados *carcinomas* (tumores que se originan de capas de células epiteliales). Estos tumores son responsables de más de 80% de las muertes relacionadas con cáncer en la población humana occidental. Dentro de los carcinomas más frecuentes están aquellos del tracto gastrointestinal como el de boca, esófago, estómago e intestinos grueso y delgado, así como el de piel, glándula mamaria, páncreas, pulmón, hígado, ovario, vesícula biliar y vejiga urinaria.

La mayoría de los carcinomas caen en dos categorías que reflejan las dos principales funciones asociadas con los epitelios: la protección y la secreción, esto es: algunas capas de epitelio sirven para sellar la cavidad o el canal que forman y para proteger las poblaciones celulares subyacentes. De

los tumores que se originan de células epiteliales que forman capas protectoras se dice que son *carcinomas de células escamosas*. Por ejemplo, las células epiteliales que delinean la piel y el esófago causan tumores de este tipo.

Muchos epitelios también contienen células especializadas que secretan sustancias en los conductos o cavidades que ellos delinean. Esta clase de células epiteliales generan *adenocarcinomas*. A menudo estos productos secretados son usados para proteger las capas de células epiteliales del contenido de las cavidades que los rodean. Así, algunas células epiteliales que delinean el pulmón y el estómago secretan capas de moco que los protegen, respectivamente, del aire (y partículas en éste) y de los efectos corrosivos por la alta concentración de ácido. Los epitelios en algunos órganos como el pulmón, el útero y el cérvix tienen la capacidad de dar origen a adenocarcinomas puros o carcinomas de células escamosas puros; y es poco frecuente que en tumores en estos órganos sean encontrados ambos tipos de células de carcinoma coexistiendo (*cuadro 1*).

Cuadro 1

Carcinomas

Tejidos donde son más comunes los adenocarcinomas	Tejidos donde son más comunes los carcinomas de células escamosas	Otros tipos de carcinomas
Pulmón	Piel	Carcinoma de células pequeñas del pulmón
Colon	Cavidad nasal	Carcinoma de células grandes del pulmón
Mama	Orofaringe	Carcinoma hepatocelular
Páncreas	Laringe	Carcinoma de células renales
Estómago	Pulmón	Carcinoma de células de transición
Esófago	Esófago	De vejiga urinaria
Próstata	Cérvix	
Endometrio		
Ovario		



El resto de tumores malignos se forma en tejidos no epiteliales a lo largo del cuerpo. La clase principal de cánceres no epiteliales se deriva de diversos tejidos conectivos en todo el cuerpo. Estos tumores, los *sarcomas*, constituyen sólo cerca de 1% de los tumores encontrados en la clínica oncológica (*cuadro 2*).

Cuadro 2

Sarcomas más comunes

Osteosarcoma
Liposarcoma
Leiomiomasarcoma
Histiocitoma fibroso maligno
Fibrosarcoma
Sarcoma sinovial
Linfosarcoma
Angiosarcoma
Condrosarcoma

Los sarcomas se derivan de una variedad de tipos celulares del mesénquima como los *fibroblastos* y tipos celulares relacionados con el tejido conectivo, que secretan colágeno, el principal componente estructural de la matriz extracelular de tendones y piel; *adipocitos*, los cuales almacenan grasa en sus citoplasmas; *osteoblastos*, que ensamblan cristales de fosfato de calcio dentro de las matrices de colágeno para formar el hueso, y *miocitos*, que se ensamblan para constituir el músculo. Un tumor relativamente poco frecuente es el *angiosarcoma*; se forma a partir de precursores de células endoteliales. Las capas estromales de los tejidos epiteliales incluyen muchos de estos tipos celulares mesenquimatosos.

Cuadro 3

Tumores hematopoyéticos más comunes

Leucemia linfocítica aguda
Leucemia mielogénica aguda
Leucemia mielogénica crónica
Leucemia linfocítica crónica
Mieloma múltiple
Linfoma linfocítico o “no de Hodgkin”
Enfermedad de Hodgkin

El segundo grupo de cánceres no epiteliales se genera de varios tipos celulares que constituyen los tejidos de formación de sangre (hematopoyéticos), que incluye células del sistema inmune (*cuadro 3*). Dentro de estos tipos de cáncer están las células destinadas a la formación de eritrocitos (células rojas de la sangre), células que secretan anticuerpos (células plasmáticas), así como linfocitos T y B. El término *leucemia* (literalmente “sangre blanca”) se refiere a los derivados malignos de varias de estas líneas celulares hematopoyéticas que se mueven libremente a través de la circulación y, a diferencia de las células rojas, no están pigmentadas. Los *linfomas* abarcan a los tumores de las líneas linfoides (linfocitos B y T) que se agregan para formar masas tumorales sólidas, que se encuentran con mayor frecuencia en los nódulos linfoides.

La tercera y última agrupación principal de tumores no epiteliales se origina de células que forman varios componentes del sistema nervioso central y periférico, llamados tumores *neuroectodérmicos*, por su origen en las capas más externas del embrión temprano (*cuadro 4*). Entre los tumores de este tipo se pueden mencionar los *gliomas*, los *glioblastomas*, los *neuroblastomas*, los *schwannomas* y los *meduloblastomas*. Aunque éstos comprenden



Cuadro 4

Tumores neuroectodérmicos comunes

Glioblastoma múltiple
Astrocitoma
Meningioma
Neurinoma
Retinoblastoma
Neuroblastoma
Ependimoma
Oligodendroglioma
Meduloblastoma

sólo 1.3% de los cánceres diagnosticados en humanos, son responsables de aproximadamente 2.5% de las muertes relacionadas con el cáncer.

No todos los tumores caen en alguna de estas cuatro categorías. Por ejemplo, los *melanomas* se derivan de los melanocitos, las células pigmentadas de la piel y la retina. Los melanocitos, a su vez, se forman a partir de una estructura embrionaria primitiva, llamada cresta neural; tienen un origen embrionario cercano al de las células neuroectodérmicas, brotan durante el desarrollo como lunares que descansan en la piel y los ojos, proveyendo de pigmento a estos tejidos, y adquieren conexiones no directas con el sistema nervioso.

Etapas del proceso carcinógeno

El desarrollo de un tumor a partir de una célula que se alteró es un proceso complejo que transcurre a lo largo del tiempo y a través de diferentes etapas.

La primera de estas etapas es la *iniciación*; se refiere a un daño permanente y heredable en el ADN de una célula que, si no se repara, se fija

como una mutación, quedando la célula iniciada. Este daño no conduce necesariamente a la transformación maligna, sólo ofrece una ventaja selectiva a la célula que lo presenta. La frecuencia con la que ocurre el proceso inducido químicamente puede ser de 1 en 10 000. Los agentes iniciadores son, por definición, compuestos *genotóxicos*.

Mediante experimentación se ha establecido que ciertas sustancias, no genotóxicas pueden favorecer la *expansión clonal reversible*, *hiperplasia* (acumulación de número excesivo de células aparentemente normales dentro de un tejido) a partir de la célula que se inició; a esta etapa se le conoce como *promoción*. Las células promovidas forman la neoplasia benigna o tumor benigno. Cuando una neoplasia benigna se ha malignizado, entonces se origina el cáncer. El nivel de acción en el que aparentemente sucede el fenómeno de la promoción es la activación de los mecanismos de transducción de la señal proliferativa, es decir, a nivel de la estimulación de la división celular. Algunos de los agentes promotores típicos son el TPA (acetato de tetradecanoil forbol), los esteroides y las grasas de la dieta. Existen compuestos químicos y mezclas complejas de éstos que tienen simultáneamente acciones iniciadoras y promotoras, tal es el caso del humo del cigarro. Cuando los compuestos químicos son capaces de inducir la formación de tumores por sí solos se denominan *carcinógenos completos*, y si requieren de la ayuda de otros agentes, específicamente promotores, son *carcinógenos incompletos*. A su vez, los carcinógenos pueden ser considerados iniciadores (si actúan mediante mecanismos genotóxicos) o promotores (si actúan mediante mecanismos proliferativos).

Todos los procesos que de alguna manera induzcan la proliferación celular –como pueden ser la inflamación, la cicatrización, la regeneración tisular– pueden estimular la promoción de células ya iniciadas o



aumentar la probabilidad de que ocurran nuevas mutaciones durante el proceso proliferativo.

La mayoría de los cambios morfológicos ocurridos en las células en la etapa de iniciación desaparecen y sólo unas cuantas células pueden evolucionar durante la *progresión*, hasta constituir un carcinoma o un sarcoma. La malignización de la neoplasia se debe a la aparición secuencial de subpoblaciones que cada vez presentan más *anormalidades cariotípicas* y un aumento en la expresión de *protoncogenes* (ver más adelante). Los cambios genéticos progresivos y acumulativos que se presentan son, entre otros, *aneuploidía*, *pérdida de alelos* y *amplificación génica*. Es característica de esta etapa final la aparición de rasgos de *desdiferenciación* o *diferenciación aberrante*, mediante la expresión de neoantígenos, propios de células embrionarias o más indiferenciadas. El rasgo distintivo terminal de esta etapa es la capacidad de escapar, invadir y colonizar o hacer metástasis en órganos distantes. Las células invasoras pueden movilizarse, atravesar la membrana basal del tejido al cual pertenecen, entrar en los vasos sanguíneos o linfáticos y trasladarse a través de ellos a regiones distantes, reconocer allí determinados tejidos, atravesar nuevamente los vasos y la nueva membrana basal y colonizar el nuevo órgano para reproducirse activamente en él y originar nuevas formaciones tumorales. Toda esta secuencia de hechos se conoce como *cascada metastásica*. La duración del proceso carcinógeno en el ser humano es de diez a 20 años, desde la primera exposición al agente iniciador hasta la aparición del cáncer.

Con fines didácticos, conviene mencionar que el cáncer presenta seis particularidades especiales que le confieren su poder lesivo en contra del individuo; a continuación se explica cada una de ellas.

La primera característica lesiva del cáncer es el *crecimiento*, incluso en ausencia de *señales normales de "adelante"*, es decir, la mayoría de las células

normales esperan una orden externa para dividirse. Las células cancerosas falsifican a menudo los mensajes y siguen dividiéndose en situaciones en que las células normales permanecen en reposo, a la espera de una señal química especial que podría provenir de una zona vecina lesionada; se las arreglan para alterar tales mensajes relacionados con el crecimiento.

La segunda característica lesiva del cáncer es su *crecimiento, a pesar de las señales de "paro"* enviadas por las células vecinas. A medida que el tumor se expande, éste presiona el tejido adyacente; en condiciones normales, les enviaría mensajes químicos para que se detuviera; por tanto; las células tumorales han de ignorar las órdenes de paro de la división emitidas por los tejidos adyacentes que ellas presionan y por sus propios mecanismos internos de envejecimiento.

La tercera característica lesiva del cáncer es la *insumisión ante los mecanismos propios de autodestrucción*. Así, todas las células cancerosas tienen graves problemas con su ADN. A medida que éste se replica una y otra vez, muchas células de la colonia resultante acaban situadas lejos de los vasos sanguíneos que les suministran oxígeno y nutrimentos. Este tipo de estrés dispara mecanismos de autodestrucción en las células sanas. Las células tumorales encuentran un camino para evitar el suicidio: persuaden a los vasos sanguíneos cercanos para que construyan la infraestructura que necesitan para prosperar. En otras palabras, en las células sanas los trastornos genéticos que superan determinado umbral crítico activan un programa de apoptosis o autodestrucción por una muerte celular programada. Las células cancerosas se saltan ese mecanismo, aunque a veces el sistema inmunitario logra que las células cancerosas se autodestruyan.

La cuarta característica del poder lesivo del cáncer está muy relacionada con la anterior y es la *capacidad para estimular la angiogénesis*. Los tumores necesitan oxígeno y nutrimentos para vivir. Los obtienen tras



conseguir que los vasos sanguíneos de su vecindad formen nuevas ramificaciones que se adentran en la masa en crecimiento.

El quinto poder especial que los cánceres adquieren, salvo raras excepciones, es la *inmortalidad efectiva*. En unas setenta veces se cifra el número máximo de divisiones de una célula sana. Para formar un tumor, las células malignas necesitan traspasar ese guarismo para formar un tumor. Por eso actúan en torno a sistemas que, como los telómeros del extremo de los cromosomas, refuerzan el límite reproductor. En más detalle, un cultivo de células humanas normales deja de multiplicarse cumplidas 50 o 70 generaciones. Con ese número de divisiones les basta para mantener hasta un siglo de vida sana de una persona; pero la gran mayoría de las células de un tumor muere rápidamente por sus fallos genéticos; en consecuencia, las que sobreviven deben reproducirse sin tasa para la proliferación del tumor. Las células que sobreviven lo hacen en parte por la manipulación de sus telómeros, complejos de ADN sin genes ni proteínas que protegen los extremos de cada cromosoma.

Los tumores que desarrollan estas cinco facultades, aunque representan un problema, probablemente no son letales. Es la sexta propiedad, la *capacidad para invadir otros tejidos cercanos y propagarse por otros órganos formando metástasis* en regiones remotas, lo que confiere al cáncer su carácter mortal. El cáncer empieza a representar una amenaza para la vida cuando inutiliza los circuitos celulares que los confinan en la zona específica del órgano donde se originaron. Aparecen entonces neoformaciones que terminan por bloquear sistemas vitales. Las invasiones locales pueden extirparse por intervención quirúrgica, pero nueve de cada diez fallecimientos por cáncer se deben a las metástasis. Sólo ciertas células de un tumor parecen adquirir esta capacidad de desprenderse de la masa inicial, discurrir por la circulación y establecer una nueva colonia en un órgano diferente del que le

dio origen. Para cuando se descubren, muchos cánceres han producido ya, por desgracia, metástasis. El pronóstico se tiñe entonces de tonos sombríos.

Metástasis

Los tumores pueden producir metástasis por la *ruta linfática* hacia los nódulos linfoides regionales y locales o por la *ruta hematógena* a partir de donde los tumores secundarios pueden subsecuentemente desarrollarse en cualquier órgano del cuerpo. Estos dos sistemas están ampliamente interconectados y muchos tumores utilizan tales conexiones para expandirse a través del cuerpo. En humanos, los diversos tipos de cáncer muestran diferentes órganos blanco de especificidad para la metástasis. Por ejemplo: en el carcinoma de próstata es el hueso, en el de mama es hueso, cerebro, adrenales, pulmones e hígado y en el melanoma cutáneo es el hígado, el cerebro y la vejiga.

En animales, particularmente las pequeñas especies, los pulmones son el sitio más propicio para el desarrollo de tumores secundarios hematógenos, pero otros sitios, incluyendo el hígado, el bazo, los riñones, la piel y el hueso no deben ser ignorados. Los carcinomas y los tumores de células cebadas usualmente producen metástasis por la ruta linfática, y los sarcomas y melanomas por la ruta hematógena, pero los tumores no siempre siguen patrones de conducta y algunos tumores pueden expandirse por ambas rutas.

Los mecanismos involucrados en el proceso de metástasis no están completamente entendidos. Con el fin de formar una metástasis, una célula cancerosa debe desprenderse del tumor primario, viajar a una nueva localización y establecer su crecimiento en el nuevo sitio. Durante este proceso, la célula debe evadir los mecanismos de defensa del hospedero y sobrevivir en la circulación. Las teorías actuales sugieren que sólo ciertos clones de células dentro de un tumor desarrollan todas las habilida-



des requeridas para la metástasis, pero que probablemente se originan y se diseminan en los estadios tempranos del crecimiento de los tumores, a menudo antes de la detección del tumor primario.

Agentes etiológicos del cáncer

Los agentes causantes de cáncer han sido identificados mediante estudios epidemiológicos y directamente por pruebas experimentales, con lo cual se ha determinado que 90% de los casos de cáncer, al menos en el ser humano, es causado por productos químicos, mientras que el restante 10% se debe a la acción de factores genéticos, virales y físicos.

- *Agentes ambientales.* Algunos de estos agentes que contribuyen a la aparición o desarrollo del cáncer se enlistan en los cuadros 5, 6 y 7.

De acuerdo con las últimas investigaciones, la mayoría de estos agentes fueron identificados entre las sustancias que emplea la industria y en los fármacos. Los herbicidas, pesticidas, aditivos alimenticios y desechos industriales también se han asociado con el desarrollo de esta enfermedad. Los factores yatrogénicos aparentemente no contribuyen mucho al riesgo total, aunque en algunos países han sido responsables de 10% de todos los casos de cáncer en infantes y de una proporción considerable de un tipo particular de esta enfermedad. Otro factor ambiental al que se le está dando mucha importancia hoy en día es la dieta. Se ha observado que las personas que tienen una alimentación rica en grasas, carne y alimentos con conservadores son más propensas a contraer ciertos tipos de cáncer. Por otro lado, se cree que algunas sustancias bioquímicas, tales como los carotenoides, las vitaminas C y E, el ácido fólico, el sele-

nio y otros elementos traza, pueden reducir el riesgo de padecer cáncer. Por ejemplo, una dieta variada y balanceada rica en frutas frescas y vegetales puede representar la principal medida de protección contra el cáncer gástrico. El efecto de la dieta se basa en la función antioxidante de los micronutrientes, los cuales pueden actuar en diferentes fases del proceso carcinógeno, interrumpiendo la progresión y lesiones precancerosas.

- *Agentes químicos.* Las poblaciones en general han estado expuestas a agentes químicos que se encuentran en el ambiente, tales agentes incluyen arsénico, asbestos y cloruro de vinilo e hidrocarburos policíclicos producidos por la combustión de carbón, madera y petróleo. Los agentes genotóxicos pueden actuar directa o indirectamente. Los directos son aquellos que al interaccionar directamente con el ADN inducen un daño. La mayor parte de los agentes genotóxicos son indirectos; esto es, que requieren una activación o transformación metabólica que modifique su estructura química después de entrar al organismo, y de esa manera se hace posible su interacción con el ADN.

Estas transformaciones metabólicas se efectúan predominantemente en el hígado de los mamíferos o en órganos similares en especies inferiores. Dicho metabolismo involucra la actividad de las enzimas microsomales pertenecientes a la familia del citocromo P-450.

En su interacción con el ADN, los compuestos químicos son capaces de inducir una gran variedad de daños genéticos, entre los cuales están las *mutaciones puntuales*, recombinaciones mitóticas recíprocas o no recíprocas, deleciones, aberraciones cro-



Cuadro 5

Tipos de cáncer ocupacional

Agente	Ocupación	Sitio del cáncer
Radiaciones ionizantes radón rayos X radio	Trabajadores de algunas minas subterráneas (uranio, fluorofosfatos, hematita)	Bronquios
	Radiólogos, radiógrafos	Piel
	Pintores	Hueso
Luz ultravioleta	Campesinos, marineros	Piel
Hidrocarburos policíclicos en ollín, alquitrán, petróleo	Limpiadores de chimeneas, manufactureros del gas de hulla y otros trabajadores de la industria	Escroto
2-Naftilamina 1-Naftilamina	Trabajadores expuestos a químicos; trabajadores del caucho; manufactureros del gas de hulla	Vejiga
Benzidina 4-aminobifenil	Trabajadores expuestos a químicos	Vejiga
Asbestos	Trabajadores de asbestos y astilleros	Bronquios y peritoneo
Arsénico	Trabajadores de minas de oro y fundidores de algunos metales	Piel y bronquios
Bis (clorometilo) éter	Manufactureros de resinas	Bronquios
Benceno	Trabajadores expuestos a pegamentos, barnices	Médula ósea (leucemia)
Gas mostaza	Manufactureros del gas	Bronquios, laringe, senos nasales
Cloruro de vinilo	Manufactureros de PVC	Hígado (angiosarcoma)
Mineral de cromo	Manufactureros del cromo	Bronquios
Mineral de níquel	Trabajadores que refinan el níquel	Bronquios y senos nasales
Aceite de isopropilo	Manufactureros de isopropileno	Senos nasales
Agente no identificado	Carpinteros	Senos nasales
Agente no identificado	Curtidores	Senos nasales

Cuadro 6

Tipos de cáncer yatrogénicos

Agente	Sitio del cáncer
Diagnóstico o terapia con rayos X	Todos los sitios Hueso
Torotrasto	Hígado, bazo
Hidrocarburos policíclicos en hulla o alquitrán	Piel
Hidrocarburos policíclicos en parafina líquida	Estómago, colon, recto
Agentes alquilantes melfalano, ciclofosfamida	Leucemia mieloide
Estrógenos estilbestrol	Útero, mama, vagina
Esteroides anticonceptivos	Hígado
Andrógenos (esteroides anabólicos)	Hígado
Arsénico	Piel, pulmón
Clornafacina	Vejiga
Fenacetina	Pelvis renal
Medicamentos inmunosupresores	Reticulosarcoma
Vacuna de polio contaminada con el virus SV40	Sistema nervioso central

Cuadro 7

Otros tipos de cáncer ambiental

Agente	Sitio del cáncer
Luz solar	Piel expuesta (úlceras, carcinoma escamoso, melanoma)
Masticación de betel, tabaco	Boca
Tabaquismo	Paladar, boca, faringe, laringe, bronquios, esófago, vejiga
Bebidas alcohólicas	Boca, faringe, laringe, esófago
Aspectos del intercurso sexual (virus)	Cérvix uterino
Mononucleosis	Enfermedad de Hodgkin (ganglios linfáticos)
Aflatoxina	Hígado
Esquistosomiasis	Vejiga



mosomales, etcétera. En la actualidad se reconoce que no todos los carcinógenos son necesariamente mutagénicos: hay carcinógenos no genotóxicos que, a dosis elevadas, pueden inducir cáncer, aparentemente por estimulación de la proliferación celular, ya que al aumentar el número de células en división, aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones o cambios genéticos en algunas de ellas, que den lugar al cáncer.

- *Agentes físicos.* El cáncer también es causado por estímulos físicos, como las radiaciones. Éstas pueden ser genotóxicas, cuando dañan el ADN, o no genotóxicas. Las radiaciones genotóxicas pueden ser ionizantes o no ionizantes. Las radiaciones ionizantes, de mayor contenido energético, como la radiación gamma, los rayos X, los neutrones y otras, atraviesan la materia viva ionizando átomos a su paso y generando radicales libres, los cuales, al ser sumamente activos, pueden afectar el ADN y las proteínas. Las radiaciones genotóxicas no ionizantes están representadas por la radiación ultravioleta, la cual induce la formación de dímeros de timina en el ADN, y de esta manera interfiere con el proceso normal de su replicación.

Las radiaciones no genotóxicas son las radiaciones conocidas como de baja frecuencia, emitidas por los equipos electrónicos de uso cotidiano, como televisores, radiorreceptores, computadoras, hornos de microondas, videograbadoras, etcétera. Algunos estudios experimentales recientes indican que este tipo de radiación podría actuar sobre las membranas biológicas alterando el flujo de iones. Además, hay evidencias de que los mecanismos de acción de las radiaciones no genotóxicas son similares a los de los compuestos químicos carcinógenos no genotóxicos.

- *Agentes biológicos.* Con respecto a los factores biológicos, en la etiología del cáncer también existen los genotóxicos y los no genotóxicos. Los factores biológicos carcinógenos genotóxicos son principalmente los virus, que causan daño en el ADN de las células infectadas y producen algunos tipos de neoplasias malignas. Los virus tumorales provocan la transformación de la célula hospedera, ya que son capaces de integrar su información genética en el ADN.

Las diferentes familias de virus de ADN o ARN tumorales que se conocen se enlistan en el [cuadro 8](#).

Los factores biológicos no genotóxicos están representados por ciertos hongos, bacterias y algas. Éstos, al infectar de manera crónica algunos tractos del organismo, como el genital o el pulmonar, pueden contribuir al desarrollo de cáncer a través de mecanismos estimuladores de la proliferación de las células de estos tejidos.

Cuadro 8
Virus tumorales

Virus de ADN	Familia	Tumores asociados
Hepatitis B (HBV)	Hepadna	Carcinoma hepatocelular
SV40/polioma	Papova	Mesoteliomas
Papiloma humano 16 (HPV)	Papova	Cáncer cérvico-uterino
Adenovirus humano 5	Adenovirus	Carcinoma nasofaríngeo
Herpesvirus humano 8 (HSV-8; KSHV)	Herpesvirus	Cáncer de linfocitos B, carcinoma nasofaríngeo
Virus de ARN	Familia	Tumores asociados
Virus de sarcoma Rous (RSV)	Retrovirus	Sarcoma de Rous
Virus de leucemia de células T humano (HTLV-I)	Retrovirus	Leucemia de células T adultas, linfoma
Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)	Retrovirus	Sarcoma de Kaposi



- **Factores genéticos.** Otros factores que contribuyen a la complejidad del proceso carcinógeno son de naturaleza espontánea o causados por herencia. Las mutaciones espontáneas, responsables de algunos tipos de cáncer, se deben a procesos biológicos endógenos naturales y comunes que ocurren en las células. Entre estos procesos están: la infidelidad de la *ADN polimerasa*; la depuración espontánea o pérdida espontánea de bases púricas por la molécula de ADN; el daño oxidativo causado por radicales libres generados por diferentes procesos biológicos y la desaminación espontánea de la 5 metil citosina a timina; este cambio de base tiene una eficiencia muy baja de reparación. Si la replicación del ADN ocurre con fallas y no son reparadas, los daños mencionados se fijan como *mutaciones espontáneas*.

Las diferencias entre las propiedades de las células normales cultivadas y las células transformadas pueden deberse a la expresión de uno o dos genes llamados oncogenes. Un *oncogén* es un gen que codifica una proteína que cuando es alterada o producida en demasía es capaz de transformar células en cultivo o de inducir cáncer en animales. Se han identificado más de cien oncogenes y éstos se derivan de genes celulares normales. Los genes celulares progenitores de los oncogenes se conocen como *protoncogenes* (cuadro 9). Se ha observado que la mayoría de los protoncogenes ha logrado conservarse a través de la evolución, ya que sus productos son básicos para el funcionamiento de las células de los animales.

Casi todos los oncogenes provienen de genes cuyos productos actúan en la vía de control del crecimiento celular. Las proteínas codificadas por los oncogenes se denominan *onco-*

Cuadro 9

Protoncogenes

BRAF
C-FOS
ABL
ERBB-1
ERBB-2 (NEU)
ERBB-3
GIP
GSP
MYC
L-MYC
N-MYC
H-RAS
K-RAS
RET
ROS
K-SAM
SUS
SRC
TRK

proteínas; algunas son formas mutantes de las proteínas producidas por los protoncogenes correspondientes. En otros casos, la proteína producto de un oncogén y su protoncogén es la misma. La oncoproteína causa cáncer por estar presente donde normalmente no está o porque se encuentra expresada en un nivel mucho más alto del normal.

Hay evidencias experimentales de otra clase de genes cuya expresión normal inhibe la transformación. La pérdida de tales



Cuadro 10

Genes supresores de tumores

RB1
P53
APC
WT1
DCC
NF1
FAP
MEN-1

genes conlleva la conversión neoplásica de la célula afectada. A estos genes se les conoce como *genes supresores de tumores* (*cuadro 10*) y en la actualidad se han identificado cerca de 15. En los tumores estos genes carecen de función supresora de la proliferación celular debido a delecciones o mutaciones inactivantes, y la pérdida de dicha función es tumorigénica.

La principal prueba de la naturaleza de estos genes es provista por las familias con síndrome de cáncer, en las cuales se transmiten de generación en generación los genes supresores mutados.

Bases moleculares del cáncer

La causa inmediata del cáncer debe encontrarse en alguna asociación de agresiones y accidentes que induzcan a las células normales de un organismo adulto sano a convertirse en malignas, que se multiplican como las malas hierbas y aparecen en lugares insólitos. En este terreno, la causa del cáncer no encierra ningún misterio. Hace un decenio muchos biólogos moleculares creían que la ciencia estaba en puertas de dar con la respuesta final: el cáncer es el resultado de mutaciones acumuladas que alteran

sitios específicos del ADN de una célula y cambian, por ende, las proteínas codificadas por genes relacionados con el cáncer.

Los factores que conducen a la transformación neoplásica de una célula no están totalmente entendidos, pero el cambio fundamental está relacionado con la interrupción de los mecanismos genéticos, los cuales normalmente controlan el crecimiento celular y la diferenciación; por ejemplo, el cáncer se origina por cambios en el ADN celular.

El cáncer es una enfermedad genética. En el interior de las células pueden darse alteraciones del ADN que les confieren características lesivas; entre otras, la capacidad para crecer en cualquier región y continuar dividiéndose sin tasa.

Desde hacía tiempo la investigación se centraba en las mutaciones que afectaban a un grupo pequeño de genes relacionados con el cáncer; se creía que constituían los episodios decisivos de la transformación de células sanas en tumores malignos.

En los últimos años, sin embargo, han surgido otras teorías que cuestionan dicho enfoque. Una de ellas menciona que el fallo en la duplicación o reparación del ADN induce millares de mutaciones al azar en las células. Para otra, los cromosomas se tornan peligrosos porque la lesión de varios genes maestros provocan que se enreden entre sí. Una tercera hipótesis es que la primera condición para el desarrollo del cáncer reside en el número anómalo de cromosomas de una célula.

Como ya se mencionó en los aspectos genéticos de la etiología del cáncer, los dos tipos de genes relacionados con el cáncer son, primero, los *genes supresores de tumores*, que en condiciones normales restringen la capacidad de división de las células, pero las mutaciones incapacitan de forma permanente tales genes. La segunda variedad, el grupo de los *oncogenes*, estimula el crecimiento, es decir, la división celular. Las muta-



ciones fijan los oncogenes en un estado activo. Algunos investigadores siguen aceptando como axioma que tales cambios promotores del crecimiento en unos cuantos genes vinculados con el cáncer constituyen el proceso inicial y causa radical de cualquier tumor maligno.

Las pruebas que apoyan las bases genéticas del cáncer llegan de varias fuentes. La existencia de ciertas (aunque raras) formas del cáncer con incidencia familiar indica que algunas formas de cáncer tienen al menos una base hereditaria y genética. Las anormalidades cromosomales específicas han sido asociadas consistentemente con ciertos tipos de cáncer; por ejemplo, la translocación cromosomal resultante en el *cromosoma Philadelphia* en la *leucemia mieloide crónica* (CML, por sus siglas en inglés) y la *delección cromosomal* en el *retinoblastoma* y el *tumor de Wilms*. Sin embargo, es el estudio de los retrovirus (virus que causan transformaciones neoplásicas de células por inserción de ácido nucleico viral dentro del ADN de células del hospedero) el que ha logrado, probablemente, el conocimiento más avanzado de las bases moleculares del cáncer. Se ha encontrado que algunos retrovirus contienen oncogenes, cuya inserción dentro del ADN de la célula hospedera puede ser el estímulo directo para la oncogénesis. Otros retrovirus (felinos y aviares) no contienen oncogenes; sin embargo, la inserción del genoma viral en el ADN hospedero puede causar la activación de oncogenes celulares.

Algunos tipos de *translocación cromosomal* (por ejemplo, el cromosoma Philadelphia) involucran protoncogenes y los cambios resultantes en la síntesis de proteínas conduce a la transformación neoplásica de la célula. Los agentes externos, por ejemplo, los virus oncogénicos, la radiación, la luz UV y los carcinógenos químicos, pueden también actuar para causar transformación neoplásica a través de interacciones con estos genes celulares, lo que conduce a su avance (su interruptor de encendido),

en el caso de oncogenes, o a su regulación negativa (interruptor de apagado), en el caso de genes supresores de tumores.

Nadie cuestiona que el cáncer sea, a la postre, una patología del ADN pero, al seguir la pista de los tumores hasta su última raíz, han ido saliendo a la luz otras alteraciones que operan en el interior de los núcleos de las células que, aunque no sean todavía cancerosas, están en camino de serlo. Se ha detectado la pérdida de cromosomas enteros, cada uno con mil genes o más, o su duplicación; la presencia de segmentos cromosómicos mezclados fuera de su lugar, truncados o fundidos entre sí, y se ha comprobado que los añadidos químicos a la molécula del ADN o de las histonas, proteínas que lo rodean, silencian genes importantes, aunque en un proceso reversible, distinto del fenómeno de la mutación.

En muchos cánceres las lesiones genéticas específicas u oncogenes no han sido identificados y la determinación del papel de los oncogenes en el desarrollo de estos tumores permanece en una fase de especulación. En diversos tipos de cáncer que ocurren espontáneamente, puede ser necesario que se presente una secuencia de varios eventos genéticos o interacciones a lo largo de varios años, antes de que la transformación neoplásica ocurra.

Episodios de mutación y expansión del cáncer

Los médicos podrían encontrar tumores incipientes mucho antes si los científicos identificaran los pasos recorridos por las células hasta convertirse en cáncer, tras el ataque inicial contra su ADN por un carcinógeno o por un percance bioquímico inesperado. Lo importante en estos procesos es la fuerza motora y el orden secuencial de las etapas. Desde hace un cuarto de siglo se ha venido admitiendo que los tumores crecen en episodios de mutación y expansión. La alteración genética de una célula borra



o altera un gen supresor de tumores –el *RB*, el *p53* y el *APC* se encuentran entre los mejor conocidos–, con la ausencia consiguiente de proteínas encargadas de velar por la integridad del genoma y responsables del proceso de la división celular. En una opción alternativa, una mutación podría avivar la actividad de un oncogén –como el *BRAF*, *c-fos* o el *c-erbB3*–, cuyas proteínas estimulan la proliferación celular.

Los cambios operados en los genes vinculados con el cáncer confieren a la célula una o varias de las capacidades especiales reseñadas, lo que le permite que crezca con ventaja sobre las que son sus vecinas. A través de la secuencia de ADN, la célula transmite las anomalías a su progenie, que termina por formar una especie de ejército clónico que crece hasta los límites de su capacidad. Con el tiempo, otra mutación aleatoria sufrida por un gen vinculado con el cáncer derriba otro obstáculo, lo que posibilita un nuevo episodio de proliferación.

Por norma, las células poseen dos copias de cromosomas –uno de la madre y otro del padre– y, por tanto, dos copias o alelos de cada gen. (En el varón, el carácter singular de los cromosomas X y Y constituyen una notable excepción). Basta una mutación en sólo uno de los alelos para que se active permanentemente un oncogén, pero se requieren dos embates para eliminar ambos alelos de un gen supresor del tumor. La teoría afirma que entre cuatro y diez mutaciones en los genes precisos pueden transformar cualquier célula.

La mayoría de los tumores no son masas de clones idénticos. Antes bien, un examen atento ha revelado la sorprendente diversidad genética entre las células, algunas de las cuales difieren tanto de las células humanas normales (y además entre sí), que se les podría considerar especies nuevas.

El gen *p53* y alguno más, relacionado con el cáncer, parecen estar mutados en la mayoría de los tumores, pero muchos otros genes vinculados al cáncer cambian sólo en una pequeña fracción de tipos tumorales, en una minoría de los pacientes o en algunas células salpicadas dentro del tumor. Más aún, algunos de los genes del cáncer más alterados dan lugar a efectos muy dispares. Los oncogenes *c-fos* y *c-erbB3*, tan estudiados, son curiosamente menos activos en los tumores que en los tejidos normales cercanos. Se ha demostrado que el gen supresor de tumores *RB* es hiperactivo en algunos cánceres de colon; de forma aviesa, parece proteger esos tumores de sus mecanismos de autodestrucción. La hipótesis del “golpe doble” –donde deben desactivarse ambos alelos de un gen supresor de tumores– también ha ganado reconocimiento con el descubrimiento del fenómeno de *haploinsuficiencia*. En ciertos cánceres los supresores de tumores no presentan ninguna mutación. Lisa y llanamente han recortado su producción, lo que parece suficiente para arrastrar a las células hacia la malignidad. Comprobado ya ese efecto en una docena larga de genes supresores de tumores, se espera encontrar muchos más de su misma índole. La búsqueda de la mera presencia o ausencia de las proteínas de un gen resulta muy simplista. La proporción es lo que importa.

Terapia anticáncer

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en animales de compañía, por lo que la terapia contra el cáncer ha tomado cada vez mayor importancia en la medicina veterinaria, particularmente en medicina y cirugía de pequeñas especies. El objetivo primordial de la quimioterapia contra el cáncer es una total erradicación de todas las células madre tumorales. En la medicina del cáncer humano este objetivo algunas veces



se ha llevado a cabo por medio del uso de una quimioterapia agresiva, de lo que resulta una seria, aunque temporal, intoxicación del paciente.

La quimioterapia anticáncer es una rama relativamente nueva de la medicina veterinaria que hasta muy recientemente estuvo restringida a especialistas en oncología veterinaria. La quimioterapia está ahora bien establecida como un tratamiento de elección para diferentes condiciones neoplásicas que afectan a las pequeñas especies, más notablemente para las enfermedades linfoproliferativas y mieloproliferativas.

En contraste con la cirugía y la radiación, las cuales son sólo efectivas en las enfermedades neoplásicas locales, la quimioterapia tiene el potencial de actuar en contra de la enfermedad sistémica, que es el principal problema en oncología. En la práctica veterinaria los regímenes de tratamiento y las dosis tienden a establecer una relación entre la eficacia y la toxicidad y siempre debe proporcionarse una cuidadosa consideración a la farmacología y toxicidad de la droga, el espectro de actividad y la condición del paciente. La mayoría de las drogas actúan sobre el proceso de crecimiento y división celular y están divididas comúnmente en cinco o seis clases, dependiendo de las bases de sus sitios o modos de acción, actividad antitumoral y toxicidad:

1. agentes alcalinos
2. antimetabolitos
3. antibióticos citotóxicos antitumorales
4. alcaloides vinca
5. hormonas
6. agentes misceláneos

Por otro lado, todas las drogas citotóxicas tienen el potencial de causar efectos adversos en el paciente (*cuadro 11*). En la mayoría de los casos

Cuadro 11

Principales efectos adversos de la quimioterapia anticáncer

Anafilaxis/hipersensibilidad
Flebitis, vasculoesclerosis y necrosis tisular
Mielosupresión e infección
Anorexia, vómito y toxicidad gastrointestinal
Nefrotoxicidad
Cistitis hemorrágica
Toxicidad cardíaca
Toxicidad de médula ósea

estos efectos colaterales son resultado de las acciones citotóxicas no selectivas de la droga sobre las poblaciones normales de células. Los tejidos normales que contienen una alta proporción de células que se están dividiendo son particularmente sensibles a la acción de las drogas citotóxicas. Entre los efectos adversos más comunes asociados con la quimioterapia anticáncer están aquellos que se relacionan con la intoxicación de la médula ósea, la intoxicación gastrointestinal. En humanos, la intoxicación dermatológica causa alopecia; esta última no es un problema común en animales tratados con drogas citotóxicas.

Las complicaciones de la quimioterapia pueden originarse en cualquier momento durante la terapia, entre éstas se encuentran la hipersensibilidad, o anafilaxis, que puede ocurrir inmediatamente después de la administración de la droga; otras, como la mielosupresión y los problemas gastrointestinales, ocurren en el curso temprano del tratamiento, dentro de los primeros días o semanas. Problemas más retardados que llegan a presentarse como consecuencia de la terapia anticáncer con ciertas drogas citotóxicas son las cardiomiopatías después de varios meses.



Actualmente, la terapia anticáncer es un motivo de gran trabajo para cientos de investigadores en todo el mundo, y mes con mes se publica información sobre la mejor terapia contra los tumores más comunes y letales; esta lista es tan amplia que podría resumirse en seis consideraciones generales:

1. Diseñar fármacos que rompan la asociación que existe entre el tumor y las proteínas producidas por los oncogenes.
2. Diseñar fármacos que mimeticen el efecto tóxico de las proteínas supresoras de tumores, a los que los cánceres son susceptibles.
3. Retrasar el progreso del tumor, en la imposibilidad de sanarlo.
4. Frenar su formación en fase precoz, sintetizando fármacos que protejan o restablezcan la función de los genes maestros.
5. Idear algún medio para destruir selectivamente células con cromosomas anómalos, como una biopsia que revelara la presencia

Cuadro 12

Procedimientos biológicos para la terapia anticáncer

1. Procedimiento inmunológico/modificación de la respuesta biológica.
 - a) Estimulación inmune no específica
 - Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)
 - Corynebacterium parvum
 - Liposoma muramitripéptido (MTP)
 - Levamisol
 - b) Biomoduladores
 - Citocinas (interferones, interleucinas, TNF)
 - Factores estimulantes de colonias
 - c) Terapia con anticuerpos (estimulación inmune pasiva específica)
 - Anticuerpos monoclonales
 - Conjugados de anticuerpos monoclonales (la "bala mágica")
 - d) Vacunas (estimulación inmune activa específica)
2. Procedimiento molecular/manipulación genética de las células cancerosas.
3. Métodos para inducir la diferenciación de células cancerosas.

de células aneuploides en cuantía desmesurada; así se podría garantizar una observación cuidadosa o una cirugía preventiva en ciertos casos.

6. Examinación de alimentos, fármacos y productos químicos para identificar los compuestos causantes de aneuploidía.

Finalmente, se han adoptado nuevos procedimientos para el manejo del cáncer, particularmente por medio de técnicas que modifican la respuesta biológica del hospedero hacia el cáncer o la capacidad del hospedero para resolver o soportar los efectos colaterales de las drogas citotóxicas (*cuadro 12*).

Bibliografía

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4ª ed. EE.UU.: Garland Science Taylor & Francis Group, 2008.
- Arce FM. Transformación de hepatocitos fetales en cultivo primario con carcinógenos químicos (tesis para obtener el grado de biólogo). Los Reyes Iztacala, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
- Dobson JM, Gorman NT. Cancer chemotherapy in small animal practice. Gran Bretaña: Blackwell Scientific Publications, 1993.
- Gibbs WW. Las raíces del cáncer. Investigación y Ciencia, sept. 2003.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Lawrence S, Matsudaira P, Darnell J. Molecular cell biology. 3ª ed. EE.UU.: Scientific American Books, 1995.
- Potten C, Wilson J. Apoptosis. The life and death of cells. Cambridge (Reino Unido): Cambridge University Press, 2004.
- Weinberg RA. The biology of cancer. EE.UU.: Garland Science Taylor & Francis Group, 2007.

12

Aplicación de la biología celular
a la medicina veterinaria
y zootecnia



Capítulo 12

Aplicación de la biología celular a la medicina veterinaria y zootecnia

Jorge Hernández Espinosa

Objetivos temáticos

- Animales manipulados genéticamente.
- Terapia génica.

Introducción

Una de las aplicaciones de la biología celular es la *terapia génica*; ésta constituye una herramienta útil para el tratamiento de diversas enfermedades. Su desarrollo ha sido posible por la suma de los avances del conocimiento en diversos campos, como la biología celular y molecular, la genética, la virología y la bioquímica, entre otras, y probablemente en el futuro revolucionará la concepción de la medicina veterinaria y zootecnia.

La terapia génica puede definirse como el uso de la información almacenada en los genes para el tratamiento de las enfermedades. Esta terapia se basa en el reemplazo de un gen defectuoso, tomando el ADN que codifica una proteína específica y su introducción en las células de un paciente, con la finalidad de restablecer la función celular normal.

Con el empleo de la terapia génica se pretende curar enfermedades hereditarias, que en su mayoría se originan por la presencia de genes de-

fectuosos mediante la introducción de genes sanos. Esta técnica también es útil en el tratamiento de diversas enfermedades actualmente incurables como son el cáncer, determinadas alteraciones infecciosas (hepatitis y sida); problemas cardiovasculares (hipercolesterolemia y aterosclerosis), neurodegenerativos (enfermedades de Parkinson y de Alzheimer) o crónicos (artritis reumatoide). En el ser humano, más de cinco mil enfermedades se han atribuido a factores genéticos.

Animales manipulados genéticamente

El desarrollo de las técnicas transgénicas se inició en los años setenta y a principios de los ochenta; en ellas, el principal modelo animal utilizado con éxito hasta nuestros días ha sido el ratón. Además de éste, se han utilizado con éxito otras especies como el borrego, la rata, la cabra, el cerdo, el bovino, el conejo y los peces.

Con la técnica desarrollada por los investigadores estadounidenses Palmiter y Brinster se logró modificar el genoma del ratón, por medio de la inserción de un gen completo que recibió el nombre de transgén, el cual era un fragmento de ADN que codificaba la información necesaria para



una proteína: la hormona del crecimiento, y que provenía de una especie diferente (rata). El resultado final fue que el ratón manipulado incorporó a todas sus células el gen, y lo transmitió de manera funcional a su descendencia, lo que generó crías con mayor talla corporal que la del progenitor.

El principal obstáculo en la generación de un *animal transgénico* es la dificultad de lograr que un gen ajeno (*transgén*) se inserte en el genoma propio, puesto que 1) el transgén es una molécula de gran tamaño y con cargas electrostáticas, por lo cual no puede atravesar la membrana plasmática y 2) la inserción del transgén debe realizarse en un estadio temprano del desarrollo embrionario para que todas o casi todas sus células sean transgénicas, incluyendo a las células germinales. Por ello, mientras menos células tenga el embrión manipulado, mayor proporción de ellas adquirirá el transgén y, por lo tanto, aumentarán las posibilidades de que sus gametos lo transmitan a las generaciones siguientes, y de esta manera se establecerá una cepa o línea de ratones transgénica, cuyos individuos podrán usarse en distintos estudios.

Por lo anterior, la metodología con mejor éxito es aquella en la que se microinyectan genes clonados en un óvulo fertilizado con dos pronúcleos, uno masculino y otro femenino, los que darán lugar al embrión unicelular. Cientos de copias del ADN extraño disueltas se inyectan directamente en uno de los dos pronúcleos, y después el embrión inyectado será transferido al útero de la madre receptora; al final, se espera que finalice el desarrollo embrionario.

El porcentaje de cigotos que sobreviven a la manipulación y al desarrollo varía entre 10 y 30%. De los sobrevivientes, la proporción de individuos que presentaban ADN extraño en sus cromosomas era de 2 a 40%. El ADN extraño aparecía integrado al azar sin preferencia por un lugar concreto en los cromosomas.

Posteriormente se intentó determinar si esos transgenes adquiridos se expresaban y, en ese caso, si su expresión estaba apropiadamente regulada. Estos experimentos se llevaron a cabo más adelante con *células totipotenciales* (células embrionarias del blastocito del ratón), las cuales se podían sembrar en un cultivo tisular, pero manteniendo intacta su capacidad de diferenciación. A estas células se les introdujo el ADN deseado, por transfección plasmídica o por infección retroviral. Las células transgénicas se inoculaban en el tejido diana, cuyas características permitían la diferenciación a células del tipo de aquellas del tejido en el que se encontraban, pero que transportaban en su interior los neogenes.

Como las células totipotenciales pueden ser manipuladas *in vitro* antes de inyectarlas en el embrión, los genetistas de ratones pudieron utilizar la *recombinación homóloga* para producir ratones transgénicos con mutaciones en genes específicos, o reemplazar genes mutados por su equivalente normal. Sin embargo, un transgén integrado en una localización cromosómica distinta de la de su duplicado endógeno normalmente se expresa de manera que mimetiza la expresión del gen endógeno.

En el caso del ARN codificado para la insulina humana, éste puede ser diferenciado fácilmente del ARN transcrito por los genes de la insulina del ratón. Cuando ratones transgénicos del gen de la insulina humana eran analizados, el ARN de la insulina humana sólo se encontraba en el páncreas y no en otros tejidos. Esto significa que la transcripción de los transgenes de la insulina humana era inducida por las mismas señales que inducían a los genes endógenos de la insulina del ratón, es decir, que respondía a las mismas señales reguladoras que los genes endógenos.

Los transgenes interrumpen la función de los genes endógenos sólo cuando su producto es requerido para una embriogénesis normal.



Las anomalías resultantes nos pueden dar pistas sobre el proceso de desarrollo a partir de los genes cuya función se ha interrumpido. Una línea de ratones transgénicos (S) fue creada usando una molécula de ARN recombinante comprimida de un virus del tumor de glándula mamaria del ratón (MMTV), LTR y el gen c-myc de ratón. Cuando el ratón heterocigótico se reproducía, algunos de sus descendientes tenían anomalías en los miembros anteriores y posteriores. Esto demostró que hubo congregación de la zona MMTV-myc y confirmó que la integración del transgén dañó al gen endógeno. El fenotipo de los ratones homocigóticos se asemejaba a una conocida mutación de un *locus*, llamado *ld*, para la deformación de los miembros; luego encontraron alelos para el *locus ld*, a los que se llamó *ld^{Hd}* (Harvard).

La localización cromosómica de la inserción de *ld^{Hd}* fue determinada y comparada con la *ld*. El ADN integrado con MMTV-myc era usado como etiqueta para clonar ADN de la región de inserción de la región *ld^{Hd}*. Luego, se vio que descendientes *ld/ld^{Hd}* tenían deformidades idénticas a los de *ld^{Hd}/ld^{Hd}*, lo que demostraba que los dos *loci* eran alélicos.

De este modo, la inserción transgénica puede ser utilizada no sólo para la identificación, sino para clonar genes importantes para el desarrollo.

Terapia génica

La introducción de genes en tipos celulares específicos es una poderosa herramienta para estudiar el desarrollo del ratón. En otro tipo de experimentos, el operón para un gen expresado en una célula diferenciada específica es usado para restringir la expresión de un gen de una toxina exclusiva de esa célula. Sólo el tipo celular específico es matado, y de esta manera pueden ser analizados los efectos de la ausencia de estas células durante el crecimiento del animal. Por ejemplo, el gen para la *elastasa 1*

se expresa únicamente en el páncreas exocrino, y sus secuencias reguladoras son usadas directamente en la expresión de la cadena de la toxina diftérica A, en esas células. Así, fueron obtenidos 25 ratones transgénicos, y siete de ellos carecían de un páncreas normal. Por medio del microscopio se descubrió que algunos poseían un páncreas rudimentario en el que la parte exocrina era altamente anormal.

Se han hecho experimentos similares de *ablación celular* usando otras secuencias promotoras. Las secuencias del gen del cristalino (lente proteínica) han sido utilizadas en la expresión directa de la cadena de la toxina diftérica en células de la lente del ojo en desarrollo.

Una dificultad en esta aproximación es que el gen de la toxina es activado tan pronto como la célula activa el gen endógeno. Si esto ocurriera tempranamente, la ablación de algunas líneas celulares podría ser letal para el desarrollo. En cambio, se ha descubierto un sistema inducible para una muerte selectiva de células, al unir el gen de la *timidina cinasa* del herpesvirus1 (tk), a secuencias promotoras de iniciación de células específicas. Las células que contengan ese transgén no se mueren hasta que se les añaden los nucleósidos sintéticos. Los nucleósidos no son tóxicos, pero la tk del herpesvirus metaboliza esos nucleósidos en productos que matan a las células en división.

La siguiente técnica ha sido empleada para determinar la relación de linaje en la pituitaria anterior. Se cree que las células que sintetizan prolactina derivan de una célula precursora que sintetiza hormona del crecimiento (HC). Las células productoras de HC y las de prolactina de la pituitaria anterior se han utilizado como células diana en ratones transgénicos, usando tk con ambas sustancias.

Seguido a la inyección de los nucleósidos sintéticos, los animales con promotores HC unidos a transgenes tk crecían en formas enanas y carecían,



tanto de células sintetizadoras de HC como de las que sintetizan prolactina, pero los que tenían transgenes prolactina-tk eran normales. La primera conclusión de este estudio fue que las células formadoras de prolactina no se dividían, ya que, si lo hicieran, morirían a causa de los nucleósidos metabolizados. La segunda fue que las células formadoras de HC debían de ser las precursoras de ambos tipos de células, ya que el ratón en el que se mataron las células formadoras de HC perdió sus células formadoras de prolactina.

La generación de individuos transgénicos se ha aplicado en diversas áreas del quehacer humano como son la agronomía, la medicina humana y la medicina veterinaria y zootecnia.

En la agronomía la aplicación de esta técnica ha logrado incrementar los índices de productividad de los cultivos, al protegerlos contra las plagas, las enfermedades, los herbicidas, las sequías y la salinidad elevada de los suelos. La tecnología transgénica en el campo se ha aplicado ya en algunos de los cultivos de mayor importancia para el hombre: los de papa, maíz, algodón y soya, entre otros.

En el caso de la medicina, la generación de animales transgénicos permite avanzar en el mejor entendimiento de los mecanismos que participan en la regulación y en el control de los genes, lo que favorece el desarrollo de la investigación biomédica básica.

En la medicina humana, una de las principales aplicaciones de la transgénesis es el desarrollo de modelos animales que permitan estudiar enfermedades de los humanos, y conocer más de los mecanismos involucrados en la proliferación y diferenciación celular.

En la medicina veterinaria y zootecnia la generación de individuos transgénicos ha favorecido el avance de la producción animal, ya que los ganaderos pueden obtener en sus animales mayores tasas de crecimen-

to con un menor consumo de energía, y además se han logrado modificar algunas de las características de los productos de origen animal, con la finalidad de hacerlos más adecuados para el consumo humano.

Para poder incorporar el transgén al individuo, se han desarrollado tres técnicas diferentes: la primera es la de microinyección; la segunda, la de la infección del individuo con un virus o retrovirus, y la tercera, la de la incorporación de células de teratocarcinomas portadoras del transgén. A continuación se describen brevemente.

Técnica de microinyección en el ovocito fecundado

Mediante esta técnica se obtienen animales completamente transgénicos, ya que todas sus células fueron originadas en el huevo fecundado. Si el ADN se depositara en el citoplasma, éste sería rápidamente degradado por el efecto de las enzimas; por esta razón, la microinyección debe aplicarse directamente en el núcleo. El procedimiento se lleva a cabo inmediatamente después de la fecundación, cuando todavía es posible observar los pronúcleos masculino y femenino separados, pues estas estructuras se sitúan cercanas a la superficie de la célula y posteriormente se fusionarán.

La desventaja de la microinyección en el ovocito fecundado es que no se pueden predecir los lugares de inserción en el genoma, por lo que la expresión del transgén podría ser muy alta, poca o nula.

Técnica de introducción de un transgén con el empleo de virus

En esta técnica el transgén se incorpora previamente al virus que infectará a un ratón huésped: así se logra la inserción a su genoma.



Técnica con células de teratocarcinoma portadoras del transgén

Los embriones de ratón, así como los de todos los mamíferos y de algunos otros animales, son reguladores; es decir, son capaces de amortiguar cierto grado de perturbaciones siempre que ocurran tempranamente, para que continúe un desarrollo normal. Así, por ejemplo, se puede dividir un embrión en dos o fusionar dos embriones en uno durante el desarrollo previo a la formación del blastocito y a su implantación en el endometrio; de los embriones divididos o fusionados resultarán ratones perfectamente viables, normales, en el primer caso, y quiméricos, en el segundo.

Otra propiedad sorprendente de los embriones de ratón es que son capaces de normalizar células tumorales cancerosas (teratocarcinomas). Si este tipo de células se agrega entre dos mórulas (embriones que tienen alrededor de ocho células) o se introduce en la cavidad de un blastocito, ellas se incorporarán al embrión, donde pierden frecuentemente sus características tumorales, normalizándose, y sus células hijas se podrán encontrar diferenciadas en los tejidos del cuerpo. No toca aquí analizar el significado de estas observaciones y sólo se mencionan porque sobre esta base se ha desarrollado un tercer método para obtener animales transgénicos, el cual consiste en introducir el gen en células de teratocarcinoma que se cultivan *in vitro* formando monocapas, ya sea microinyectando solución de ADN o infectando con virus para luego incorporar unas cuantas de estas células transgénicas en embriones preimplantacionales. Aunque el éxito de este método se ve disminuido porque no siempre las células transgénicas se encuentran en la línea germinal, es en muchos casos el mejor, pues ofrece la posibilidad de analizar la inserción del transgén y seleccio-

nar las células tumorales transgénicas antes de agregarlas al embrión. La modificación del genoma de las células diana para que sinteticen una proteína de interés terapéutico permite compensar una insuficiencia debida a la alteración de un gen celular, estimular una mejor respuesta inmunitaria contra un tumor o conferir resistencia a la infección producida por un virus.

Concretamente, la terapia génica del cáncer se podría dirigir a:

1. Fortalecer la protección natural del sistema inmunitario contra las células anormales, incrementando el carácter extraño de éstas para estimular la acción del sistema inmunitario contra ellas.
2. Eliminar los tumores introduciendo “genes suicidas” en células tumorales que transformen una sustancia no tóxica (por ejemplo, el aciclovir) en un veneno.
3. Compensar el efecto cancerígeno de la mutación en un *gen supresor de tumores* (por ejemplo, el antioncogén p53) o bloquear la acción de un gen generador de tumores (*oncogén*). Para ello se deberían modificar todas las células tumorales. Además, la mayoría de los cánceres se producen por varias anomalías genéticas, lo que significa que la reversión de una sola seguramente no detendría la enfermedad. Este tratamiento sería importante en los casos de predisposición familiar hereditaria, en los que la mutación en un solo gen es fundamental.

Para que la terapia génica sea eficaz hay que resolver problemas relativos a la regulación de la expresión génica y a la fisiología del trasplante celular.

Las técnicas empleadas se basan en la adición del gen sano, que puede permanecer fuera del cromosoma (episoma) o insertarse al azar



en el genoma. En este caso, los genes insertados no se suelen expresar eficazmente y, además, pueden dañar a algún gen esencial. El proceso denominado *sustitución dirigida de genes* puede solucionar este problema. Se trata de introducir cambios específicos en la secuencia de nucleótidos de un gen. Así, es posible estudiar la intervención de los genes en los procesos biológicos. Identificar los genes y las mutaciones responsables de ciertas enfermedades permitirá conseguir las mismas mutaciones en ratones para estudiar el mecanismo molecular de esas enfermedades y diseñar las terapias más eficaces.

Bibliografía

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4ª ed. EE.UU. (Nueva York): Garland Science Taylor & Francis Group, 2008.
- Chan Anthony WS. Transgenic nonhuman primates for neurodegenerative diseases. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 39.
- Karp G. Biología celular y molecular. México: McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- Kim Jong B, O'Hare MJ, Stein R. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res.* 2004; 6(1): 22-30.
- Lai Liangxue, Prather Randall S. Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003; 1: 82.
- Paniagua R *et al.* Biología celular. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000.

13

Métodos en biología celular



Capítulo 13

Métodos en biología celular

María de Lourdes Juárez Mosqueda

Juan Ocampo López

Objetivos temáticos

- Microscopía electrónica.
- Métodos para estudiar el ADN.
- pH.
- Aislamiento e identificación de proteínas: ultracentrifugación, cromatografía y SDS-PAGE.
- Cultivo de células.
- Inmunodetección de moléculas con anticuerpos.

Introducción

Dentro de la actualización del plan de estudios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se creó la asignatura de Biología Celular Veterinaria, en la que se analiza la integración morfológica y bioquímica de la célula; dicha materia forma parte del área del conocimiento biológico básico, necesario para la formación del médico veterinario zootecnista contemporáneo.

El presente capítulo constituye una guía para que el alumno conozca los fundamentos experimentales de esta disciplina, que son la base para una mejor comprensión y asimilación de los contenidos que se dan en la parte teórica del curso.

Se inicia con los conceptos básicos de la microscopía electrónica, que es una de las principales técnicas que apoyan el estudio de las células. En segundo término, se mencionan las metodologías más empleadas en el estudio del ADN, fundamentales para la investigación en la biología celular y molecular.

En la tercera parte se trata el tema del pH; en él se abarcan los aspectos teóricos con la intención de que el alumno lo comprenda mejor, ya que tener claro este concepto es esencial para el entendimiento de las técnicas experimentales en el estudio de las proteínas. Enseguida se ilustran las técnicas para el estudio de las proteínas de la célula, que son primordiales en la investigación de la biología celular moderna. Se continúa con los conocimientos básicos de la metodología para el cultivo y análisis de células *in vivo*. Esta parte del libro concluye con el uso de los anticuerpos como una herramienta para la identificación de proteínas.

Con el presente capítulo se pretende apoyar al alumno para que al finalizar el curso de Biología Celular Veterinaria conozca las técnicas fundamentales para el estudio de las células y pueda explicar con más facilidad los conocimientos adquiridos en la parte teórica del curso.



Microscopía electrónica

El objetivo de esta sección es dar a conocer los principios básicos del microscopio electrónico de transmisión, así como el procesamiento de rutina del material biológico, para su observación en este tipo de microscopio.

En el estudio de las ciencias biológicas, entender la estructura y función de los organismos vivos es esencial; entre los instrumentos necesarios para los científicos en biología están el microscopio de luz y el microscopio electrónico. La observación de una célula en el microscopio de luz proporciona poca información sobre su organización interna. El concepto actual de la célula, con su complejidad y alta organización, se ha obtenido en los últimos 30 años gracias a la utilización de modernos métodos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e inmunológicos. El microscopio de luz, en principio, es usado para observar tejidos y células; mientras que el microscopio electrónico lo es para examinar detalles celulares, subcelulares y macromoleculares.

La investigación con el microscopio electrónico ha proporcionado una gran cantidad de información a la biología celular y molecular y ha permitido, junto con otras metodologías, obtener un conocimiento más integral de los diversos fenómenos celulares mediante la concepción de estructura y función como unidad.

Breve consideración histórica sobre la microscopía electrónica

La posibilidad de construcción del microscopio electrónico se hizo evidente a partir de los adelantos en la física electrónica. L. de Broglie, en 1924, formuló una hipótesis en la que asociaba una naturaleza ondulatoria a cada partícula material –en especial a los electrones–, en función de su velocidad de aceleración y su masa. Así, al someter un filamento de

tungsteno precalentado a una diferencia de potencial con el ánodo de 60 000 voltios, éste emite un haz de electrones con longitudes de onda de aproximadamente 0.005 nm. Dos años más tarde, H. Bush demostró que los electrones emitidos por un filamento podían ser enfocados con simetría axial por medio de campos magnéticos que funcionan como lentes. En 1932, E. Ruska y M. Kwohl presentaron en Alemania el prototipo de un microscopio electrónico, con un poder de resolución no mayor del que brindaba el microscopio de luz.

El microscopio electrónico moderno

El microscopio electrónico moderno tiene un poder resolutivo de 0.1 a 0.2 nm (1 a 2 Å), por lo que se le ha denominado de *alta resolución*. Sin embargo, para el estudio de material biológico en donde intervienen varios factores, tales como el espesor e inestabilidad del espécimen, la resolución más conveniente es de 0.5 a 1.0 nm, que se obtiene con un microscopio de transmisión, en el cual la imagen se forma, –por el paso de los electrones a través de los sitios menos densos– en los especímenes que presentan zonas de diferente densidad, mientras que en los más densos los electrones se refractan. Así, la diferencia entre electrones que pasan y los que no pasan la muestra condiciona la formación de una imagen contrastada que puede observarse en la pantalla fluorescente del microscopio electrónico, o bien, en una placa fotográfica impresa.

Funcionamiento de un microscopio electrónico de transmisión

Los *electrones* son utilizados como fuente de radiación o iluminación. Son partículas cargadas negativamente, incapaces de pasar a través del vidrio



y producir refracción. Los campos electromagnéticos que rodean el haz de electrones, en diferentes niveles de su trayecto, son los que actúan como lentes, similares a las del microscopio de luz. El trayecto de los electrones puede ser igualmente alterado o distorsionado con facilidad por la presencia de moléculas con carga, presentes en el aire, ya que éstas colisionan con los electrones. Para evitar lo anterior, se requiere un sistema hermético de vacío que elimine todo tipo de moléculas en la columna del microscopio electrónico y proteja el trayecto del haz de electrones. Este vacío se obtiene por medio de bombas especiales que producen una baja presión. Los electrones, como se sabe, no son visibles al ojo humano, por lo que se necesita un transductor –que puede ser una pantalla fluorescente o la emulsión de una placa fotográfica–, en el cual se formen imágenes evidentes. Cabe señalar que los especímenes deben prepararse extraordinariamente delgados (20 a 100 nm), para que puedan ser atravesados en diferentes grados de intensidad por los electrones y, de esta manera, se forme la imagen.

En resumen, la columna de cualquier microscopio electrónico de transmisión consta de una fuente de electrones, un medio para acelerarlos, lentes electromagnéticas para controlarlos, un sistema de selección de electrones y una pantalla fluorescente.

La emisión de electrones proviene del calentamiento de un filamento de tungsteno (cátodo); éstos, al ser emitidos por el cátodo, son acelerados (jalados) por la aplicación de un alto voltaje positivo al ánodo, ubicado abajo del filamento, mientras que el cañón concentra y controla su flujo. Los tres sistemas de lentes (condensador, objetivo y proyector) funcionan como en el microscopio de luz. La introducción de lentes intermedias, que se encuentran entre la objetiva y la proyectora, aumenta considerablemente la imagen proveniente del objetivo y pueden obtenerse aumentos efectivos de hasta un millón de veces en la pantalla fluorescente.

Preparación de muestras biológicas

La preparación de materiales biológicos es muy parecida a los procedimientos de inclusión en parafina. Por lo tanto, se requiere fijación, deshidratación, aclaramiento, inclusión, corte y tinción.

Fijación

La mayoría de los químicos usados en la fijación son venenosos o tóxicos, sus vapores afectan los ojos, membranas mucosas, nariz y garganta; de ahí la importancia de un buen sistema de ventilación.

Los principios fundamentales de la fijación de un biológico en la microscopía electrónica son los siguientes:

1. Preservar la estructura de la célula con la mínima alteración morfológica de su estado viviente.
2. Proteger la célula de los daños que pueden ser ocasionados durante las manipulaciones en la deshidratación, la inclusión y el corte.
3. Preparar el espécimen para el tratamiento subsecuente, incluyendo tinción y exposición al haz de electrones.
4. La fijación debe también disminuir la alteración por reactividad química de varias sustancias presentes entre los tejidos.

En la práctica la fijación es selectiva, en el sentido de que el objetivo del estudio determina el método de fijación que se usa.

El método de fijación química más común es el llamado fijación por inmersión, que consiste en introducir pequeños fragmentos de muestra (menos de 1 mm de espesor) dentro del líquido fijador. Esta maniobra debe efectuarse lo más rápidamente posible después de la obtención del espécimen.



Los fijadores más usados son el tetraóxido de osmio y el glutaraldehído. Uno de los procedimientos más comunes para el estudio de la estructura fina de las células emplea la fijación doble, consistente en fijar primero con *glutaraldehído* y después con *tetraóxido de osmio*. Los líquidos fijadores se preparan con amortiguadores que mantienen un pH similar al fisiológico del tejido; los de mayor empleo son fosfatos, cacodilatos, la S-colidina y el acetato de veronal. Además del pH, se deben tener en cuenta otros factores de las soluciones fijadoras, como la composición de iones, osmolaridad, temperatura y concentración.

La mayoría de los fijadores en microscopía electrónica son aditivos no coagulativos, ya que terminan formando parte de las proteínas que fijan, a las que transforman en un gel transparente y no las coagulan, lo que evita que se opaquen.

No se conoce la duración óptima de fijación para la mayoría de los tejidos. Para una considerable parte de los propósitos, se ha estandarizado arbitrariamente una duración de una a cuatro horas, usando una temperatura de 0 a 4°C.

El tetraóxido de osmio, además de ser un fijador aditivo no coagulante, actúa como contrastante electrónico, ya que el osmio reducido imparte un alto contraste a las estructuras a las que se une, en especial los fosfolípidos de las membranas celulares y los ácidos grasos no saturados.

Lavado y deshidratación

Estas dos etapas únicamente son necesarias porque las resinas epoxi empleadas en la inclusión no se mezclan con los fijadores acuosos. Hay que utilizar un disolvente intermediario que se mezcle tanto con el fijador como con las resinas y que no reaccione con ellos. El etanol es el agente que se utiliza para la deshidratación; sin embargo, reacciona con el

tetraóxido de osmio, produciendo una precipitación en el tejido. Por eso, el lavado anterior a la deshidratación debe ser perfecto. La acetona es otro agente deshidratante que no reacciona y se necesita únicamente un lavado mínimo para retirar las sales del amortiguador. La deshidratación se realiza en una serie gradual de concentraciones crecientes de etanol o acetona.

Aclaramiento

Aunque las resinas epóxicas se mezclan con los alcoholes, se acostumbra añadir una etapa más cuando se trata de tejidos de difícil inclusión. Para ello el disolvente ideal es el óxido de propileno; se mezcla con el etanol, disuelve muy bien las resinas epoxy y es muy volátil. La adición de una etapa empleando cantidades iguales de óxido de propileno y resina epóxica puede facilitar la inclusión del material problema.

Inclusión

El propósito de la inclusión es manejar el tejido, en un medio sólido, que tenga la fuerza suficiente para obtener cortes finos. A continuación se menciona la serie de las características idóneas de un medio de inclusión:

1. Inducir muy poca o ninguna extracción de constituyentes celulares.
2. Los monómeros de estas sustancias deben ser solubles en los solventes estándar.
3. De fácil penetración en los tejidos.
4. Presentar poco cambio en el volumen durante la polimerización y endurecimiento.
5. Ser termoestables bajo el bombardeo de electrones.
6. La calidad de los cortes debe ser muy buena, de tal forma que sea homogénea, dura, con plasticidad y elasticidad adecuada.
7. Tener alta resistencia al calor generado por el seccionamiento.



8. Ser estables en el proceso de tinción.
9. Con una polimerización uniforme.
10. Ser miscible con otros medios de infiltración.
11. Fácil de conseguir.
12. Que garantice buena preservación de la estructura fina.

La infiltración implica, en esencia, un desplazamiento gradual del agente deshidratante en un medio plástico, para dar una completa impregnación de los intersticios de un tejido con el medio. La duración de la infiltración depende del tipo de tejido y del plástico usado; todos los pasos anteriores a la polimerización se hacen completamente a temperatura ambiente.

La infiltración final es conveniente hacerla en cápsulas de polietileno o gelatina procesada.

Las cápsulas que contienen la mezcla infiltradora y los bloques de tejido se polimerizan en un horno. El tiempo requerido para la polimerización varía entre los diferentes plásticos. Un periodo de 36 horas a 60°C, en promedio, es suficiente para completarla.

Un medio de inclusión consta de los siguientes componentes:

1. sustancia infiltradora
2. endurecedor
3. acelerador
4. emplastificador

Sustancias infiltradoras más comunes:

- resinas epóxicas
- poliésteres o hidroxialcoholes
- resinas hidrofílicas

Los medios de inclusión más usados en la actualidad son las resinas epóxicas (Epon 812, araldita, maraglas, DER 723, DER 736 y ERL 4206).

Los *endurecedores* por lo general son anhídridos. Ejemplos:

- DDSA (anhídrido dodesenil succínico)
- NMA (anhídrido metilnádico)
- HHP (anhídrido exahidroftálico)
- NSA (anhídrido nonenilsuccínico)

Los *catalizadores*, en terminos generales, son aminas terciarias, cuyo porcentaje utilizado debe ser exacto para lograr la cura:

- BDNA (benzil-dimetilamina)
- DNP-30 (tridimetilamino-metilfenol)
- DMP-10 (demilaminometilfenol)
- DMAE o S-1 (dimetilaminoetanol)

Corte

Los ultramicrotomos usados en microscopía electrónica para obtener cortes de 20 a 100 nm de espesor surgieron de las modificaciones de los microtomos convencionales para cortes de parafina, en los que se introdujeron: *a)* un sistema de avance más fino, *b)* adaptación de un microscopio estereoscópico para poder observar los cortes finos que se obtienen y *c)* utilización de cuchillas de vidrio o de diamante.

Se necesita un sistema de iluminación adecuado en el ultramicrotomo, así como sistemas que faciliten la visión de los cortes flotando en el agua y para cortarlos y montarlos en las rejillas.

El grosor de los cortes para microscopía electrónica presenta colores de interferencia parecidos a los de las películas de aceite en la superficie del agua.



Color	Grosor (nm)	Utilidad
Gris	< 60	para alta resolución
Plateado	60-90	muchos propósitos
Dorado	90-150	pocos aumentos
Púrpura	150-190	semifinos
Azul	190-240	"
Verde	240-280	"
Amarillo	280-320	"

Para ver los colores con claridad es importante que la luz de la lámpara se refleje en el agua formando una especie de espejo. Una vez que se tienen los cortes que están flotando sobre la superficie del agua, se pasan a una *rejilla*.

Para el montaje de las muestras existen rejillas de muchos modelos y se debe elegir el que se adapte mejor al problema en cuestión. Se pueden utilizar rejillas con un sólo agujero o rejillas que tienen agujeros pequeños ordenados circularmente. Las hay de cobre, platino y oro.

Tinción

Para el microscopista electrónico, el acto de *tinción* significa aumentar el contraste de un objeto, depositando en él átomos de alto número atómico, mayor que el promedio de los átomos (C, O, N, H) que generalmente componen la materia orgánica. La fijación con tetraóxido de osmio introduce átomos pesados en los lugares donde ha reaccionado el osmio. Otros metales pesados, como el plomo, vanadio, uranio y plata, se utilizan en forma de sales para aumentar el contraste. El método más utilizado en la microscopía electrónica de transmisión es el doble contraste, con el acetato de uranilo y el citrato de plomo.

Diseño celular básico

Para describir aquellos componentes celulares no visibles con el microscopio de luz, se habla de una *ultraestructura celular*. La discusión de la ultraestructura celular se centra en las fotografías tomadas con el microscopio electrónico (microfotografías electrónicas). Generalmente, las microfotografías sólo muestran una porción de la célula; por lo tanto, es esencial interpretarlas en términos de una célula tridimensional entera.

- **Núcleo.** Físicamente, el nucleoplasma está separado del citoplasma por una doble membrana, *la envoltura nuclear*. La *cromatina* y la sustancia nucleoproteínica del núcleo, pueden ser observadas. La envoltura nuclear posee perforaciones llamadas *poros nucleares*. Estudios ultraestructurales y bioquímicos indican que las sustancias químicas pasan a través de los poros, pero no lo hacen por difusión simple; los poros pueden regular activamente el movimiento de los materiales.
- **Citoplasma.** Por fuera, el citoplasma está limitado por la membrana plasmática y por dentro, por la envoltura nuclear. Los diversos organelos intracitoplasmáticos e inclusiones que son vistos con dificultad o poco detalle con el microscopio de luz, ahora son fácilmente reconocibles. Además, se observa que cada organelo posee una organización ultraestructural muy particular.
- **Retículo endoplasmático.** El citoplasma contiene una vasta red (retículo) de túbulos interconectados y vesículas que abarcan gran parte del citoplasma. Esta red es el retículo endoplasmático (RE); reconstruido de forma tridimensional, el RE es una vasta e interconectada cavidad limitada por una membrana simple. La membrana del RE se continúa con la envoltura nuclear.



Funcionalmente, el RE separa el citoplasma en un espacio intramembranario (el material dentro de los canales) y en un espacio externo (el resto del citoplasma y organelos asociados). La función del RE es variada. Proporciona un medio de transporte de materiales diversos a través de la célula, lleva a cabo diferentes reacciones bioquímicas de biotransformación; también proporciona una red ultraestructural que sirve como soporte de los ribosomas, que interactúan a su vez con el retículo, en la síntesis y maduración de proteínas.

- *Ribosomas*. Son gránulos pequeños de aproximadamente 1 500 nm de diámetro, que se encuentran presentes en todas las células. Están compuestos de proteínas y un complejo de ácidos ribonucleicos. Funcionan en la síntesis de las proteínas celulares. A menudo se encuentran unidos a la superficie del RE; para describir esta asociación se emplea el nombre de retículo endoplasmático rugoso (RER).
- *Mitocondrias*. Las mitocondrias son pequeños organelos citoplasmáticos. Son especialmente abundantes en las células que tienen un alto nivel de actividad metabólica. Al microscopio electrónico se observa que su superficie está delimitada por un par de membranas: una mitocondrial interna y otra externa. La externa es un “saco” membranoso que separa la membrana mitocondrial interna del citoplasma. La interna presenta un gran número de pliegues, en cuyo interior se localiza la *matriz* del organelo, que posee las enzimas del ciclo de Krebs. Estas proyecciones son las *crestas mitocondriales*.
- *Aparato de Golgi*. Está constituido por sacos, o cisternas aplanadas, rodeados de membrana y apilados paralelamente. No hay comunicación entre las membranas de las cisternas vecinas. La

cisternas están a menudo incurvadas, de tal modo que el organelo, en conjunto, posee una superficie convexa y otra cóncava. Pequeños sacos o vesículas a menudo se desprenden de las membranas hacia el extremo del complejo. Este organelo es importante en funciones citoplasmáticas secretorias y es particularmente abundante en las células que secretan de manera activa.

- *Vacuolas*. Una membrana vacuolar separa su contenido del resto del citoplasma. Pueden tener funciones de almacenamiento.
- *Lisosomas*. Son vesículas pequeñas limitadas por una membrana. Contienen una gran variedad de enzimas digestivas y participan en la digestión intracelular.
- *Inclusiones citoplasmáticas*. En el citoplasma de muchas células están presentes muy diversas inclusiones que no se consideran organelos. Por ejemplo, en el citoplasma se acumulan numerosos gránulos de secreción. En ciertas células animales, el *glucógeno*, se presenta como pequeños granulos densos. Se estima que las inclusiones citoplasmáticas son constituyentes celulares no siempre indispensables, y a menudo son transitorios.
- *Citoesqueleto*. Ciertos elementos fibrilares de la matriz citoplasmática no se definen como organelos o inclusiones, sino que constituyen una tercera categoría: la de los *componentes citoesqueléticos*: *microtúbulos*, *microfilamentos* y *filamentos intermedios*.
- *Artificios*. La mayoría de las muestras biológicas deben prepararse de alguna manera para ser observadas al microscopio electrónico, y esa manipulación permite la introducción de artificios. Entiéndase artificio como aquello que se introduce artificialmente, una modificación en la apariencia, o bien, una alteración estructural de la materia viviente generada por un agente exter-



no, químico o físico, el cual no es indicativo de la organización estructural verdadera y concierne al observador dilucidarlo.

Métodos para estudiar el ADN

El objetivo de este apartado es conocer los principales métodos para manipular experimentalmente el ADN de las células.

La tecnología recombinante del ADN, fundamentada en nuevos métodos para estudiar la más importante de las biomoléculas, nació a principios de los años setenta. Esta área de experimentación sólo podía abordarse de una manera indirecta, a través del análisis de la expresión fenotípica de los genes. Hoy en día es posible separar una región específica del ADN, sacarle un número ilimitado de copias y determinar su secuencia a una velocidad de cientos de nucleótidos por día. Incluso, un gen aislado puede ser rediseñado (mutagénesis de sitio específico) y transferido a un gameto de un animal o planta para hacerlo parte funcional y heredable del genoma de este organismo (transgénesis). Así, esta tecnología ha producido un fuerte impacto en todos los aspectos de la biología celular, al proporcionarle poderosos medios para analizar y cambiar genes y proteínas.

La llamada *tecnología recombinante del ADN* comprende una variedad de técnicas, entre las cuales las más importantes son:

1. Fragmentación del ADN.
2. Secuenciación de nucleótidos.
3. Hibridización de ácidos nucleicos.
4. Amplificación del ADN por la técnica de PCR.
5. Clonación del ADN.
6. Ingeniería del ADN (transgénesis).

Fragmentación del ADN

Las *enzimas de restricción*, también llamadas *endonucleasas de restricción*, reconocen secuencias específicas en el ADN de doble hélice y cortan ambas hebras en lugares concretos. Estas enzimas se han equiparado con bisturíes de gran precisión. Son indispensables para analizar la estructura de los cromosomas, secuenciar fragmentos muy largos de ADN, aislar genes y crear nuevas moléculas de ADN que puedan ser clonadas; es posible aislarlas de un gran número de bacterias. Su función biológica consiste en destruir moléculas de ADN extraño. Muchas de estas nucleasas reconocen una secuencia específica de entre cuatro a ocho nucleótidos en el ADN. Estas secuencias en el ADN propio de la célula no se degradan porque los centros que reconocen sus propias enzimas (residuos de A o C) están metilados. Se han identificado más de 500 diferentes endonucleasas, muchas de las cuales reconocen diferentes secuencias de nucleótidos, y en la actualidad están disponibles de manera comercial. Se nombran con una abreviatura de tres letras, que se refiere al organismo productor (p. ej. "Eco", de *E. coli*; "Hin", de *Haemophilus influenzae*).

Algunas nucleasas de restricción generan extremos romos y otras dejan, en los extremos liberados por el corte, pequeñas prolongaciones en el extremo 5' o en el 3'. A estas prolongaciones de cadena sencilla se les conoce como *extremos cohesivos* o *pegajosos*, ya que tienen una afinidad específica entre sí (son complementarios). Los extremos cohesivos generados por una misma enzima de restricción (o con otra nucleasa que produzca los mismos extremos cohesivos), sin importar el origen del ADN, pueden ser fácilmente unidos, lo que produce *moléculas híbridas* o *recombinantes*.

Las enzimas de restricción cortan una molécula de ADN extraída de una célula, en una serie de fragmentos específicos conocidos como



fragmentos de restricción, que se pueden analizar y manipular con más facilidad que la molécula original. El conjunto de fragmentos de ADN, obtenidos después del tratamiento con una combinación de enzimas de restricción pueden servir como una *huella digital* de una molécula de ADN (mapa de restricción).

Se pueden detectar fácilmente pequeñas diferencias entre moléculas similares de ADN, separando sus fragmentos por electroforesis en gel. Se utilizan geles de poliacrilamida para separar fragmentos de hasta unos mil pares de bases, y geles de agarosa, para resolver mezclas de fragmentos mayores (de hasta unas 20 kb). Las bandas de ADN en los geles de agarosa o poliacrilamida son invisibles, a menos que el ADN sea marcado o teñido por algún método. Uno de ellos es hacerlo con *bromuro de etidio*, el cual presenta una intensa fluorescencia naranja cuando es expuesto a la luz ultravioleta. Otro método más sensitivo es la incorporación de radioisótopos en el ADN antes de la electroforesis (p. ej., el ^{32}P). Las bandas o manchas de ADN radiactivo pueden visualizarse en los geles por *autorradiografía*.

Secuenciación de nucleótidos

El análisis de la estructura del ADN y su relación con la expresión genética se ha visto altamente facilitado por el desarrollo de poderosas técnicas para la secuenciación de moléculas de ADN. Originalmente fueron desarrollados dos métodos para la secuenciación del ADN: uno *químico* y otro *enzimático*.

Método químico

El *método de hidrólisis química* parte de un fragmento de restricción de ADN marcado en un extremo de sus hebras con ^{32}P y la división de la muestra en cuatro porciones. Como primer paso, cada porción es colocada en un medio que permita la disociación de las hebras del ADN dúplex

y se trata con un agente químico que destruye diferencialmente una de las cuatro bases en el ADN. En general se utiliza una *polinucleótido-cinasa* para añadir ^{32}P al extremo 5'-hidroxílico. En la mezcla de reacción para destruir una base dada, cada cadena rota origina en consecuencia un fragmento radiactivo que se extiende desde el extremo marcado con ^{32}P hasta una de las posiciones de dicha base. Se producen fragmentos para cada una estas posiciones; por ejemplo, si la secuencia es:



los fragmentos radiactivos producidos por ruptura específica en el extremo 5' de cada una de las cuatro bases serían:

		fragmento sin marca
Ruptura en A:	$^{32}\text{P-GCT}$	CGTA
	$^{32}\text{P-GCTACGT}$	-
Ruptura en G:	$^{32}\text{P-GCTAC}$	TA
Ruptura en C:	$^{32}\text{P-G}$	TACGTA
	$^{32}\text{P-GCTA}$	GTA
Ruptura en T:	$^{32}\text{P-GC}$	ACGTA
	$^{32}\text{P-GCTACG}$	A

Los fragmentos de cada mezcla se separan a continuación por *electroforesis en gel de poliacrilamida*, que puede separar moléculas de ADN que difieren en longitud por sólo un nucleótido. Con el gel se hace una autorradiografía, que se obtiene al exponer dicho gel con el material radiactivo, ante una película sensible a los rayos X, para que la radiactividad emitida delate la presencia de las moléculas radiactivas. Al velar la emulsión de la película, a partir del patrón de bandas, se determina la secuencia del fragmento de ADN. En el siguiente ejemplo, la banda de



nivel más bajo correspondería al carril C, la siguiente hacia arriba estaría en el carril T, y la siguiente, en el A. Por lo tanto, la secuencia de los tres primeros nucleótidos es 5'-CTA (la identidad del nucleótido en el extremo 5', en este caso G, no se descubre por este procedimiento). Al leer las siete bandas del gel en orden ascendente se obtiene la secuencia 5'-CTACGTA-3'. Por lo tanto, el autorradiograma de un gel producido a partir de cuatro procesos distintos de ruptura química muestra un conjunto de bandas sobre el cual se puede leer directamente la secuencia correspondiente.

Para determinar la secuencia de nucleótidos reconocida por las proteínas que se unen al ADN puede emplearse una modificación del método químico de secuenciación del ADN. Algunas de estas proteínas tienen un papel central en la determinación de los genes que serán activados en una célula, porque se unen a secuencias reguladoras en el ADN. Un método usado para este propósito es el *ADN footprinting*.

Método enzimático

Este método se basa en la síntesis *in vitro* de ADN. El ADN que va a ser secuenciado se usa como template para la síntesis *in vitro*, por la *ADN polimerasa*, de un grupo de réplicas parciales; todas comienzan en el mismo sitio, pero terminan a lo largo de diferentes puntos de la cadena de ADN. Se toma un pequeño fragmento de ADN (oligonucleótido) a manera de "iniciador", que tiene secuencia complementaria en el extremo 5' de la cadena que se va a secuenciar. El medio de incubación contiene, además de los cuatro desoxirribonucleósidos-trifosfato (marcados radiactivamente), inhibidores que consisten en análogos de los desoxirribonucleótidos que, por carecer del hidroxilo en el carbono 3' (llamado por ello 2', 3' didesoxirribonucleótidos), actúan como terminadores de la elongación de la cadena que está siendo sintetizada. Por lo tanto, esta reacción genera una

escalera de fragmentos de ADN similares a los obtenidos por el método químico. El extremo 3' contiene un análogo didesoxi. Se separan por electroforesis cuatro series de dichos *fragmentos de cadena interrumpida* (una por cada análogo didesoxi) y la secuencia de bases del nuevo ADN se lee a partir del autorradiograma de los cuatro carriles (*figura 1*).

Hibridización de ácidos nucleicos

Cuando una solución acuosa de ADN es calentada a 100°C o es expuesta a un pH muy alto (pH > 13) la complementariedad de los pares de bases, que normalmente mantiene juntas a las dos hebras de la doble hélice, se rompe y la doble hélice se separa en dos hebras sencillas. Este proceso recibe el nombre de *desnaturalización del ADN*. El ADN puede volver a reformar la doble hélice, por un proceso llamado *renaturalización o hibridización del ADN*, si éste es mantenido a 65°C por un periodo prolongado.

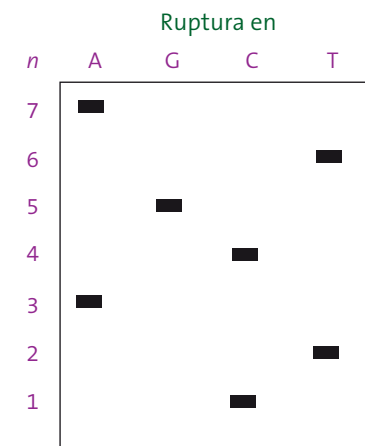


Figura 1. Autorradiograma de un gel producido a partir de cuatro procesos distintos de ruptura química.



Reacciones similares de hibridización pueden ocurrir entre dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos (ADN/ADN, ARN/ARN, o ARN/ADN), cuando éstas tienen una secuencia de nucleótidos complementaria.

La posibilidad de obtener fragmentos de restricción de moléculas específicas de ADN y de marcar radiativamente estas especies moleculares (las cuales llamaremos aquí *sondas o rastreadores de ADN*) condujo al desarrollo de un nuevo y muy poderoso instrumento en el análisis del genoma de las células: el método descrito en 1975 por E.M. Southern, denominado precisamente *transferencia Southern* o *Southern blotting*. En este método, el ADN genómico es cortado con una o varias enzimas de restricción, y los fragmentos generados se separan, con base en su tamaño, por electroforesis en gel de agarosa. El gel se trata con NaOH para desnaturalizar el ADN; después se neutraliza y se coloca sobre papel filtro (el cual a su vez se pone sobre varias toallas absorbentes), con sus extremos sumergidos en una solución con alta concentración de sales. Sobre el gel se deposita una membrana de nitrocelulosa, y sobre éste, otro papel filtro, seguido de una pila de cinco a diez centímetros de altura de toallas absorbentes.

Una vez montado el dispositivo, la solución salina fluye por capilaridad, y acarrea el ADN del gel hacia la membrana, donde se adhiere. Este proceso convierte a la membrana de nitrocelulosa en una copia del gel. Se hibrida un rastreador radiactivo específico de cadena sencilla, correspondiente a una porción del gen que se desea detectar. Es decir, bajo condiciones fijas de temperatura, de concentración de sales y de tiempo, se aparea por complementariedad con secuencias similares del ADN de la membrana. Después de lavar el exceso del rastreador no hibridado, la membrana se somete a autorradiografía. Ésta revelará un patrón preciso y reproducible de bandas que representan

el fragmento del genoma y que por su similitud con el rastreador retuvieron moléculas radiactivas de éste. Así obtenemos información sobre: 1) la presencia y el número de sitios de reconocimiento en el gen, para la enzima de restricción utilizada al cortar el genoma, y 2) el número de copias del gen en el genoma analizado. Esta técnica, análoga a la anterior pero aplicada al ARN, se ha llamado *transferencia Northern* (*Northern blotting*).

Los ácidos nucleicos, al igual que otras macromoléculas, ocupan localizaciones precisas en las células y tejidos; cuando estas moléculas son extraídas por homogeneización, una gran cantidad de información se pierde. Por esta razón, se han desarrollado técnicas en las cuales las sondas de ácidos nucleicos son utilizadas del mismo modo que el marcaje con anticuerpos, para localizar *in situ* secuencias específicas de nucleótidos en un procedimiento llamado hibridización *in situ*. Éste puede ser utilizado para el ADN cromosómico y el ARN celular.

La sonda puede ser hibridizada a un cromosoma que previamente ha sido expuesto a un pH alto, para separar sus pares de bases. Las regiones cromosómicas, unidas durante el paso de hibridización, son después visualizadas por una autorradiografía, por anticuerpos o algún otro ligando que reconozca específicamente un extremo modificado de la sonda.

En el caso de la hibridización con ARN, los tejidos no deben ser expuestos a un pH alto para evitar que el ADN cromosomal se una a la sonda.

Amplificación del ADN por la técnica de PCR

La habilidad para purificar las *ADN polimerasas* y sintetizar químicamente oligonucleótidos de ADN, ha hecho posible la clonación de secuencias específicas de ADN, sin la necesidad de una célula viva. Esta técnica, lla-



mada *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), permite que una determinada región de un genoma sea amplificada millones de veces. Primero, una parte conocida de la secuencia sirve para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos; uno complementario de cada una de las hebras de la doble hélice de ADN y cada uno situado en los extremos opuestos de la región que va a ser amplificada. Estos oligonucleótidos sirven como *iniciadores* (*primers*) para la síntesis *in vitro* del ADN, la cual es catalizada por la *ADN polimerasa*, que se aísla de una bacteria termofílica. Cada ciclo de la reacción requiere de un breve tratamiento con calor para separar las dos hebras de la doble hélice del ADN genómico. El método de PCR es extremadamente sensible: puede detectar una sola molécula de ADN en una muestra dada.

Clonación del ADN

En la *clonación del ADN* (figura 2), un fragmento de ADN, que contiene un gen de interés, es insertado en el ADN genómico purificado de un elemento genéticamente autorreplicable (generalmente un virus o un plásmido). El virus o plásmido usado en esta técnica se conoce como *vector de clonación*, y el ADN propagado por inserción en éstos se dice que es el *clonado*.

Para iniciar la *clonación* específica de un gen es necesario empezar por construir una *biblioteca génica* (una extensa colección de fragmentos de ADN clonados, que incluye al menos un fragmento que contiene al gen de interés).

Los *vectores tipo plásmido* son moléculas pequeñas de ADN circular de doble hebra. Para su uso como vectores de clonación, el ADN circular del plásmido es cortado por una nucleasa de restricción para crear una molécula de ADN circular. El ADN celular usado para la

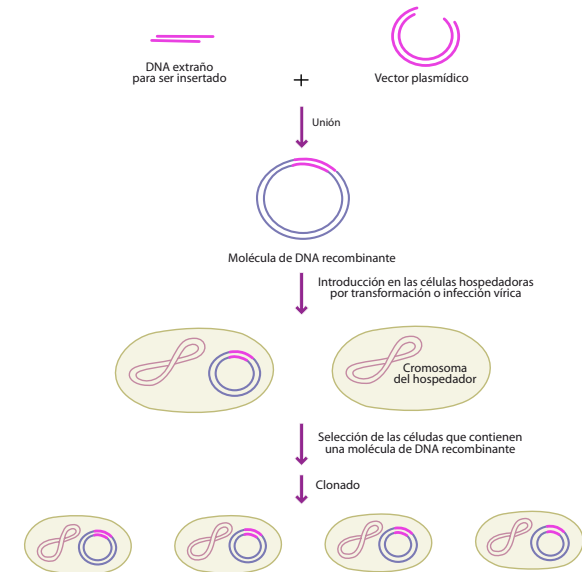


Figura 2. Estrategias generales para la clonación del ADN.

construcción de la biblioteca es cortado con la misma nucleasa de restricción, y los fragmentos de restricción resultantes (que incluyen aquellos que contienen el gen que se va a clonar) son añadidos al plásmido cortado y se aparean por sus extremos cohesivos para formar un ADN recombinante circular. Estas moléculas recombinantes que contienen el ADN extraño, son selladas covalentemente por la acción de una *ADN ligasa*. El fago lambda (λ), un virus, es otro vector ampliamente utilizado en la clonación del ADN.

El próximo paso en la preparación de la biblioteca es la introducción del ADN recombinante en una bacteria. La mayoría de las bacterias y de las células eucariontes pueden tomar del medio moléculas de ADN desnudo; se dice que tales células están *transfectadas*. Conforme la célula se



divide, los plásmidos recombinantes también se replican, produciendo un gran número de copias de ADN circular que contiene al ADN extraño. Cada una de las colonias celulares puede estar compuesta de un clon derivado de una sola célula ancestral y, por lo tanto, contener un plásmido recombinante con la misma secuencia del ADN genómico insertado. Se ha mencionado que este plásmido contiene un clon de ADN genómico, y la colección completa de plásmidos constituyen una biblioteca de ADN genómico. El problema es que sólo unas pocas células tienen el plásmido recombinante que contiene el gen deseado. Así, uno debe ser capaz de identificar estas células para recuperar el ADN de interés de forma pura y en cantidades adecuadas.

Una estrategia alternativa es iniciar el proceso de clonación seleccionando sólo aquellas secuencias de ADN que son transcritas en ARN. El ARNm es extraído de la célula y se sintetiza *in vitro* un *ADN complementario* (ADNc), copiando cada una de las moléculas de ARNm presentes; esta reacción es catalizada por la *enzima transcriptasa reversa*. Las moléculas de ADNc se pueden insertar en vectores que favorezcan su expresión en hospedadores bacterianos. Los plásmidos o fagos utilizados con este fin se llaman *vectores de expresión*. Cada uno de los clones obtenidos por esta vía es llamado clon de ADNc, y la colección completa de clones derivados de un ARNm constituye una biblioteca de ADNc (*figura 2*).

La última etapa en la clonación del ADN consiste en la determinación de las células que hospedan las moléculas del *ADN recombinante* que contiene al gen que interesa. Los clones deseados pueden seleccionarse por la presencia del vector o del mismo gen insertado. Así, por ejemplo, algunos *vectores plasmídicos* confieren resistencia a un antibiótico, que puede utilizarse para eliminar las células no deseadas. Otro procedimiento consiste en cultivar células de una en una, por separado, y comprobar

en cada clon la presencia del gen deseado, por el método de Southern, con una sonda complementaria marcada.

Las bacterias son los hospederos ideales para la amplificación de moléculas de ADN. También pueden servir como fábricas para la producción de una gran variedad de proteínas procariontes y eucariontes. Sin embargo, las bacterias no pueden llevar a cabo modificaciones posteriores a la traducción, como hidrólisis de polipéptidos específicos o adición de subunidades de azúcares. Por tanto, hay muchos genes eucariontes que sólo pueden ser expresados en células hospederas eucariontes. Otro motivo para introducir moléculas de ADN recombinante en el interior de células de organismos superiores es obtener información sobre la organización y expresión de sus genes.

Ingeniería del ADN (transgénesis)

Al mismo tiempo que se evidenciaba el enorme potencial científico de la naciente metodología del ADN recombinante, se vislumbraba también su prometedora capacidad comercial. En 1977 se creó la primera compañía de ingeniería genética: Genetech Inc., especialmente fundada para utilizar los métodos del ADN recombinante en la fabricación de proteínas de importancia médica. Actualmente, existen sólo en Estados Unidos más de 200 empresas biotecnológicas que usan la ingeniería genética para crear nuevos tipos de agentes terapéuticos, vacunas e instrumentos de diagnóstico para detectar oportunamente enfermedades genéticas e infecciosas.

Dos han sido las principales estrategias que se han seguido para la *clonación molecular* de genes de proteínas de importancia comercial. Mientras que una explota la síntesis enzimática del ADN complementario del ARNm de alguna proteína en particular, la otra se apoya en la síntesis



química de fragmentos de ADN, que se integran al ensamblarse con la ayuda de la *ADN ligasa*, dando lugar a un gen sintético portador de la información necesaria para la síntesis de la proteína en cuestión (figura 3).

El primer producto de *ingeniería genética* que salió al mercado fue la *insulina* humana recombinante. Las proteínas recombinantes que le siguieron fueron la *hormona del crecimiento* humano y el *interferón* humano de origen linfocitario. La *tecnología del ADN recombinante* también ha permitido generar mutaciones específicas *in vitro*. Se pueden construir genes nuevos con propiedades diseñadas a voluntad, por medio de mutaciones en lugares específicos. Hay cuatro tipos de cambios posibles en la secuencia de nucleótidos: *delección*, *inserción*, *transposición* y *sustitución*. Para la producción de una delección específica, se corta un plásmido en dos puntos, por medio de una enzima de restricción, y se liga de nuevo, lo cual da origen a un círculo más pequeño. Esta sencilla operación permite eliminar generalmente un gran fragmento de ADN. Se puede producir

una delección menor abriendo un plásmido por un único punto. Los extremos del ADN lineal se digieren luego con una *exonucleasa* que hidroliza nucleótidos de ambas hebras. El fragmento de ADN, así acortado, se vuelve a ligar para formar un círculo en el que faltará una corta secuencia de ADN en torno al centro de restricción.

Las proteínas mutantes por sustitución de un único aminoácido se obtienen por *mutagénesis dirigida* con oligonucleótidos. Supongamos que queremos sustituir un determinado residuo serina por una cisteína. Para llevar a cabo esta mutación se precisa: 1) tener un plásmido que contenga el gen o el ADN de esa proteína, y 2) conocer la secuencia de bases en la vecindad del triplete que debe ser mutado. Si la serina en cuestión se halla codificada por TCT, para obtener una cisteína codificada por TGT necesitamos cambiar la C por una G. La clave de esta mutación consiste en preparar un oligonucleótido iniciador complementario de esta región del gen, excepto en que contenga TGT en vez de TCT. A con-

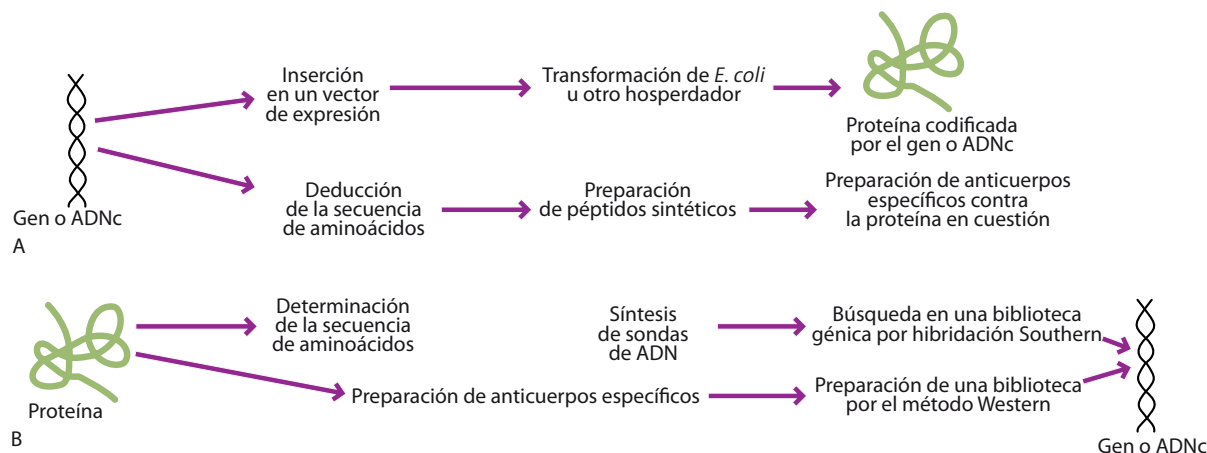


Figura 3. Diagrama de flujo de las diversas opciones para el análisis del ADN o sus productos.



tinuación se separan las dos hebras de ADN del plásmido y el iniciador se empareja con la hebra complementaria. Después, el iniciador se alarga por medio de la *ADN polimerasa*, y el círculo de doble hebra se cierra con *ADN ligasa*.

También es posible crear nuevas proteínas juntando fragmentos de genes que codifican dominios proteínicos no asociados en la naturaleza. Por ejemplo, el gen de un anticuerpo se puede unir al gen de una enzima, para producir una proteína quimérica que sería útil como agente terapéutico. Así, la parte con características de anticuerpo permite a la proteína localizar un blanco específico (p. ej. células cancerosas), mientras que la parte de la proteína con propiedades enzimáticas causa daño a dichas células.

Los primeros animales transgénicos

Un *animal transgénico* es aquel cuyo patrimonio genético está constituido por su genoma, naturalmente heredado, más uno o varios genes de la misma especie (homoespecíficos) o de otras especies (heteroespecíficos) incorporados al genoma de todas sus células (incluyendo la línea gametogénica).

El procedimiento consiste en la microinyección del gen deseado en el interior del pronúcleo masculino de ovocitos fertilizados. Al implantar estos óvulos en las madres sustitutas, un cierto número de ellos se desarrolla y da origen a individuos en los que el gen o genes transferidos se encuentran incorporados al genoma nuclear de todas sus células.

La *transgénesis animal* persigue tres objetivos. Uno de ellos busca un mejor conocimiento de los principios moleculares del desarrollo, diferenciación y demás procesos celulares, incluyendo las enfermedades. Los otros dos, de naturaleza aplicada (biotecnología), intentan trasladar las ventajas potenciales de la manipulación directa del genoma y la re-

programación de genes, al campo de las industrias agropecuaria, farmacéutica y otras.

De estas dos vertientes biotecnológicas de la transgénesis animal, la primera considera al objeto transgénico como un fin en sí mismo, en el que los genes exógenos contribuyen a crear individuos con un fenotipo considerado ventajoso con respecto al que exhiben sus congéneres no transgénicos. Un ejemplo característico es el del ganado porcino, ovino y vacuno de importancia económica, en el que el aporte de ciertos transgenes puede traducirse en alguna ventaja, ya sea cualitativa o cuantitativa, como la producción de carne, leche, lana, o en la resistencia a enfermedades. La segunda variante biotecnológica es la que usa el animal transgénico como una factoría biológica para producir algunas proteínas de alto valor biomédico o industrial. Al respecto, se han generado ya ratones y ovinos con transgenes integrados en sus genomas, capaces de producir en la leche proteínas de origen humano.

En conclusión, la tecnología recombinante del ADN ha revolucionado el análisis de los fundamentos moleculares de la vida. Los cromosomas complejos están siendo rápidamente cartografiados y disecados en fragmentos que puedan manipularse y secuenciarse. La amplificación de los genes por clonación y por PCR ha proporcionado cantidades de ADN suficientes para la secuenciación. Los genes son ahora libros abiertos que pueden leerse. Temas centrales de la biología, como la base molecular del desarrollo, ahora son explorados con éxito; los investigadores pasan muy fácilmente del estudio de las proteínas al de los ácidos nucleicos y viceversa.

Aislamiento del ADN

Dado que el tamaño del núcleo celular impediría la existencia de los cromosomas en forma extendida, el ADN se compacta y forma estruc-



turas superenrolladas. En efecto, el ADN de todos los cromosomas está empaquetado en una estructura compacta con la ayuda de proteínas especializadas.

Es tradicional, en las células eucariontes, dividir a las proteínas que se asocian al ADN en dos clases generales: las *histonas* y las *proteínas no histónicas*. El complejo de ambas clases de proteínas con el ADN nuclear de las células eucariontes es conocido como *cromatina*.

Las histonas son proteínas relativamente pequeñas, con un alto contenido de aminoácidos básicos (lisina y arginina); la carga positiva ayuda a las histonas a unirse al ADN (el cual está cargado negativamente). La función de las histonas consiste en organizar los largos filamentos de ADN en formas más compactas, que permitan su empaquetamiento en el núcleo. La estructura menos condensada del ADN es la forma extendida de los nucleosomas. Los *nucleosomas* están compuestos de un centro histónico alrededor del cual el ADN da dos vueltas. Un estado más compacto del ADN eucariótico es conocido como *solenóide* o *fibras de 30 nm*. Los siguientes estados de compactación del ADN son referidos como *loops* (*asas*) o *fibras de 300 nm*, *fibras de 700 y 1 400 nm* y, finalmente, tenemos las macroestructuras de los *cromosomas*.

La composición de las proteínas del tipo no histona no es muy conocida, pero éstas parecen ser responsables de la selectividad e inhibición transitoria en la replicación y transcripción del ARN. Varias de ellas parecen formar parte de la matriz nuclear.

El ADN del espermatozoide de los mamíferos se encuentra aún más empaquetado que el de las células somáticas, debido al intercambio, durante la espermatogénesis, de las histonas por proteínas más pequeñas, ricas en arginina: las *protaminas*. Este empaquetamiento confiere al ADN un estado físico casi cristalino y vuelve al núcleo metabólicamente inerte.

El núcleo del espermatozoide maduro tiene una extraordinaria resistencia a los tratamientos mecánicos y químicos, debido a que las moléculas de protaminas adyacentes se entrecruzan por la formación de puentes disulfuro. Desde el punto de vista evolutivo, es un mecanismo de protección del genoma de esta célula, durante su tránsito hacia el ovocito.

A continuación se describe un procedimiento general empleado en el aislamiento del ADN, a partir del núcleo de los espermatozoides.

1. Inicialmente se centrifuga 1 ml de la suspensión de espermatozoides a 2 500 rpm durante tres minutos. Se resuspende la pastilla espermática en 1 ml de Tris.
2. Posteriormente se adiciona 0.2 ml de la solución de DTT (solución de ditioneitol 90 mM). El DTT es un agente reductor de puentes disulfuro. Incuba por algún tiempo (15 minutos) a temperatura ambiente.
3. Después se añade 0.2 ml de CTAB. El CTAB (solución de cetiltrimetilbromuro de amonio al 10%) es un detergente catiónico que solubiliza selectivamente varias estructuras celulares.
4. Enseguida se centrifugan los núcleos desmembrados –es decir, que han perdido su envoltura nuclear–, lo que se ha obtenido con el método anterior, y se resuspende en un ml de Tris. Se añade ahora 0.2 ml de SDS (solución de dodecilsulfato de sodio al 10%), por cada mililitro de suspensión. El SDS es un detergente aniónico que va a solubilizar los núcleos.
5. Después se añaden 2 ml de acetona fría. Se agita muy suavemente.
6. Finalmente se colecta el ADN con una varilla de vidrio (girándola suavemente) y se resuspende en agua en un tubo pequeño.



pH

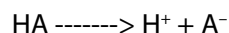
En este apartado se describirá el concepto de pH y su aplicación práctica.

Concepto de ácido y base

Existen tres definiciones:

- Según *Arrhenius*, un ácido es toda sustancia que cede un protón (H^+) en solución acuosa, y una base, toda sustancia que cede un grupo hidroxilo (OH^-) en solución acuosa.
- Según *Browster y Lowry*, un ácido es toda sustancia que cede un protón en solución acuosa, y una base, toda sustancia que acepta un protón en solución acuosa.
- Según *Lewis*, un ácido es toda sustancia que acepta un par de electrones, y una base, toda sustancia que cede un par de electrones.

En términos generales, un ácido en una solución acuosa tiende a comportarse según la siguiente ecuación:



donde

HA = ácido completo

H^+ = protones

A^- = base conjugada

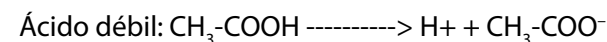
De este modo, existen ácidos que se disocian totalmente en H^+ y A^- ; a estas sustancias se les conoce como *ácidos fuertes*; este tipo de ácidos por lo general no se asocia de nuevo. Los ácidos que, por el contrario, no se disocian con facilidad (y lo hacen sólo parcialmente) son conocidos como *ácidos débiles*; éstos tienden a asociarse otra vez con cierta facilidad.

La base resultante (A^-) de la disociación de un ácido fuerte es comúnmente una *base débil*. Por el contrario, la base que resulta de la disociación de un ácido débil es una *base fuerte*.

Ejemplos:



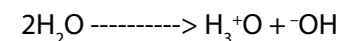
(Cl^- es una base conjugada débil)



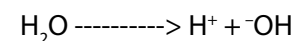
(CH_3-COO^- es una base fuerte)

Disociación del agua

El agua también tiende a disociarse de un modo similar a los ácidos; esto ocurre por la polaridad de la molécula acuosa: un H^+ de una molécula de H_2O tiende a ser atraído por el OH^- de otra. Al desprenderse, el H^+ deja su electrón en la molécula de la que era parte, convirtiéndose en un protón y dejando a la molécula de origen transformada en un OH^- libre. El protón se une a la molécula de H_2O que lo atrajo por medio de un enlace covalente coordinado, y la transforma en el ión hidronio o hidrogenión (H_3^+O).

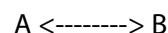


Por conveniencia se puede simplificar:



Este fenómeno ocurre en muy baja proporción y además se establece una constante de asociación/disociación entre las moléculas de agua. Para comprender mejor esto último debemos considerar lo siguiente:

En toda reacción química:



donde A = reactivos y B = producto(s)

En una escala arbitraria de tiempo (t) de la reacción ocurre lo siguiente:

Porcentajes		
t	A <-----> B	
0	100	0
	90	10
	80	20
	70	30
	60	40
	50	50
	50	50
x	50	50

Lo cual significa que en $t = 0$ el producto aún no se forma. Esto va a ir sucediendo conforme el tiempo aumenta, y con ello se incrementará la concentración de producto. No obstante, llega un momento en que la reacción se estabiliza y ya no se forma más producto ni se degradan más reactivos. Es entonces cuando se dice que se alcanzó un *equilibrio* en la reacción química (que no necesariamente es 50-50, como en el ejemplo). Este equilibrio es dinámico, ya que se forman en sentido inverso los reactivos que originaron al producto para mantener el equilibrio entre la formación y desintegración de dicho producto.

Es así como hablamos de una *constante de equilibrio*:

$$K_{eq} = [P] / [R]$$

donde [P] = concentración de producto(s)

[R] = concentración de reactivos.

Este parámetro es útil para determinar la eficiencia de una reacción química en forma directamente proporcional: A mayor K_{eq} , mayor eficiencia de reacción. En este sentido, la K_{eq} de la disociación del agua, también llamada constante iónica del agua, K_w , se puede expresar así:

$$K_w = [H^+][OH^-] / [H_2O] = 1.8 \times 10^{-16}$$

El valor anterior (calculado en forma experimental), como se puede apreciar, es muy bajo y, en efecto, la eficiencia de dicha reacción es muy baja: **muy pocas moléculas de agua se disocian realmente.**

Fundamento y aplicación del concepto de pH

Recordemos lo siguiente:

La concentración de una sustancia se mide en masa/volumen:

$$\frac{\text{MASA (g, mol, meq, etc.)}}{\text{VOL (ml, cc, etc.)}}$$

Para el agua:

$$[] = m / v = 1\,000 \text{ g} / 1\,000 \text{ ml} \text{ o } 55.5 \text{ moles} / 1\,000 \text{ ml}$$

El número de moles se calcula de la siguiente manera:

$$\text{núm. moles} = \text{núm. gramos/peso molecular} = g/pm$$

Para el agua:

$$1\,000 / 18 = 55.5 \text{ moles}$$

Veamos qué sucede si aplicamos algunos de estos valores a la fórmula de K_w :

$$K_w = [H^+][OH^-] / 55.5 = 1.8 \times 10^{-16}$$



Si despejamos la fórmula:

$$[H^+][OH^-] = 1.8 \times 10^{-16} (55.5) = 1 \times 10^{-14}$$

En el agua químicamente pura (o en una solución neutra) existe la misma concentración de H^+ y de OH^- . De acuerdo con lo anterior, tenemos que en una mol de agua hay 1×10^{-7} protones (o hidronios) y 1×10^{-7} hidroxilos ($0.0000001 H^+$ y $0.0000001 OH^-$):

$$[H^+] = [OH^-] = 1 \times 10^{-7}$$

Este valor corresponde a la pequeñísima cantidad de moléculas de agua que se disocian en una mol de agua. De este modo, una solución que libere más de 1×10^{-7} protones será una solución *ácida*, mientras que aquella que libere menos de esta cantidad, será una solución *básica* o *alcalina*.

Para facilitar la expresión de concentraciones de protones tan pequeñas, Sorensen propuso utilizar *el logaritmo negativo (–log) de la concentración de hidronios*. De este modo, si la concentración de hidronios es 1×10^{-7} , el –log de dicho valor es 7.

A este valor se le conoce como pH, y permite expresar cómodamente las concentraciones muy pequeñas de protones que se manejan:

$$pH = -\log [H^+]$$

De esta manera, el pH del agua es 7, y a este valor se le considera neutro, ya que hay igual proporción de especies ácidas y básicas, que se neutralizan entre sí:

$$[H^+] = [OH^-]$$

En forma similar, para calcular y expresar fácilmente la concentración de hidroxilos, se aplica el valor de pOH:

$$pOH = -\log [OH^-]$$

Ahora tomemos como ejemplo al ácido clorhídrico (HCl), un ácido fuerte (que se disocia totalmente):

HCl	[]	pH	pOH
	1 N	0	14
	0.1 N	1	13
	0.01 N	2	12
	0.001 N	3	11
	0.0001 N	4	10
	0.00001 N	5	9
	0.000001 N	6	8
	0.0000001 N	7	7 (agua)

De modo similar, para una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH):

NaOH	[]	pH	pOH
	0.000001 N	8	6
	0.00001 N	9	5
	0.0001 N	10	4
	0.001 N	11	3
	0.01 N	12	2
	0.1 N	13	1
	1 N	14	0

Nótese cómo por cada unidad de pH (o de pOH) que se modifica en una solución, la concentración de H^+ (o de OH^-) se modifica diez veces (exponencialmente). Como se ve, los valores de pH y pOH son complementarios:

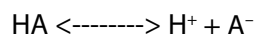
$$pH + pOH = 14$$



También es importante destacar que a mayor valor de pH la sustancia es menos ácida, y viceversa. Con el pOH ocurre lo contrario, su valor es directamente proporcional a la acidez de la solución e inversamente a su alcalinidad.

Este método de determinar el pH (o el pOH) es válida para ácidos y bases fuertes (que se disocian totalmente), pero para el cálculo del pH de ácidos o bases débiles (aquellos que no se disocian en su totalidad) se requiere el conocimiento de un valor específico para cada sustancia de este tipo, llamado *pK*.

Para comprender mejor esto último, regresemos a la fórmula inicial:



Así,

K_{eq} (o K_a , constante de equilibrio o de asociación/disociación del ácido débil de interés) = $[H^+][A^-] / [HA]$.

A mayor valor de K_a , mayor es la fuerza de un ácido: carece de sentido expresar la K_a de un ácido fuerte, ya que como éste se disocia totalmente, el valor de HA es 0. Por lo tanto, el valor de K_a es aplicable sólo a ácidos débiles.

De este modo, el valor de pK constituye una forma cómoda de representar la fuerza de un ácido. Es el *log* de la constante de disociación (K_a o K_b) de un ácido o base débil. A mayor valor de pK , la disociación de un ácido es más baja y por lo tanto dicho ácido es más débil.

Ahora bien, si

$$[H^+] = [A^-],$$

entonces

$$K_a = [H^+]^2 / [HA],$$

y

$$[H^+] = (K_a) ([HA]);$$

si aplicamos logaritmos negativos a la fórmula:

$$-\log [H^+] = -\log (K_a) ([HA])$$

$$pH = -\frac{1}{2} \log K_a - \frac{1}{2} \log [HA]$$

$$pH = \frac{1}{2} pK_a - \frac{1}{2} \log [HA]$$

para ácidos débiles.

Ejemplo: Si el pK de una solución 0.1 N de ácido acético es 4.74:

$$pH = \frac{1}{2} (4.74) - \frac{1}{2} \log [0.1] = 2.37 + 0.5 = 2.87$$

En el caso de una base débil es más conveniente determinar el valor de pOH:

$$pOH = \frac{1}{2} pK_b - \frac{1}{2} \log [A^-]$$

Ejemplo: Si el pK de una solución 0.1 N de acetato de sodio es 9.26:

$$pOH = \frac{1}{2} (9.26) - \frac{1}{2} \log [0.1] = 4.63 + 0.5 = 5.13,$$

por diferencia:

$$pH = 14 - 5.13 = 8.87$$

Usualmente se consiguen en tablas los valores de pK de diversas sustancias de interés bioquímico o industrial. Por otra parte, los ácidos o bases débiles, al estar en solución acuosa, casi siempre se hallan conjugados con su base o ácido fuerte. Como en estos casos es necesario manejar su valor de K_a (o K_b), se utiliza la siguiente fórmula:



$$K_a = [H^+][A^-] / [HA]$$

si despejamos:

$$[H^+] = (K_a) [HA] / [A^-]$$

Nota: para la base conjugada se despeja $[A^-]$

aplicando valores logarítmicos:

$$- \log [H^+] = (- \log K_a) (- \log [HA] / - \log [A^-])$$

entonces:

$$pH = pK_a - \log ([HA] / [A^-])$$

si invertimos los signos:

$$pH = pK_a + \log ([A^-] / [HA])$$

A esta fórmula resultante se le conoce como la *ecuación de Hasselbach-Henderson* y se utiliza también para determinar el pH de una solución donde se hallan un ácido débil y su base conjugada, o viceversa.

Sistemas reguladores de pH

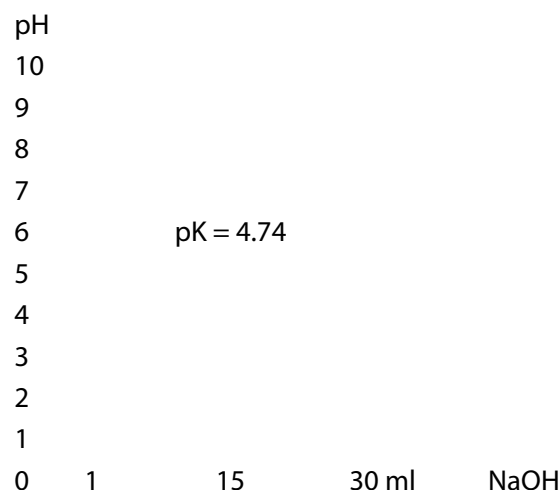
El conocimiento y cálculo de valores como el pH, el pOH y el pK de diversas sustancias es importante, puesto que muchas de las biomoléculas se comportan de manera específica debido al pH fisiológico del medio en que se desenvuelven, e incluso pierden sus propiedades funcionales si se llega a

alterar dicho pH (que en esta condición representa la acidez o alcalinidad interna o del medio en el cual se localizan las células de un organismo).

Por ejemplo, muchas proteínas celulares del tipo de las enzimas tienden a modificar su estructura e inclusive pueden desnaturalizarse al variarse el pH fisiológico de la célula, y entonces sus interacciones bioquímicas, con sus respectivos sustratos, se ven disminuidas o bloqueadas. Esto puede ser perjudicial para la célula, si bien en algunos casos constituye una estrategia para la regulación de la actividad enzimática.

Debido a lo anterior, para la célula es vital contar con mecanismos que regulen adecuadamente su pH interno, para el preciso control de sus procesos bioquímicos. Esto es significativo si sabemos que una solución de NaCl con pH 7.4 puede ver modificado este valor hasta 2, con la sola adición de 1 ml de una solución 0.1 N de HCl, mientras que el plasma sanguíneo, cuyo pH también es de 7.4, apenas varía a 7.2 con la misma cantidad de HCl.

Existe un análisis volumétrico llamado *titulación*, que se emplea para conocer la concentración de una sustancia ácida o básica. Para llevarlo a cabo se llena un vaso de precipitado con un número determinado de ml de la sustancia problema y después, con una bureta, gota a gota se va adicionando un ácido o una base (el complemento de lo que se desea conocer) y se determina, por medio de un indicador o un pHmetro, el pH de la solución problema, dato que se utiliza después para hacer el cálculo de la concentración de dicha solución. Si se graficaran los diversos resultados obtenidos al titular una solución de ácido acético con una solución de hidróxido de sodio, se obtendría una curva similar a la siguiente:

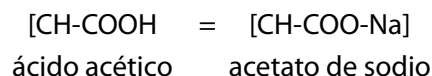


Nótese cómo al inicio y al final hay cambios bruscos de pH, pero en contraparte, se observa una región central estable. Esta característica permite que este tipo de reactivos (ácidos débiles más su base conjugada) sean buenos reguladores de pH, por lo que frecuentemente son utilizados como tales no sólo por el ser humano en el laboratorio, sino por las propias células en la naturaleza. A estas sustancias reguladoras también se les llama *sistemas amortiguadores*, *buffers* o *tampones*.

Ahora bien, como el pH de un ácido débil estará influido por su pK, el equilibrio entre la concentración del ácido débil con su base conjugada se expresa como sigue:

$$[\text{HA}] = [\text{A}^-]$$

En el ejemplo de la gráfica, la ecuación:



es real, justo cuando se añaden 15 ml de NaOH, ya que se elimina la mitad de ácido acético de la solución y se forma una cantidad equivalente de acetato de sodio, del NaOH, más agua.

Entonces decimos que

$$\text{pK} = \text{pH}, \text{ si } [\text{HA}] = [\text{A}^-]$$

El valor de pK es el valor del pH en el cual la mitad de las moléculas del sistema amortiguador está disociada (o ionizada) y la otra mitad está asociada. En el ejemplo propuesto, como el pK del ácido acético es 4.74, este valor corresponde al pH en la condición descrita.

Los sistemas amortiguadores son más eficientes como tales cuando las concentraciones de sus componentes son equivalentes; es decir, cuando $[\text{HA}] = [\text{A}^-]$. En pH fisiológico (7.35-7.45), la mayoría de los ácidos débiles que se encuentran en la célula (llamados también ácidos orgánicos) tienden a estar en su forma de base conjugada, por eso hablamos de *piruvato*, *lactato*, *citrato*, *fumarato*, *acetato*, etcétera. Asimismo, es común considerar que la curva de titulación de un ácido débil se extiende a partir de la meseta central, dos unidades de pH hacia abajo y dos hacia arriba.

Los sistemas amortiguadores permiten hacer experimentos en los cuales es importante que no ocurran variaciones significativas del pH de medio. De hecho, el organismo cuenta con sistemas amortiguadores naturales que permiten mantener el pH fisiológico entre 7.35 y 7.45, de ahí que el plasma sanguíneo no se comporte como una simple solución salina ante cambios bruscos de pH. En un experimento, debe seleccionarse un amortiguador que se aproxime, en cuanto a su valor de pK, al pH que nosotros deseemos mantener en ese experimento específico.

En general, un sistema amortiguador trabaja de la siguiente manera:



- Si hay un exceso de $[H^+]$ (medio tendiente a la acidez), estos protones se unen a los A^- (moléculas disociadas o ionizadas) del sistema, formando el ácido débil correspondiente. Por otra parte, si hay un exceso de $[OH^-]$ (medio tendiente a la alcalinidad), estos $[OH^-]$ se unen a los HA (moléculas asociadas) del sistema y forman la base conjugada, más agua.

Mientras más concentrado se presente un sistema amortiguador, más eficiente será, ya que tiene más moléculas disponibles para neutralizar $[H^+]$ u $[OH^-]$. Sin embargo, muchas veces no es práctico elegir un sistema amortiguador concentrado por lo siguiente: a) La solubilidad propia del sistema en agua puede no ser la adecuada y tiende entonces a saturarse antes de alcanzar la concentración que se desea. b) Dicha concentración puede afectar la fuerza iónica de la solución e intervenir en las reacciones que se van a llevar a cabo. c) En sistemas enzimáticos se pueden inhibir algunas de las enzimas presentes.

Debido a lo anterior, se prefiere la utilización de sistemas amortiguadores a concentraciones más bien bajas, que disminuyen un poco su eficiencia. No debe olvidarse que la concentración real de un sistema amortiguador está dada por las dos especies químicas que lo constituyen.

En el hombre y los animales domésticos, los sistemas amortiguadores de mayor importancia son el sistema de carbonato/ácido carbónico, el de fosfato/ácido fosfórico y el de proteínas plasmáticas.

Cálculo práctico del pH en diversas sustancias

Para el cálculo de pH en forma práctica se requiere hacer el cálculo de soluciones *normales*, que son aquellas que contienen un determinado número de pesos equivalentes químicos, aforados a 1 000 ml de solvente.

Un peso equivalente químico es una mol de compuesto soluto dividida entre el número de iones positivos que acepte (si es una base), o ceda (si es un ácido) dicho compuesto.

Ejemplo:

Preparar 500 ml de una solución 0.1 N de ácido sulfúrico (H_2SO_4):

$$1 \text{ mol de } H_2SO_4 = 98.06 \text{ g / litro}$$

Como el ácido sulfúrico puede ceder dos protones, entonces el peso equivalente químico = $98.06/2 = 49.03$

Como la solución es 0.1 N:

$$\begin{aligned} 49.03 \times 0.1 &= 4.90 \text{ g cbp 1 000 ml} \\ &= 2.45 \text{ g cbp 500 ml} \end{aligned}$$

Para determinar el pH de diversas soluciones y compuestos se utilizan dos métodos generales:

- El papel indicador pH**, que es una membrana de celulosa impregnada con una o varias sustancias indicadoras que cambian a un color específico de acuerdo con el pH en que se encuentren. Usualmente, en el empaque del producto viene la guía de colores para cada valor de pH. El valor calculado siempre es una aproximación en números enteros.
- El potenciómetro o pHmetro** es un aparato eléctrico que mide, por medio de un bulbo especial, el potencial eléctrico de la solución problema (reflejo de la concentración de H^+) y transforma el valor a la escala de pH. El valor lo da en una pantalla digital o en una escala de aguja.



Aislamiento e identificación de proteínas

Ultracentrifugación, cromatografía y SDS-PAGE

En este apartado se pretende dar a conocer las técnicas de ultracentrifugación, cromatografía y SDS-PAGE, utilizadas para el estudio de las proteínas de la célula.

Aunque el análisis bioquímico de la célula requiere su ruptura, se han desarrollado técnicas gentiles de separación que preservan las funciones de los diversos componentes celulares. Del mismo modo en el que un tejido puede ser separado en sus diversos componentes celulares vivientes, cada célula puede ser fraccionada en sus organelos funcionales y macromoléculas. En esta parte y la siguiente consideraremos los métodos que permiten la purificación de organelos y proteínas, para su análisis bioquímico.

Ultracentrifugación

Las células son fragmentadas de diversas formas: pueden exponerse a choque osmótico o a vibraciones ultrasónicas, pueden forzarse a pasar por un pequeño orificio, o bien, ser aplastadas. Estos métodos rompen muchas de las membranas celulares en fragmentos pequeños que casi de inmediato se reconstituyen como vesículas selladas. Si este fraccionamiento celular se lleva a cabo cuidadosamente, es posible dejar intactos los organelos, tales como el núcleo, las mitocondrias, el aparato reticular interno (de Golgi), lisosomas, peroxisomas, etcétera. La suspensión celular que ha sido fraccionada de esta manera recibe el nombre de *extracto* u *homogeneizado*, y es una sopa espesa que contiene una gran variedad de partículas membranosas de tamaño, carga electroquímica y densidad variables. Gracias al cuidado que se tiene en este proceso, es posible recuperar organelos o vesículas derivadas de éstos (p. ej., los *microsomas*, derivados del retículo endoplasmático) con actividad bioquímica intacta.

Una vez obtenido este homogeneizado, sus componentes deben ser separados para su estudio. Esto es posible mediante un aparato especial llamado *ultracentrífuga* (figura 4), en la cual son colocadas las preparaciones de células rotas para su centrifugación a altas velocidades. Este tratamiento separa los componentes celulares con base en su tamaño y densidad: en términos generales, los componentes más grandes experimentan una mayor fuerza centrífuga y se desplazan más rápido. A una velocidad relativamente baja los componentes grandes, como los núcleos y células enteras, se sedimentan y forman una pastilla en el fondo del tubo de la centrífuga. A una velocidad un poco mayor, se deposita una pastilla de mitocondrias. A velocidades más altas y con más tiempo de centrifugación, primero se depositan pequeñas vesículas selladas, y después, los ribosomas. Si bien estas pastillas recolectadas pueden estar

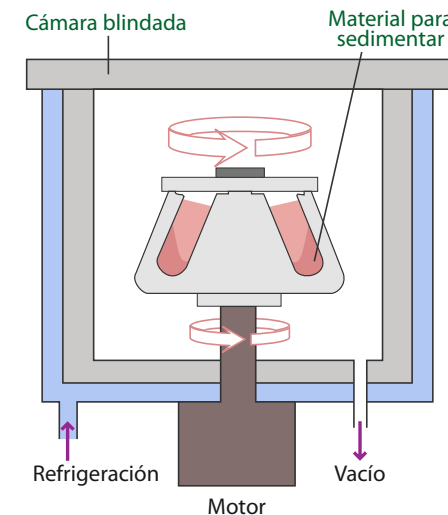


Figura 4. Esquema de una ultracentrífuga.



impuras, la resuspensión de la pastilla respectiva y su recentrifugación repetida permiten desplazar la mayoría de los contaminantes presentes.

Una variante de este sistema es la utilización de gradientes de sacarosa diluida. En este caso, la solución se coloca en un tubo de centrifuga, con la dilución menor en el fondo del tubo y la mayor en la parte superior. Los componentes celulares se separan de acuerdo con su densidad y peso, quedando aislados unos de otros a causa de la variación en las diluciones del gradiente: los elementos más pesados atraviesan sin dificultad las capas más viscosas del gradiente, mientras que los elementos menos densos se quedan en las capas de sacarosa menos viscosas.

Las ultracentrífugas modernas alcanzan velocidades de hasta 80 000 rpm, lo que produce fuerzas tan altas como 500 000 veces la gravedad terrestre. Con estas fuerzas tan grandes, aun pequeñas macromoléculas, como el ARNt y algunas enzimas pueden sedimentar y ser separadas unas de otras con base en su tamaño (expresado indirectamente como *coeficiente de sedimentación*).

Cromatografía

Uno de los métodos más útiles en la actualidad para la separación de proteínas de un homogeneizado o extracto celular es la cromatografía, una técnica desarrollada originalmente para separar moléculas pequeñas como azúcares y aminoácidos.

Las proteínas son separadas o fraccionadas por medio de la llamada *cromatografía en columna*, en la que una mezcla de proteínas en solución es pasada por una columna en cuyo interior hay una matriz sólida y porosa. Las diferentes proteínas de la mezcla son retrasadas en su flujo, de acuerdo con su interacción con la matriz, de tal modo que se colectan en forma separada conforme van fluyendo desde el fondo de la columna. Según el tipo de matriz elegida, las proteínas pueden separarse de

acuerdo con su carga iónica (cromatografía de intercambio iónico), su hidrofobicidad (cromatografía hidrofóbica), su tamaño (cromatografía de filtración en gel) o su habilidad para unirse a grupos químicos particulares (cromatografía de afinidad) (*figura 5*).

Muchos tipos de matrices están disponibles comercialmente para estos fines. Las *columnas de intercambio iónico* se llenan con pequeñas esferas con carga negativa o positiva, de modo tal que las proteínas son fraccionadas de acuerdo con el arreglo de cargas de su superficie. Las *columnas hidrofóbicas* se llenan con esferas en las que los grupos hidrofóbicos de las moléculas que las constituyen están orientados hacia la superficie, de manera que las proteínas con grupos hidrofóbicos expuestos ven retardado su paso por la columna. Las *columnas de filtración en gel*, que separan a las proteínas de acuerdo con su tamaño, se llenan con esferas con poros muy pequeños: las moléculas que son lo suficientemente pequeñas para entrar en los poros van descendiendo por la columna, pasando del interior de una esfera a otra, mientras que las moléculas de mayor tamaño, que no caben por los poros, pasan entre las esferas, desplazándose más rápidamente hacia el fondo de la columna; esta técnica permite conocer el tamaño relativo de ciertas proteínas.

Estos tipos de cromatografía en columna no producen fracciones muy puras a partir de mezclas complejas de proteínas. Un pasaje sencillo a través de la columna generalmente incrementa no más de veinte veces la proporción de una proteína dada en la mezcla. Debido a que la mayoría de las proteínas individuales representan menos de una milésima parte del total de la proteína de una célula, con frecuencia es necesario usar varios tipos de columnas sucesivamente para obtener una pureza aceptable de la proteína problema. Un método más eficiente, conocido como *cromatografía de afinidad*, se basa en las interacciones biológicas

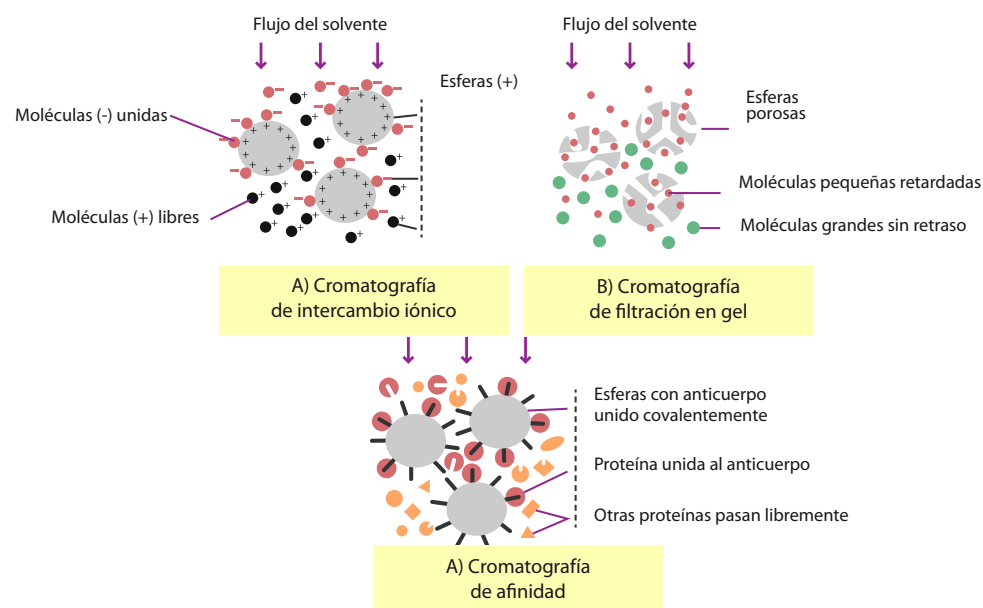


Figura 5. Principio teórico de los diversos tipos de cromatografía en columna.

que ocurren entre las superficies de diversas proteínas. Si un sustrato enzimático es unido de modo covalente a una matriz inerte (de esferas polisacáridas), la enzima que actúa sobre dicho sustrato será retenida de manera específica por esta matriz y entonces puede ser eluida (lavada) de la columna y obtenerse en forma casi pura. En otro ejemplo, pequeños oligonucleótidos de una secuencia específica de ADN pueden ser inmovilizados en una columna de este tipo y emplearse para purificar proteínas que se unen al ADN y que normalmente reconocen a estas secuencias de ADN en los cromosomas. En otra variante, los anticuerpos específicos pueden ser acoplados a una matriz para la purificación de moléculas proteínicas reconocidas por dichos anticuerpos. Debido a la gran especificidad de estas *columnas de afinidad*, pueden ser llevadas a cabo en un

sólo paso purificaciones de mil a diez mil veces, dependiendo del tipo de proteína problema.

Un tipo de cromatografía aún más eficiente y mucho más rápida, aunque más sofisticada y costosa, es la *cromatografía líquida de alto rendimiento* (HPLC, por sus siglas en inglés), en la que la columna es de acero y la matriz está constituida por pequeñas esferas de sílice muy bien empacadas en el interior de la columna. Además, el sistema de bombeo de líquido dentro de la columna es de alta presión. Estas características permiten una separación óptima de muchas proteínas y otras moléculas, con un grado de pureza muy alto y a una velocidad mucho mayor que en las cromatografías de columna convencionales (minutos contra horas, respectivamente).



SDS-PAGE

Las proteínas usualmente poseen una carga neta positiva o negativa, que refleja la mezcla de aminoácidos cargados que contienen. Si un campo eléctrico es aplicado a una solución que contiene una proteína, ésta migrará en un rango que depende de su carga neta, de su tamaño y de su forma. Esta técnica, conocida como *electroforesis*, fue usada originalmente para separar mezclas de proteínas tanto en solución acuosa como incluidas en una matriz porosa como el almidón.

A mediados de los años sesenta fue desarrollada una versión modificada de este método –conocida como *electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS* (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés)– que revolucionó la manera en que las proteínas eran rutinariamente analizadas. La técnica emplea un gel de poliacrilamida de malla muy densa como matriz inerte, a través de la cual migran las proteínas. El gel se prepara en el momento en que va a ser utilizado, al polimerizar los monómeros que lo constituyen; el tamaño de sus poros puede ser ajustado de tal manera que sean lo suficientemente estrechos para retardar la migración de las proteínas de interés. Estas proteínas no están en un medio acuoso convencional, ya que incluye un detergente de carga muy negativa, el *dodecilsulfato de sodio* (SDS, por sus siglas en inglés). Puesto que este detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, ocasiona que éstas se desnaturalicen como cadenas polipeptídicas extendidas. De este modo, las moléculas individuales de proteína son liberadas de su asociación con otras moléculas de proteínas o de lípidos, y quedan libres en la solución de detergente. Además, un agente reductor, el β -mercaptoetanol es usualmente adicionado para romper cualquier enlace disulfuro de las proteínas, de tal modo que todos los constituyentes polipeptídicos (subunidades) de una molécula proteínica compleja puedan ser estudiados por separado.

¿Qué sucede cuando una mezcla de proteínas solubilizadas en SDS es electroforizada a través de una lámina de gel de poliacrilamida? Cada molécula de proteína capta un gran número de moléculas de detergente cargadas negativamente, lo cual sobrepasa la carga intrínseca de la proteína y provoca su migración hacia el electrodo positivo cuando es aplicado un voltaje. Las proteínas del mismo tamaño tienden a comportarse de forma idéntica debido a varias razones, entre las que podemos citar: *a)* su estructura nativa es completamente desenrollada por el SDS, de manera que su forma es la misma; *b)* ambas proteínas unen la misma cantidad de moléculas de SDS y por lo tanto tienen la misma carga negativa. Proteínas más grandes, con mayor carga, serán sujetas a fuerzas eléctricas mayores y también a un gran arrastre. Si estas proteínas estuvieran libres en solución, los dos efectos serían cancelados; pero en las mallas de poliacrilamida, que actúan como un tamiz molecular, las proteínas de mayor tamaño son retrasadas mucho más que las proteínas pequeñas. Como resultado de lo anterior, una mezcla compleja de proteínas es fraccionada en una serie de discretas bandas, ordenadas con base en su peso molecular. Las principales proteínas son fácilmente identificadas al teñir el gel con una tinta como el azul de Coomassie, o bien, con una tinción de plata para detectar cantidades tan pequeñas de proteínas como la de 10 ng por banda.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS es un procedimiento muy útil debido principalmente a que puede ser utilizado para separar todo tipo de proteínas, incluyendo aquellas que son insolubles en agua. Así, es posible separar y visualizar proteínas de membrana, componentes proteínicos del citoesqueleto y proteínas que son parte de grandes agregados macromoleculares, entre otras. Como el método también separa polipéptidos de acuerdo con su tamaño, también proporciona informa-

ción acerca del peso molecular y la composición de subunidades de cualquier complejo proteínico (figuras 6 y 7).

Cultivo de células

En este apartado se darán a conocer otros métodos empleados para el estudio de la célula, además de los antes descritos.

Aunque la estructura de los organelos y aun de las macromoléculas puede ser vista con ayuda de diversos tipos de microscopios, el conocimiento molecular de una célula requiere un análisis bioquímico detallado. Lamentablemente, la mayoría de los procedimientos bioquímicos requieren cantidades muy grandes de células y además su ruptura. Si la muestra es una porción de tejido, fragmentos de todas sus células serán mezclados juntos, creando confusión sobre si las células son de varios tipos (lo que casi siempre ocurre). Para preservar la mayor cantidad de información acerca de cada tipo individual de célula, los biólogos celulares han desarrollado varias formas de disociar a las células de sus tejidos y separar los diferentes tipos. La población de células resultantes, relativamente homogéneas, puede ser analizada, ya sea directamente o después de que su número ha sido incrementado, mediante su proliferación en cultivo *in vitro*.

Separación de células a partir de un tejido

El primer paso para el aislamiento de un tipo celular específico, a partir de un tejido que contenga una mezcla de varios tipos celulares, es separar la *matriz extracelular* y las *uniones intercelulares* que mantienen unidas a las células. Las mejores fuentes de células disociadas y viables por lo común se obtienen de tejidos neonatales o fetales, usualmente tratados con enzimas

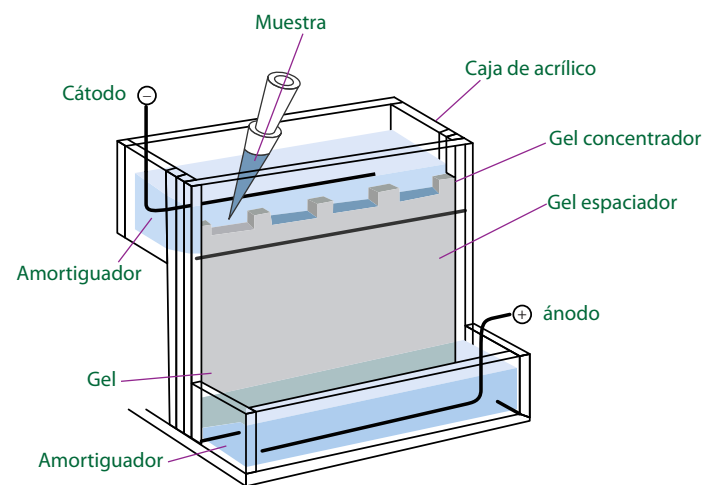


Figura 6. Cámara de electroforesis SDS-PAGE.

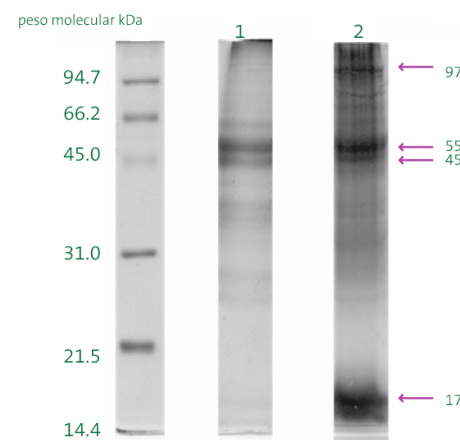


Figura 7. Gel de proteínas obtenido mediante SDS-PAGE.



proteolíticas (p. ej., tripsina o colagenasa) y con agentes que unen o precipitan Ca^{++} , ión del que depende la adhesión célula-célula. El tejido tratado puede ser disociado en células viables por medio de una agitación suave.

Varias técnicas se han utilizado para separar los diferentes tipos celulares de una suspensión heterógena de células. Una de ellas se vale de las diferencias en cuanto a propiedades físicas entre algunos tipos celulares; por ejemplo, el tamaño y la densidad: células grandes pueden ser separadas de otras más pequeñas, o células pesadas, de otras más ligeras por medio de una *centrifugación diferencial*, técnica que ya fue descrita.

Otro método está basado en la tendencia de algunos tipos celulares para adherirse con fuerza al vidrio o plástico, lo que les permite ser separados de células que se adhieren débilmente.

Un refinamiento de este método depende de las propiedades específicas de unión que poseen los anticuerpos. Los anticuerpos que reconocen algún elemento de un tipo celular específico en un tejido pueden ser acoplados a diversas matrices (p. ej., colágena, polisacáridos, plástico, etcétera.), para formar una superficie de afinidad a la que sólo las células reconocidas por los anticuerpos quedarán adheridas. Las células unidas de esta manera son recuperadas por medio de una agitación suave o de un tratamiento con tripsina para digerir las proteínas que median la unión o, en el caso de una matriz digerible (p. ej., colágena), por medio de su degradación con enzimas (p. ej., colagenasa).

La herramienta más sofisticada para separar células involucra el marcaje específico de éstas con anticuerpos acoplados a un fluorocromo, para así clasificar las células en marcadas y no marcadas, en un *separador electrónico de células activado por fluorescencia* (FACS, por sus siglas en inglés). En este aparato, las células son pasadas en fila india por un conducto muy fino, a través del cual se proyecta un rayo láser que mide la fluorescencia

de cada célula. Por otra parte, una pequeña onda vibratoria origina que la solución en la que se transportan las células se fragmente en pequeñas microgotas, cada una con una o ninguna célula. Las gotas que contienen células son automáticamente cargadas positiva o negativamente al momento de su formación, dependiendo de si la célula que contienen es o no fluorescente. Finalmente, estas gotas son separadas por un campo eléctrico en un contenedor apropiado. Grupos ocasionales de células, detectados por su mayor índice de desviación de la luz, son dejados sin carga y descartados en un contenedor de desperdicios. El FACS puede seleccionar una célula entre mil, y ordenar cinco mil células por segundo.

Cuando una población uniforme de células ha sido obtenida por cualquiera de los métodos anteriores puede ser utilizada directamente para análisis bioquímicos. De modo alternativo, provee una fuente inicial de material para realizar un cultivo celular, permitiendo estudiar el comportamiento de estas células bajo las condiciones estrictamente definidas de una caja de cultivo.

Cultivos celulares

En condiciones adecuadas, en una caja de cultivo la mayoría de los tipos de células animales y vegetales vivirá, se multiplicará y expresará sus propiedades de diferenciación. Las células pueden ser observadas bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, y los efectos de adicionar o remover moléculas específicas –tales como fármacos, hormonas o factores de crecimiento– pueden estudiarse con relativa facilidad. Además, en un cultivo mixto también pueden observarse las interacciones entre diversos tipos celulares. Experimentos que se llevan a cabo en cultivos celulares son referidos algunas veces como ensayos *in vitro* (literalmente, “en vidrio”), para diferenciarlos de aquellos estudios realizados en orga-



nismos intactos, referidos a su vez como ensayos *in vivo* (literalmente, “en el organismo vivo”). Estos conceptos pueden ser confundidos, puesto que son utilizados en un sentido diferente por los bioquímicos, para los que el término *in vitro* se aplica a las reacciones bioquímicas ocurridas fuera de la célula viva, mientras que *in vivo* se refiere a todas las reacciones que ocurren en la célula viva, cultivada o que forma parte de un organismo.

El cultivo de células se inició en 1907, con un experimento diseñado para aclarar una controversia en neurobiología. La hipótesis fue conocida como la *doctrina neuronal*, y establecía que cada fibra nerviosa es producto del crecimiento de una sola célula nerviosa y no el producto de la fusión de varias células. Para probarla fueron colocados pequeños trozos de médula espinal en fluido tisular coagulado, dentro de una cámara húmeda y tibia, y se observaron a intervalos bajo el microscopio. Después de más o menos un día, fueron observadas células nerviosas individuales que extendían largos y delgados axones dentro del coágulo. De este modo fue validada la doctrina neuronal y se sentaron las bases para el cultivo de células.

Los experimentos originales de 1907 fueron hechos con pequeños fragmentos de tejido o *explantes*. Hoy en día, los cultivos son más comúnmente realizados a partir de suspensiones de células disociadas de tejidos, tal como ya se explicó. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células de tejidos no se adaptan a vivir en suspensión y requieren de una superficie sólida en la cual crecer y dividirse, que en la actualidad es la superficie plástica de una caja de cultivo. Sin embargo, los requerimientos de las células varían, y algunas no crecerán ni se diferenciarán a menos que la superficie de la caja sea cubierta con componentes específicos de la matriz extracelular, como colágena o laminina.

Los cultivos preparados directamente de los tejidos de un organismo, ya sea con o sin el paso inicial de disociación celular, son llamados cultivos

primarios. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden ser removidas de la caja de cultivo y utilizadas para sembrar un gran número de cultivos secundarios; éstos pueden ser repetidamente subcultivados de este modo por semanas o meses. Las células de estos cultivos muestran frecuentemente muchas de las propiedades de las células diferenciadas del tejido de origen: los fibroblastocitos continúan secretando colágena, células derivadas del músculo esquelético embrionario se fusionan para formar fibras musculares gigantes que se contraen de manera espontánea en el disco de cultivo; células nerviosas extienden axones que son excitables eléctricamente y hacen sinapsis con otras células nerviosas; células epiteliales forman láminas extensas con muchas de las propiedades de un epitelio intacto. Todos estos fenómenos, desde el momento en que son observables en cultivo, pueden ser estudiados de maneras que no son posibles en el tejido intacto.

Medios de cultivo para células y factores de crecimiento

Hasta principios de los años setenta, el cultivo de tejidos se asemejaba a una mezcla de ciencia y brujería. Los coágulos de fluidos tisulares fueron reemplazados por medios líquidos con cantidades específicas de moléculas pequeñas como sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas, así como una mezcla poco definida de macromoléculas en la forma de suero fetal bovino o suero equino, o bien, un extracto crudo de embriones de pollo. Estos medios se siguen utilizando en la actualidad para la mayoría de los cultivos celulares de rutina, pero hacen difícil para el investigador diferenciar qué macromoléculas específicas requieren un tipo particular de células para mantenerse y funcionar normalmente.

Este problema condujo al desarrollo de diversos *medios de cultivo químicamente definidos y libres de suero*. En adición a las moléculas pequeñas de rutina, estos medios contienen una o más proteínas específicas



que la mayoría de las células necesitan para vivir y proliferar en cultivo. Estas incluyen a los *factores de crecimiento*, que estimulan la proliferación celular, y a la *transferrina*, que introduce hierro a las células. Muchas de la proteínas de señalización extracelular, esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación de tipos celulares específicos han sido descubiertos por medio de estudios en cultivos celulares y la búsqueda de nuevas moléculas de este tipo ha sido facilitada por la existencia de estos medios de cultivo.

Líneas celulares

La mayoría de las células de los vertebrados muere después de un número finito de divisiones en cultivo. Las células de la epidermis humana, por ejemplo, viven por varios meses en cultivo, y se dividen de 50 a cien veces antes de morir. Se ha afirmado que este límite de vida está relacionado con el límite de vida del animal del que las células derivan. Por ejemplo, las células epidérmicas de canideo apenas si se dividen diez a 20 veces antes de morir.

Ocasionalmente, sin embargo, algunas células en un cultivo sufren un cambio genético que las vuelve inmortales, literalmente. Estas células a veces proliferan indefinidamente y son propagadas como una *línea celular*.

Las líneas celulares pueden ser preparadas también a partir de células neoplásicas, aunque difieren de las preparadas de células normales en varios aspectos. Las líneas celulares cancerosas frecuentemente crecen sin adherirse a una superficie, y en una caja de cultivo llegan a crecer hasta que alcanzan una densidad poblacional muy alta. Propiedades similares pueden ser inducidas en células normales por *transformación* mediante la acción de virus inductores de tumores o de diversas sustancias químicas. Las líneas celulares transformadas que se obtienen pueden producir tu-

morens si son inoculadas en animales de experimentación. Las líneas celulares son herramientas muy útiles en la investigación, como fuentes muy grandes de células de un solo tipo, especialmente porque pueden ser congeladas con nitrógeno líquido a -196°C , por tiempo indefinido, y mantenerse viables una vez descongeladas. Es importante reconocer, sin embargo, que las células provenientes de líneas celulares necesariamente difieren en diversos aspectos funcionales de las células convencionales de los tejidos de los cuales derivan.

Aunque todas las células en una línea celular son muy similares, con frecuencia no son idénticas. La uniformidad genética de una línea celular puede ser mejorada por la clonación celular, en la que una célula única de la línea es aislada y se permite su proliferación para formar una nueva colonia en la que todas las células resultantes se originarán sólo de dicha célula seleccionada. A esta población derivada de un ancestro común se le llama *clon*. Una de las principales aportaciones de este tipo de técnicas ha sido la obtención de líneas celulares con un defecto genético específico. El estudio de la proteína defectuosa resultante es muy útil para conocer de mejor manera el funcionamiento de la misma proteína en células normales.

Inmunodetección de moléculas con anticuerpos

En este apartado se darán a conocer las principales técnicas de detección de proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos, ya sea *in situ* o en sistemas de patrones de bandas de proteínas derivados de SDS-PAGE.

Los métodos clásicos de microscopía brindan gran información acerca de la arquitectura celular, aunque dan pocos datos acerca de la naturaleza química de la célula. En biología celular es importante determinar las cantidades de moléculas específicas, saber dónde se encuentran y cuál es



su nivel de organización dentro de la célula, así como conocer si existen cambios en dicha localización y organización en respuesta a señales extracelulares. Las moléculas de interés en este tipo de estudios van desde pequeños iones inorgánicos, como el Ca^{++} o el H^+ , hasta grandes macromoléculas, como los ácidos nucleicos y, por supuesto, las proteínas.

Hoy en día han sido desarrollados métodos muy sensibles para detectar este tipo de moléculas, y para seguir su comportamiento dinámico en la célula viva. Destacan dos técnicas muy utilizadas en la biología celular experimental: las que utilizan *radioisótopos* de átomos que forman parte de moléculas de interés biológico, y las que se valen de *anticuerpos*. Mediante ambos procedimientos se detecta con gran precisión una molécula específica en una mezcla compleja de sustancias celulares: bajo condiciones óptimas, es posible detectar menos de mil copias de una sola molécula en una muestra. Como las técnicas basadas en la utilización de anticuerpos son de las más empleadas para detectar proteínas, describiremos a continuación este tipo de metodología.

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune de los vertebrados y diversos artrópodos, como un sistema de defensa contra diversos agentes infecciosos. Son moléculas únicas entre las proteínas debido a que son construidas en billones de formas diferentes, cada una con un sitio diferente de unión que reconoce una molécula blanco específica (llamada *antígeno*). La gran especificidad de un anticuerpo por su antígeno correspondiente, convierte a este tipo de moléculas en una herramienta experimental muy útil para el biólogo celular. Marcados con tintas fluorescentes, estos anticuerpos son inmejorables para localizar moléculas específicas en las células por medio del microscopio de fluorescencia. Marcados con partículas electrodensas (como microesferas de oro coloidal), son utilizados con propósitos similares en el microscopio electrónico.

Además, los anticuerpos también pueden constituir herramientas bioquímicas para detectar y cuantificar moléculas en extractos celulares y para identificar proteínas específicas después de que éstas han sido fraccionadas por el método de SDS-PAGE. La importancia de los anticuerpos en columnas de cromatografía por afinidad ya ha sido discutida previamente.

La sensibilidad de los anticuerpos como sondas para detectar y ensayar moléculas específicas en células y tejidos es con frecuencia mejorada por un método de amplificación de señal. Por ejemplo, aunque una molécula marcadora como una tinta fluorescente, puede ser utilizada directamente a un anticuerpo utilizado para un reconocimiento específico (el anticuerpo primario), una señal más fuerte es conseguida por medio de un anticuerpo primario sin marca, que entonces será detectado por un grupo de *anticuerpos secundarios* marcados, que se unirán a él.

Los métodos de amplificación de señal más sensibles y versátiles emplean una enzima como molécula marcadora, unida al anticuerpo secundario. La enzima *fosfatasa alcalina*, por ejemplo, en presencia de los reactivos químicos apropiados produce fosfato inorgánico y provoca la formación localizada de un precipitado colorido. Este precipitado revela la localización del anticuerpo secundario que está acoplado a la enzima y, por ende, la localización del complejo antígeno-anticuerpo al que dicho anticuerpo secundario está unido. Puesto que cada molécula de la enzima actúa catalíticamente para generar miles de moléculas de producto, incluso pueden ser detectadas cantidades muy pequeñas de antígeno. El *ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligadas* (ELISA, por sus siglas en inglés), basado en este principio, es usado comúnmente en medicina como una prueba muy sensible para el diagnóstico de gestación o de diversos padecimientos del hombre y los animales domésticos.



Los anticuerpos son producidos de una manera sencilla: se inyecta varias veces a un animal (como un conejo o una cabra) una muestra del antígeno que se desea localizar en determinada población celular o tisular; después de un tiempo, se recolecta la sangre de ese animal y se obtiene el suero, rico en anticuerpos. Este *antisuero* contiene una mezcla heterogénea de anticuerpos, cada uno producido por una célula productora de anticuerpos (una célula plasmática, derivada de un linfocito B) diferente (por lo que se llaman *anticuerpos policlonales*). Cada clase de anticuerpos reconoce distintas partes de la molécula del antígeno, así como las diferentes impurezas que se pueden mezclar durante la preparación del antígeno. La especificidad de un antisuero puede ser mejorada algunas veces mediante la remoción de las moléculas de anticuerpos no deseados que se unen a diversas moléculas; un antisuero producido contra la proteína X, por ejemplo, puede ser pasado a través de una columna de afinidad de antígenos Y y Z para remover los posibles anticuerpos contaminantes anti-Y y anti-Z. A pesar de lo anterior, la heterogeneidad de este tipo de antisueros a base de anticuerpos policlonales algunas veces limita su utilidad.

Esta limitante fue resuelta en 1976 gracias al desarrollo de una técnica que mejoró notablemente el uso de los anticuerpos como herramienta de la biología celular experimental. Su principio es propagar un clon de células a partir de un linfocito B que secreta un tipo determinado de anticuerpos, de modo que se obtengan con facilidad grandes cantidades de dicho anticuerpo. El problema en la práctica, sin embargo, es que los linfocitos B tienen una vida muy corta en cultivo. Para subsanar este problema, los linfocitos B que secretan un solo tipo de anticuerpo, obtenidos de ratones o ratas previamente inmunizados, son fusionados con una línea celular derivada de linfocitos B (las líneas celulares son “inmortales”,

ya que se pueden cultivar indefinidamente). De la mezcla heterogénea de células híbridas, se seleccionan aquellos híbridos que producen el anticuerpo deseado y que además tienen la propiedad de reproducirse sin límite en cultivo. Estos *hibridomas* son propagados como clones individuales; cada uno de ellos produce así un tipo de *anticuerpo monoclonal* de manera permanente y estable, el cual reconocerá un tipo único de sitio antigénico, por ejemplo, un grupo particular de seis aminoácidos de la cadena proteínica que constituye el antígeno completo. Esta especificidad uniforme hace a los anticuerpos monoclonales herramientas mucho más útiles que los antisueros convencionales. Sin embargo, la ventaja más importante de la técnica de los hibridomas es que pueden hacerse anticuerpos monoclonales contra moléculas que constituyen sólo una pequeña fracción de la muestra. En un antisuero policlonal, la proporción de moléculas de anticuerpo que reconocen esa fracción pequeña en ocasiones resulta muy escasa para ser útil; pero si los linfocitos B que producen los diversos componentes de este *antisuero* son propagados como hibridomas, es posible seleccionar la línea que produzca los anticuerpos contra la fracción pequeña deseada, y propagarla indefinidamente, hasta obtener una gran cantidad de esos anticuerpos, contra dicha fracción. De este modo, al menos en principio, es posible producir anticuerpos monoclonales contra cualquier proteína de una muestra biológica. Una vez que el anticuerpo es producido, puede usarse como sonda específica para localizar la proteína dentro de la célula, purificarla y analizar su estructura y función. Más aún, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra mezclas impuras de proteínas pueden contribuir a la identificación de nuevas proteínas, ya que menos de 5% de las diez mil proteínas que se localizan en forma típica en una célula de mamífero han sido aisladas y purificadas.



Bibliografía

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4ª ed. EE.UU. (Nueva York): Garland Science Taylor & Francis Group, 2008.
- Barrera-S HA. Información genética: su estructura, función y manipulación. México: Conacyt, 1992.
- Bowen RW, Baxter DW. Experimental cell biology: an integrated laboratory guide and text. 2ª ed. EE.UU.: Macmillan, 1980.
- Darnell J *et al.* Molecular cell biology. 3ª ed. EE.UU.: Scientific American, 1995.
- Dellman HD. Histología veterinaria. 2ª ed. España: Acribia, 1993.
- Glauert A. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. 8ª ed. EE.UU.: North-Holland Publishing, 1991.
- Holtzman E, Novikoff BA. Estructura y dinámica celular. 3ª ed. México: Interamericana, 1988.
- Kessel GR, Kardon HR. Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy. EE.UU.: W.H. Freeman, 1979.
- Lehninger AA *et al.* Principles of biochemistry. 2ª ed. EE.UU.: Worth, 1993.
- Mercer EH, Birbeck C. Manual de microscopía electrónica para biólogos. España: Blume, 1974.
- Roberts LR *et al.* Freeze fracture images of cells and tissues. EE.UU.: Oxford, 1991.
- Rhodin JA. An atlas of histology. EE.UU.: Oxford University Press, 1975.
- Salcedo AMO *et al.* Manual de prácticas de biología celular. México: UNAM, ENEP Iztacala, 1993.
- Santos MA. Química y bioquímica de los alimentos. México: UACH, 1995.
- Stryer L. Bioquímica. 3ª ed. España: Reverte, 1993.



Biología
Celular
VETERINARIA

Editada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Se terminó el 30 de mayo de 2014

en la imprenta del Departamento de Diseño Gráfico y Editorial

de la Secretaría de Planeación y Vinculación:

edificio 2, planta baja, FMVZ-UNAM.

Avenida Universidad No. 3000, Ciudad Universitaria,

Coyoacán, 04510, México D.F.; tel.: 5622 5909.

La producción digital de esta obra constó de 600 ejemplares.

Formación y composición tipográfica

en tipo Myriad Pro 11 puntos y The Serif 14 puntos.

Tipo de impresión: CD-ROM, tamaño 65 MB.

El cuidado de la edición estuvo a cargo de:

Santiago René Anzaldúa.