Bioquímica Médica

Tomo II

Componentes celulares y Genética molecular



. Cardellá . Hernández .

Editorial Ciencias Médicas

Bioquímica Médica

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

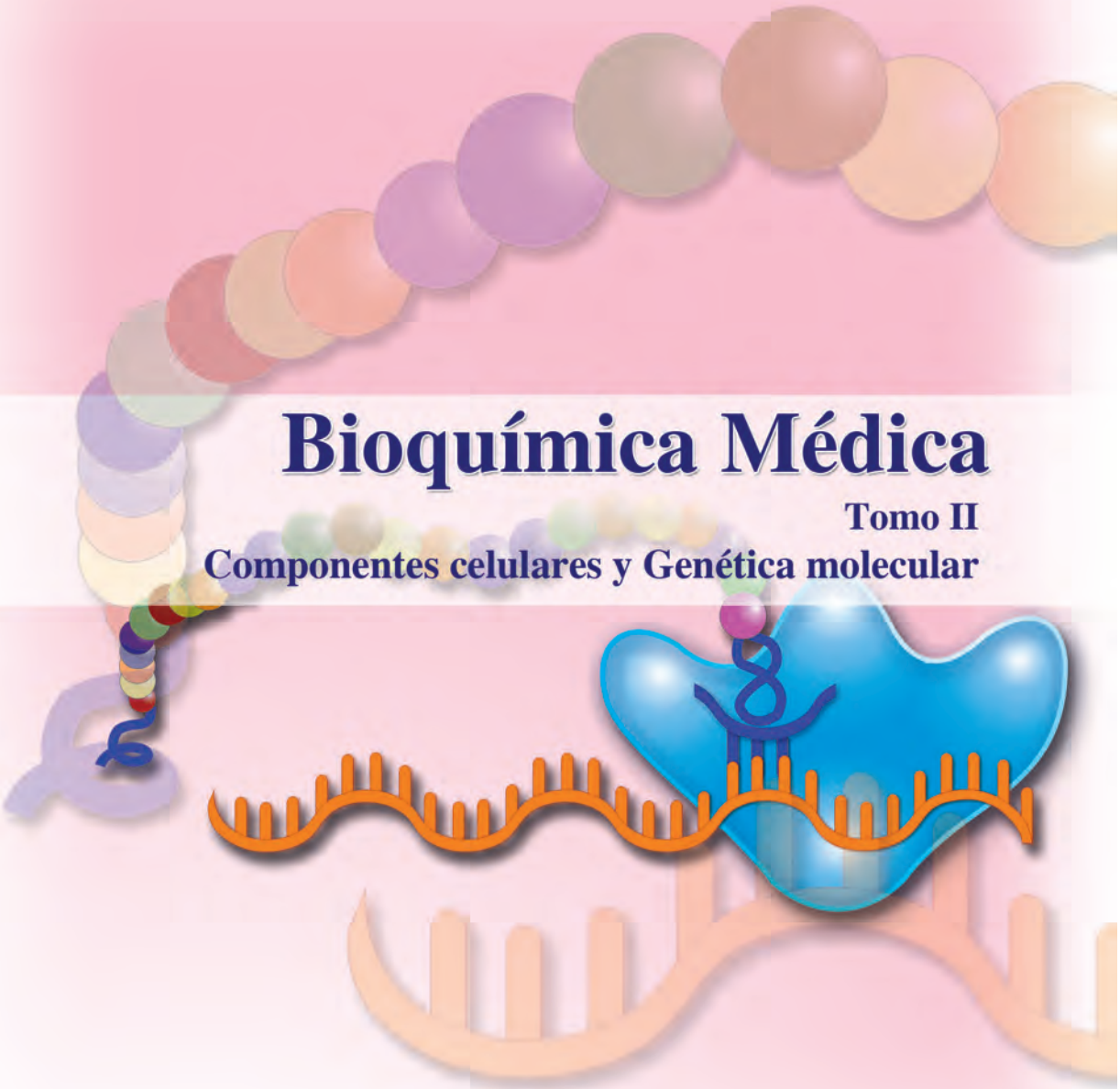
Gran Premio de la Salud en el año 2000

Premio Destacado a Nivel Nacional en el XV Fórum de Ciencia y Técnica en su primera edición

Bioquímica Médica

Tomo II

Componentes celulares y Genética molecular



ecimed
EDITORIAL CIENCIAS MÉDICAS
La Habana, 2014

Catalogación Editorial Ciencias Médicas

Bioquímica médica / Colectivo de autores; editores científicos y revisores: Lidia Cardellá Rosales y Rolando Hernández Fernández; 2 ed.--La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2014.
4 t. : il., tab. (Ciencias básicas).
-
-
Bioquímica

QU 4

Primera edición, 1999

Revisión técnica: Dra. Lidia Cardellá Rosales
Edición: Lic. María Emilia Remedios Hernández
Diseño: D.I. José M. Oubiña González
Ilustraciones: Marcos Rubén Ramos Mesa
Emplane: Isabel M. Noa Riverón

© **Lidia Cardellá Rosales, Rolando Hernández Fernández, 2014**
© **Sobre la presente edición Editorial Ciencias Médicas, 2014**

ISBN 978-959-212-873-6
ISBN 978-959-212-875-0

Editorial Ciencias Médicas
Calle 23 No. 654 entre D y E, El Vedado
La Habana, Cuba, CP 10400
Teléfono: 836 1893
Correo electrónico: ecimed@infomed.sld.cu
http://www. ecimed.sld.cu

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

AUTORES PRINCIPALES

Dra. Lidia Cardellá Rosales
Doctora en Ciencias Biológicas. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Investigadora Titular. Profesora Titular, Consultante y de Mérito de la Escuela Latinoamericana de Medicina.

Dr. Rolando Hernández Fernández
Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Titular y Consultante del Departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

AUTORES

Dra. Celia Upmann Ponce de León
Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica. Profesora Titular y Consultante del Departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

Dr. Agustín Vicedo Tomey
Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Titular y Consultante del Departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Dr. Simón Sierra Figueredo
Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas "Salvador Allende", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

Dra. Estrella Rubio Bernal
Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Máster en Ciencias en Bioquímica. Profesora Auxiliar y Consultante del Departamento de Bioquímica de la Escuela Latinoamericana de Medicina.

Dr. Raúl Fernández Regalado
Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Titular del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.

Dra. Vivian Kourí Cardellá
Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora Titular. Investigadora Titular del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Dr. Andrés Pérez Díaz
Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Titular.

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

". . .yo sé que la palabra Bioquímica produce determinados reflejos condicionados en nuestros estudiantes. Y cuando los vemos traumatizados por la Bioquímica, horrorizados por la Bioquímica, decimos: ¿Cómo es posible, siendo tan interesante, tan maravillosa y tan útil la Bioquímica?"

Fidel Castro Ruz

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Al querido profesor Roberto Alonso Borges, quien dedicó una parte importante de su vida laboral a enseñar Bioquímica a médicos y estomatólogos, y fuera, además, el principal promotor del primer texto cubano *Temas de Bioquímica*, por el que estudiaron esta disciplina, durante muchos años, decenas de miles de estudiantes de las ciencias médicas en nuestro país.

Constituya esta obra un homenaje de recordación, admiración y respeto a quien fue tan insigne profesor.

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

ÍNDICE GENERAL

Biomoléculas

Tomo I

Prólogo
Contenido
Presentación

Sección I. Introducción a la bioquímica

Introducción a la sección
Capítulo 1. La ciencia bioquímica
Capítulo 2. La disciplina Bioquímica
Capítulo 3. La materia viva
Capítulo 4. Formas básicas de organización de la materia viva
Resumen de la sección

Sección II. Estructura y función de las biomoléculas

Introducción a la sección
Capítulo 5. Introducción al estudio de las biomoléculas
Capítulo 6. Aminoácidos
Capítulo 7. Monosacáridos
Capítulo 8. Nucleótidos
Capítulo 9. Características generales de las macromoléculas
Capítulo 10. Polisacáridos
Capítulo 11. Estructura de los ácidos nucleicos
Capítulo 12. Proteínas
Capítulo 13. Estructura de los lípidos
Resumen de la sección

Sección III. Biocatalizadores

Introducción a la sección
Capítulo 14. Reacciones químicas y catalizadores
Capítulo 15. Enzimas y centro activo
Capítulo 16. Cinética enzimática
Capítulo 17. Regulación de la actividad enzimática
Capítulo 18. Organización de las enzimas
Capítulo 19. Cofactores enzimáticos
Resumen de la sección

Bibliografía
Índice alfabético

Componentes celulares y genética molecular

Tomo II

Prólogo
Contenido
Presentación

Sección IV. Componentes celulares

Introducción a la sección
Capítulo 20. Membranas biológicas
Capítulo 21. Organelos membranosos intracelulares
Capítulo 22. Citoesqueleto
Capítulo 23. Núcleo celular
Resumen de la sección

Sección V. Genética molecular

Introducción a la sección
Capítulo 24. Organización del genoma humano
Capítulo 25. Ciclo celular
Capítulo 26. Replicación del ADN
Capítulo 27. Transcripción del ADN

Capítulo 28. Código genético
Capítulo 29. Ribosomas
Capítulo 30. Traducción
Capítulo 31. Recombinación genética
Capítulo 32. Mutaciones
Capítulo 33. Conservación de la información genética
Capítulo 34. Regulación de la expresión genética
Capítulo 35. Tecnología del ADN recombinante
Resumen de la sección

Bibliografía
Índice alfabético

Metabolismo intermediario y su regulación

Tomo III

Prólogo
Contenido
Presentación

Sección VI. Respiración celular

Introducción a la sección
Capítulo 36. Introducción al metabolismo celular
Capítulo 37. Flujo catabólico de sustancia y energía
Capítulo 38. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Capítulo 39. Cadena transportadora de electrones
Capítulo 40. Fosforilación oxidativa
Capítulo 41. Introducción al metabolismo intermediario
Resumen de la sección

Sección VII. Metabolismo de los glúcidos

Introducción a la sección
Capítulo 42. Digestión y absorción de los glúcidos
Capítulo 43. Metabolismo del glucógeno
Capítulo 44. Metabolismo de la glucosa
Capítulo 45. Fotosíntesis
Capítulo 46. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados

Resumen de la sección

Sección VIII. Metabolismo de los lípidos

Introducción a la sección
Capítulo 47. Digestión y absorción de los lípidos
Capítulo 48. Transporte de lípidos y lipoproteínas
Capítulo 49. Lipogénesis
Capítulo 50. Lipólisis
Capítulo 51. Metabolismo de los cuerpos cetónicos
Capítulo 52. Metabolismo de los fosfátidos de glicerina y de los esfingolípidos
Capítulo 53. Metabolismo de los esteroides
Resumen de la sección

Sección IX. Metabolismo de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular

Introducción a la sección
Capítulo 54. Digestión de las proteínas
Capítulo 55. Metabolismo general de los aminoácidos
Capítulo 56. Eliminación del nitrógeno del organismo
Capítulo 57. Metabolismo de nucleótidos
Capítulo 58. Metabolismo de las porfirinas
Resumen de la sección

Sección X. Integración y regulación del metabolismo intermediario

Introducción a la sección
Capítulo 59. Comunicación entre las células del organismo
Capítulo 60. Acción hormonal
Capítulo 61. Regulación del metabolismo
Capítulo 62. Integración del metabolismo
Resumen de la sección

Bibliografía
Índice alfabético

Bioquímica especializada

Tomo IV

Prólogo
Contenido
Presentación

Sección XI. Especificidades bioquímicas de algunos tejidos

Introducción a la sección
Capítulo 63. La sangre
Capítulo 64. Tejido nervioso
Capítulo 65. Aspectos bioquímicos de la visión
Capítulo 66. Tejido muscular
Capítulo 67. Tejido adiposo
Capítulo 68. Tejido conectivo
Capítulo 69. Bioquímica dental
Resumen de la sección

Sección XII. Bases moleculares de la nutrición humana

Introducción a la sección
Capítulo 70. Requerimientos nutricionales en el ser humano
Capítulo 71. Proteínas en la dieta humana
Capítulo 72. Glúcidos y lípidos en la dieta humana
Capítulo 73. Vitaminas en la nutrición humana
Capítulo 74. Minerales en la nutrición humana
Resumen de la sección

Sección XIII. Aspectos bioquímicos en la patología

Introducción a la sección
Capítulo 75. Alteraciones metabólicas de causas múltiples
Capítulo 76. Enfermedades moleculares
Capítulo 77. Endocrinopatías
Capítulo 78. Los virus
Capítulo 79. Enzimología clínica
Resumen de la sección

Sección XIV. Problemas actuales de la bioquímica

Introducción a la sección
Capítulo 80. Cáncer
Capítulo 81. Morfogénesis
Capítulo 82. Producción de anticuerpos
Capítulo 83. Estrés oxidativo
Capítulo 84. Virus de inmunodeficiencia humana
Capítulo 85. Origen de la vida
Capítulo 86. Evolución molecular
Capítulo 87. Envejecimiento
Resumen de la sección

Bibliografía
Índice alfabético

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

PREFACIO

La bioquímica es una ciencia que se ha desarrollado con un ritmo muy acelerado en los últimos siglos. Los logros alcanzados en los últimos años en el conocimiento de esta ciencia han influido decisivamente en el progreso de numerosas ramas científicas afines, en particular las biomédicas. Muchos hallazgos de la bioquímica han incidido directa o indirectamente en la teoría y la práctica médica; por ello resulta imprescindible el dominio de los aspectos fundamentales de esta disciplina por parte de médicos, estomatólogos, licenciados en enfermería y tecnología de la salud, y en general por todo el personal profesional relacionado con la asistencia, docencia e investigación en el campo de las ciencias médicas.

El texto fue elaborado teniendo en cuenta los intereses de las diferentes especialidades de las ciencias médicas. De igual modo, este puede ser de utilidad a estudiantes de cualquier otra carrera biológica. En el tomo IV se tratan, además, algunos aspectos especializados de la bioquímica, de interés clínico actual, lo que permite a estudiantes de años superiores y graduados de las diferentes ramas de las ciencias médicas complementar y aplicar conocimientos adquiridos al cursar las ciencias básicas.

Nuestros propósitos son contribuir a mejorar la comprensión de la disciplina Bioquímica y destacar su importancia en la formación de profesionales de las especialidades médicas. Corresponde principalmente a nuestros estudiantes evaluar en qué medida ello se ha logrado.

Los autores

CONTENIDO

Sección IV. Componentes celulares

Introducción a la sección/ 375

Capítulo 20

Membranas biológicas/ 377

Componentes moleculares de las membranas/ 377
- Lípidos de membrana/ 377
- Fluidez de las membranas/ 380
- Proteínas de membrana/ 380
- Glúcidos de membrana/ 381

Modelo del mosaico fluido/ 382
Membrana plasmática/ 383
- Funciones de la membrana plasmática/ 386

Transporte de sustancias a través de las membranas/ 387
- Difusión y ósmosis/ 387
- Paso de sustancia a través de proteínas/ 389
- Paso del agua a través de las membranas biológicas/ 389

Potencial de membrana en reposo/ 397
Diferenciación de la membrana plasmática/ 397
Resumen/ 398
Ejercicios/ 398

Capítulo 21

Organelos membranosos intracelulares/ 401

Tipos de organelos membranosos internos/ 401
Estructura general de las endomembranas/ 402
Funciones generales de los organelos membranosos/ 402
Relaciones entre los organelos membranosos/ 403
- Retículo endoplasmático/ 403
- Aparato de Golgi/ 407
- Lisosomas/ 408
- Peroxisomas/ 411

Relaciones del sistema de endomembranas/ 412
Resumen/ 413
Ejercicios/ 414

Capítulo 22

Citoesqueleto/ 415

Citoplasma soluble/ 416
Microfilamentos/ 416
- Principales funciones de los microfilamentos/ 419

Microtúbulos/ 419
- Principales funciones de los microtúbulos/ 421

Filamentos intermedios/ 421
Inclusiones citoplasmáticas/ 422
- Glóbulos de grasa/ 422
- Gránulos de glucógeno/ 423

Resumen/ 424
Ejercicios / 426

Capítulo 23

Núcleo celular/ 427

Concepto/ 427
Componentes estructurales del núcleo y su organización/ 428
- Envoltura nuclear/ 430
- Nucléolo/ 437
- Nucleoplasma y matriz/ 438
- Par cromatina-cromosoma/ 438

Cariotipo humano normal/ 442
- Alteraciones del cariotipo/ 443

Mitosis/ 443
Resumen/ 448
Ejercicios/ 449

Resumen de la sección/ 450

Sección V. Genética molecular

Introducción a la sección/ 451



Organización del genoma humano/ 453

Genes eucariontes/ 453
Nomenclatura de los genes/ 454
Genes y cromosomas/ 455
Genes y ADN/ 459
Estructura del gen/ 461
Familias génicas/ 464
Genoma humano/ 466
Distribución de los genes en los cromosomas/ 468
Resumen/ 469
Ejercicios/ 470



Ciclo celular/ 471

Información genética/ 471
Formas de operar con la información genética/ 472
El ciclo celular en el tiempo/ 473
Actividad biosintética durante el ciclo celular/ 475
Eventos de cada etapa del ciclo celular/ 479
Progresión del ciclo celular/ 479
El ciclo al nivel molecular/ 485
Regulación del ciclo celular/ 485
Resumen/ 488
Ejercicios/ 489



Replicación del ADN/ 491

Antecedentes/ 492
Aspectos generales/ 494
Requerimientos de la replicación/ 495
Etapas de la replicación/ 496
Replicación en procariontes/ 497
Replicación en eucariontes/ 498
Formación del complejo prerreplicativo/ 500
Activación del complejo prerreplicativo y su transición a complejo de preiniciación/ 501
Iniciación de la replicación/ 503
Elongación de la replicación/ 504
Procesamiento de los fragmentos de Okasaki/ 506
Terminación de la replicación/ 508
Posterminación/ 510
Replicación de los telómeros/ 512
Fidelidad de la replicación/ 516
Rectificación de los errores de la replicación/ 518
Procesos complementarios a la replicación/ 519
Control de la replicación/ 521
Inhibidores de la replicación/ 522
Resumen/ 523
Ejercicios / 525



Transcripción del ADN/ 527

Inicios/ 528
Aspectos generales/ 528
Etapas de la transcripción/ 529
Transcripción en procariontes/ 530
Eventos previos a la iniciación (preiniciación)/ 531
Iniciación/ 532
Elongación/ 534
Terminación/ 534
Eventos posterminación/ 537
Maduración de los ARNt/ 538
Maduración de los ARNr/ 539
Transcripción en eucariontes/ 539
Características generales/ 539
Transcripción por la ARN polimerasa I/ 540
Transcripción por la ARN polimerasa II/ 543
Preiniciación/ 543
Iniciación/ 545
Elongación/ 546
Adición del casquete o modificación del extremo 5´/ 548
Eliminación de los intrones/ 548
Terminación/ 553
Unidades de transcripción/ 555
Transcripción por la ARN polimerasa III/ 556
Inhibidores de la transcripción/ 558
Resumen/ 558
Ejercicios/ 560

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Capítulo 28

Código genético/ 563

Primeros pasos/ 564
Descifrado del código/ 565
  El modelo experimental/ 565
  Composición de los codones/ 566
  Orden de las bases en los codones/ 567
Codones de terminación/ 568
Codón de iniciación/ 569
Universalidad del código/ 570
Estructura del código/ 570
Descodificación/ 573
Resumen/ 575
Ejercicios/ 576

Capítulo 29

Ribosomas/ 577

Primeros indicios/ 578
Composición molecular/ 578
  Ribosomas de procariontes/ 578
  Ribosomas de eucariontes/ 580
Estructura tridimensional/ 580
  Localización de los componentes/ 582
  Dominios funcionales/ 584
Biogénesis de los ribosomas/ 586
Polirribosomas/ 589
Resumen/ 590
Ejercicios/ 590

Capítulo 30

Traducción/ 593

Primeros aportes/ 593
Características generales/ 594
Factores de traducción/ 595
Activación de los aminoácidos/ 596
Traducción en procariontes/ 598
  Formación del complejo de preiniciación/ 598
  Incorporación del fmet-ARNT$_I$/ 599
  Incorporación del ARNm/ 599
  Formación del complejo de iniciación 70 S/ 600
  Elongación/ 601
  Incorporación del aminoacil-ARNt/ 601
  Formación del enlace peptídico/ 603
  Translocalización/ 603
  Terminación/ 604
Traducción en eucariontes/ 604
  Elongación/ 608
  Terminación/ 612
  Posterminación/ 614
  Distribución de proteínas/ 615
  Consideraciones energéticas/ 616
  Inhibidores de la traducción/ 617
Resumen/ 617
Ejercicios/ 619

Capítulo 31

Recombinación genética/ 621

Historia del problema/ 621
Tipos de recombinación genética/ 622
  Modelo de Holliday/ 623
  Comprobación del modelo/ 625
  Formación del intermediario de Holliday/ 626
  Enzimología de la recombinación/ 628
  Recombinación genética en seres humanos/ 629
Recombinación sexual/ 632
  Significado biológico de la recombinación/ 633
Resumen/ 636
Ejercicios/ 637

Capítulo 32

Mutaciones/ 639

Definiciones y nomenclatura/ 639
  Concepto de mutación/ 639
  Tipos de mutaciones/ 640
Mutagénesis/ 641
  Mutágenos análogos de bases/ 642
  Mutágenos químicos/ 643
  Sustancias intercalantes/ 644
  Radiaciones/ 644
  Consecuencias de las mutaciones/ 644
  Mutaciones mayores/ 646

Supresión/ 647
Mutaciones en seres humanos/ 648
Resumen/ 650
Ejercicios/ 650



Conservación de la información genética/ 653

Modificación-restricción/ 654
Causas y consecuencias de los daños al ADN/ 656
Sistemas de reparación/ 658
Reparación directa/ 659
Reparación indirecta/ 661
Reparación por escisión de bases/ 661
Reparación por escisión de nucleótidos/ 661
Reparación de enlaces entrecruzados/ 665
Reparación de las roturas de hebras/ 666
Roturas de una hebra/ 668
Roturas de las dos hebras/ 668
Alteraciones de la reparación/ 670
Resumen/ 672
Ejercicios/ 673



Regulación de la expresión genética/ 675

Aspectos generales/ 675
Regulación de la expresión de la información genética en procariontes/ 676
Regulación transcripcional/ 676
Inducción enzimática/ 677
Modelo del operón/ 678
Operón *lac*/ 678
Represión enzimática/ 681
Operón *trp*/ 682
Mecanismo de atenuación/ 683
Eficiencia del promotor/ 685
Regulación postranscripcional/ 685
Regulación de la expresión de la información genética en eucariontes/ 686
Regulación pretranscripcional/ 686
Regulación transcripcional/ 690
Regulación postranscripcional/ 691
Resumen/ 692
Ejercicios/ 694



Tecnología del ADN recombinante/ 695

Procedimiento general/ 696
Obtención de genes específicos/ 696
Recombinación *in vitro*/ 698
Vectores/ 700
Identificación del gen recombinado/ 701
Problemas en la producción de proteínas eucariontes/ 702
Expresión de genes clonados/ 703
Experiencia típica/ 704
Empleo diagnóstico/ 705
El ADN y los problemas de identificación/ 706
Perspectivas/ 707
Resumen/ 708
Ejercicios/ 709

Resumen de la sección V/ 710

Bibliografía/ 712

Índice alfabético/ 723

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

PRESENTACIÓN

Los avances alcanzados por la bioquímica, entre otras ciencias biológicas, han hecho posible los estudios de todos los componentes de la célula y especialmente de la estructura íntima al nivel molecular, la organización supramolecular y la función de los organitos subcelulares, haciendo énfasis en la relación estructura-función a sus distintos niveles de organización.

Entre los diferentes procesos que ocurren en las células, han ocupado los primeros lugares, en los últimos años, todos aquellos relacionados con la genética molecular.

Los logros alcanzados por la genética molecular y la inmunología, fundamentados, en gran medida, por hallazgos bioquímicos trascendentales, han sido determinantes en el desarrollo de la ingeniería genética y la biotecnología; de todo ello se beneficia, mediante aportes concretos, la práctica médica.

En este segundo tomo de *Bioquímica Médica* se trata el estudio de los componentes celulares y de la genética molecular, con un enfoque eminentemente funcional, teniendo en cuenta la necesidad de mejorar la comprensión de sus aspectos básicos para el profesional de las ciencias médicas.

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN



SECCIÓN IV

COMPONENTES CELULARES

Introducción a la sección

Como fue considerado en el capítulo 4, del tomo I, la célula es la forma fundamental de organización de la materia viva, por lo cual se deduce que la comprensión del funcionamiento celular constituye un elemento fundamental para el conocimiento de los fenómenos biológicos en su conjunto.

La primera aproximación del hombre al estudio de la célula se produjo a través de su morfología, auxiliado en sus inicios por instrumentos ópticos de amplificación de imágenes. Desde los primeros momentos se hizo evidente que las células eran estructuras complejas, con un elevado nivel de organización interna.

El desarrollo de los estudios bioquímicos, que demostraron la posibilidad de analizar algunas funciones celulares en preparados libres de células –fundamentalmente algunas actividades enzimáticas–, abrió un periodo importante para adquirir nuevos conocimientos acerca del funcionamiento de estas células. Se descubrieron las vías y los ciclos metabólicos, y avanzó de manera extraordinaria el conocimiento acerca de la estructura y la función de las enzimas, así como su función reguladora en el metabolismo.

En una etapa pareció que el conocimiento bastante completo de la función celular estaba relativamente cerca y que consistiría en identificar todas y cada una de las enzimas celulares, así como las reacciones que ellas catalizaban, de este modo, una imagen reduccionista de la célula, como un pequeño saco

donde las enzimas llevaban a cabo su función, cobró algún valor en el pensamiento de los bioquímicos. Pronto esta imagen afrontó dificultades, al ponerse en evidencia que muchas funciones metabólicas requerían no solo los catalizadores enzimáticos correspondientes, sino determinadas estructuras con un elevado grado de organización; tal fue el caso de la síntesis de proteínas en relación con los ribosomas o de la respiración celular con las mitocondrias.

De manera simultánea el desarrollo de los métodos de estudio de la morfología celular –especialmente la microscopia electrónica– fue revelando la extraordinaria complejidad de la citoarquitectura, a ello se unió el cúmulo de información obtenida mediante métodos como la histoquímica y la inmunohistoquímica, los cuales permitieron hacer un análisis que integraba la estructura y la función de diversos componentes.

Hoy resulta evidente que si se quiere comprender adecuadamente la célula, la visión del pequeño saco repleto de enzimas tiene que ser desplazada por la de un complejo estructural y funcional, donde son tan importantes las características cinéticas de una enzima, como su ubicación intracelular y sus atributos topológicos.

De este modo se justifica plenamente la inclusión de esta sección "componentes celulares" en un texto de Bioquímica; desde luego, el lector deberá tener presente que el contenido es eminentemente funcional y los detalles morfológicos se consideran en la medida que contribuyen a este objetivo. El estudio cada vez más complejo sobre la morfología celular sigue siendo objeto de estudio primordial en disciplinas de carácter morfológico como la Histología. Sin dudas, se va acercando a una síntesis de conocimientos que muchos reconocen como una disciplina independiente, la Biología Molecular, en este caso se considera como una parte de la propia Bioquímica.

El enfoque eminentemente funcional induce a tratar los aspectos estructurales de algunos componentes celulares (mitocondrias y ribosomas) en capítulos de otras secciones donde se estudian sus funciones.

En esta sección se tratan aspectos estructurales y funcionales de los componentes celulares, cuáles son la membrana plasmática y los organelos membranosos intracelulares, el núcleo celular y el citoesqueleto.

En este texto se podrá comprobar cómo estos conocimientos son retomados necesariamente para lograr una mejor comprensión del funcionamiento y la regulación del metabolismo celular, cobrando fuerza una concepción de la relación estructura-función a todos los niveles de organización de la materia viva. Sin embargo, debe quedar esclarecido que una célula es un objeto muy complejo, con un elevadísimo grado de organización, cuya comprensión requiere aún intensas investigaciones.

Membranas biológicas

Las membranas biológicas son organizaciones supramacromoleculares flexibles y fluidas que delimitan las células del medio circundante (membrana plasmática) o constituyen el sistema de endomembranas característico de las células eucariotas y que condiciona la compartimentación de estas; además, las membranas delimitan muchos organelos citoplasmáticos.

Aunque la composición molecular de las membranas biológicas varía de acuerdo con el tipo de célula del cual forme parte, e incluso de su localización intracelular, todas estas presentan un conjunto de características comunes, tanto en relación con su composición molecular y su organización estructural general como con sus funciones básicas.

En este capítulo se estudiarán estas características comunes para todas las membranas biológicas, además, se tratarán las especificidades estructurales generales de la membrana plasmática, haciendo énfasis en algunas de sus funciones, en particular las relacionadas con el paso de sustancias a través de ella.

Componentes moleculares de las membranas

Las distintas membranas biológicas están constituidas fundamentalmente por lípidos y proteínas, poseen, además, glúcidos en pequeñas cantidades (Fig. 20.1). Los lípidos y las proteínas son los componentes fundamentales que se encuentran en proporciones variables según el tipo de membrana; en las membranas mielínicas, los lípidos constituyen cerca del 80 % de su masa y las proteínas, alrededor del 20 %, en tanto, que en la membrana interna de las mitocondrias la proporción de ambos constituyentes es inversa: 20 % de lípidos y 80 % de proteínas. Entre estos límites existe una gama de proporciones diversas de dichos componentes; se analizarán algunos aspectos particulares de cada uno de los componentes moleculares de las membranas.

Lípidos de membrana

Los lípidos que forman parte de las membranas presentan como propiedad común ser anfipáticos, lo que se debe a una porción polar y otra apolar en su estructura. Dichos lípidos de membranas son fosfátidos de glicerina y esfingolípidos; los triacilgliceroles se encuentran en cantidades ínfimas. Algunos tipos de membrana poseen colesterol y ésteres de colesterol.

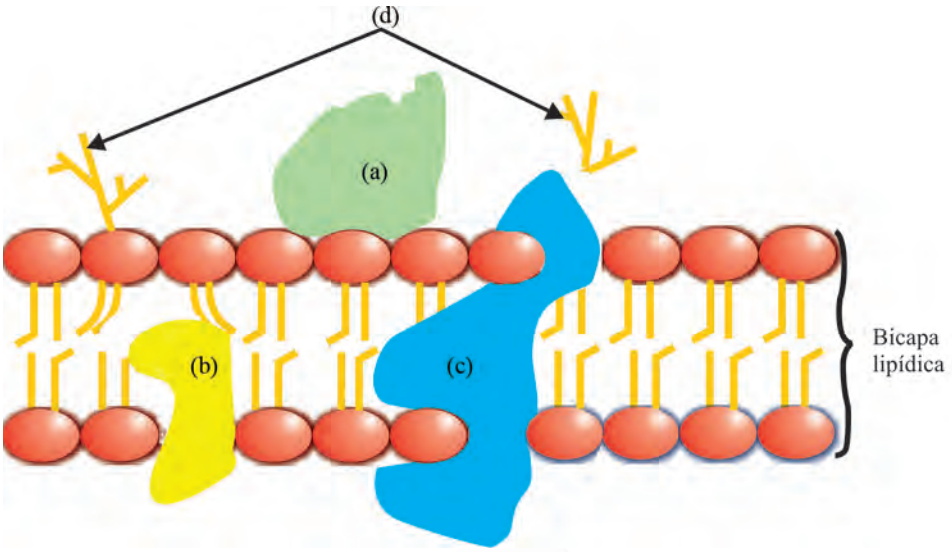


Fig. 20.1. Representación de los componentes de las membranas biológicas. Los lípidos anfipáticos que forman la estructura básica: bicapa lipídica: (a), (b) y (c), proteínas; (d) glúcidos, unidos covalentemente a lípidos o proteínas.

La característica anfipática de los principales lípidos de las membranas condiciona la organización estructural de estos en forma de micela o bicapa (Fig. 20.2), en la cual los grupos polares se disponen hacia el exterior de esta e interactúan con el medio acuoso a través de puentes de hidrógeno y de interacciones electrostáticas. Las cadenas apolares, a su vez, se dirigen hacia el interior, entre estas se establecen atracciones por uniones hidrofóbicas y por fuerzas de Van der Waals.

En la figura 20.3 se puede apreciar la forma en que el colesterol se relaciona con los fosfolípidos; como se ha dicho, la bicapa –estructura fundamental de las membranas– es fluida, ello depende de su composición. La longitud de la cadena y el grado de insaturación de los ácidos grasos –constituyentes de los fosfátidos de glicerina y los esfingolípidos– influyen de forma determinante en esta propiedad; de esta manera, los ácidos grasos de cadena corta y los insaturados limitan el "empaquetamiento" de las cadenas hidrófobas y por tanto contribuyen a la fluidez. La presencia de colesterol en la membrana ejerce efectos sobre su fluidez.

La bicapa lipídica es asimétrica, ya que la disposición de sus componentes difiere en cada una de las capas. La mayoría de las moléculas de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina se encuentran en la capa interna, en tanto que en la externa predominan las de fosfatidilcolina y esfingomielina; el difosfatidilglicerol se encuentra solo en la membrana interna de la mitocondria y en algunas membranas bacterianas. El inositol en el fosfatidilinositol, así como el 4,5-difosfoinositol fosfoglicérido (PIP_2), también forman parte de la membrana plasmática y en el caso del PIP_2 es fuente de dos segundos mensajeros.

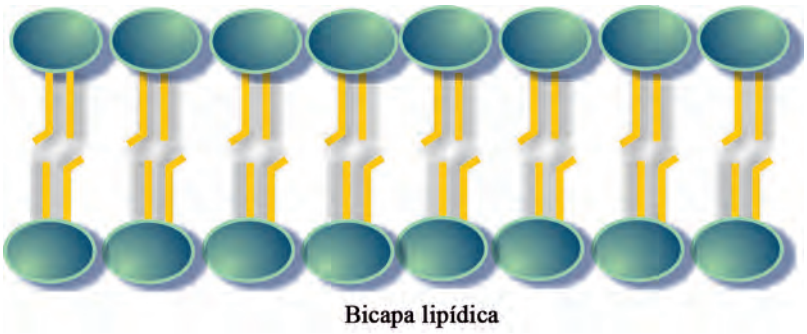


Fig. 20.2. Bicapa lipídica. Los lípidos anfipáticos se asocian y forman la estructura de bicapa; las porciones polares de los lípidos se disponen hacia el exterior de la bicapa (en verde), en tanto las porciones apolares se disponen hacia el interior y se establecen entre estas atracciones hidrofóbicas.

Los plasmalógenos también forman parte de algunas membranas, como en el tejido nervioso y el corazón. Más adelante se tratarán algunos glúcidos que se unen a lípidos para formar los glucolípidos.

El espesor de la bicapa lipídica mide aproximadamente entre 6 y 9 nm para la mayoría de las membranas; esta bicapa se comporta como una barrera permeable para las sustancias lipídicas, e impermeables a los iones y compuestos polares, con la excepción del agua (Fig. 20.4).

En estudios experimentales efectuados con bicapas lipídicas artificiales, preparadas en el laboratorio a partir de fosfolípidos y algunas proteínas, se ha comprobado que estas muestran la característica de disponerse en forma de láminas extensas, de manera espontánea; tienen, además, la tendencia a autoensamblarse y constituir compartimientos cerrados, y si se provoca su disrupción, son capaces de autorrepararse.

Los sistemas artificiales de membranas han sido muy estudiados, con el objetivo de esclarecer las propiedades y funciones de las membranas biológicas; estos sistemas se han empleado para formar liposomas, preparando diversos tipos de vesículas. Los liposomas formados han sido empleados con propósitos terapéuticos, como vía para introducir en la célula algunos agentes farmacológicos.

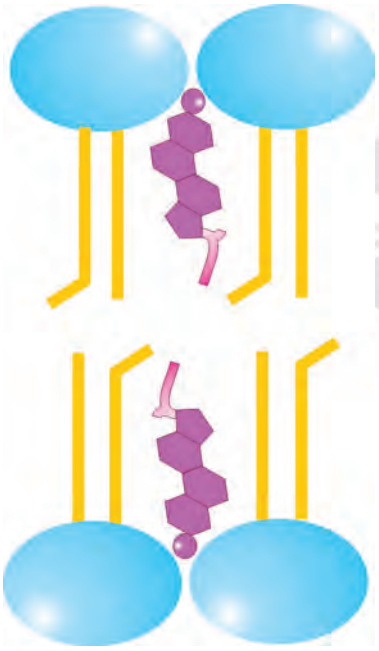


Fig. 20.3. Se aprecia la forma en la que la molécula del colesterol (en violeta) se intercala en la bicapa lipídica: su porción polar (grupo OH de posición 3) se relaciona con la porción polar de los lípidos, mientras su porción apolar (el ciclopentanoperhidrofenantreno y la cadena hidrocarbonada unida a la posición 17) se relaciona con las partes apolares de los lípidos de la bicapa.

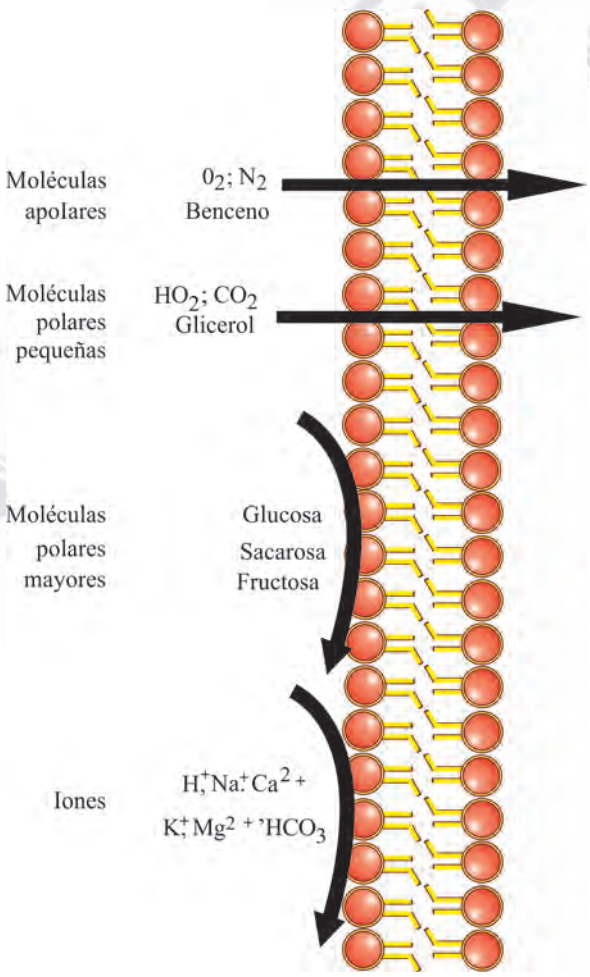


Fig. 20.4. Representación de la permeabilidad de la membrana a diferentes sustancias de acuerdo con su tamaño y características químicas. Las sustancias apolares y algunas polares muy pequeñas pueden atravesar la bicapa, en tanto las polares de mayor tamaño y los iones resultan impermeables.

Fluidez de las membranas

El grado de fluidez de las membranas varía, según la transición del estado muy ordenado (gel), el cual se estabiliza por interacciones de Van de Waals entre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos al estado fluido, con mayor movilidad en el que existen menos interacciones de Van de Waals. Esta transición se debe a movimientos del enlace C-C de las cadenas de los ácidos grasos. Durante la transición del estado gel al fluido se absorbe gran cantidad de calor, por variaciones de pocos grados de temperatura.

La temperatura con la cual ocurre el paso del estado de gel al fluido se conoce como temperatura de transición (Tm) (Fig. 20.5).

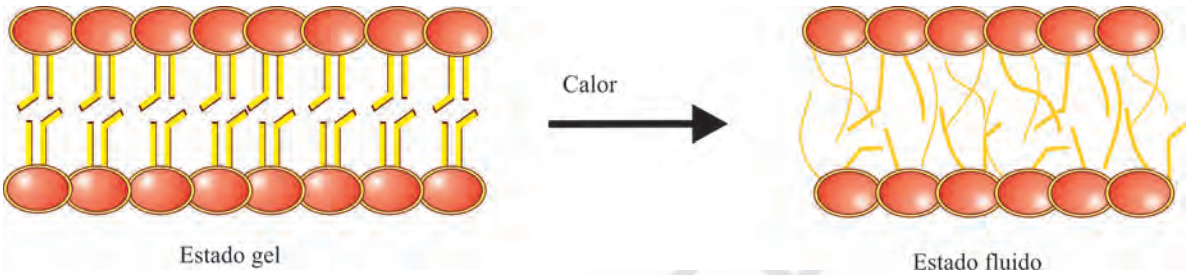


Fig. 20.5. Fluidez de la membrana. La transición del estado gel al estado fluido absorbe gran cantidad de calor. La temperatura a la que ocurre esta transición se conoce como temperatura de transición (Tm) y se debe a movimientos de los enlaces C-C de las cadenas de los ácidos grasos componentes de los lípidos de la membrana. El tipo de ácido graso y la presencia de colesterol modifican la fluidez de la membrana.

En general, los lípidos con ácidos grasos insaturados o de cadena corta realizan la transición gel-fluido a menor temperatura que los lípidos que contienen ácidos grasos de cadena larga o saturados. Ello se debe a que los ácidos grasos de cadena corta tienen menor superficie para establecer las interacciones de Van de Waals y en los insaturados estas interacciones resultan más inestables.

El colesterol es importante en la determinación de la fluidez de la bicapa; este colesterol se intercala entre los fosfolípidos (Fig. 20.2), su grupo polar OH en contacto con la solución acuosa, cerca del extremo polar de los fosfolípidos, y el sistema anular del ciclopentanoperhidrofenantreno tiende a inmovilizar las cadenas de ácidos grasos. El efecto neto del colesterol sobre la fluidez de la membrana varía según la composición lipídica y la Tm. A temperaturas inferiores a la Tm, el colesterol interfiere con la interacción de las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos y por ello incrementa la fluidez; sin embargo, a temperaturas superiores a la Tm, el colesterol disminuye la fluidez, ya que su sistema anular de ciclopentanoperhidrofenantreno es más rígido que las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos y su movimiento en la membrana resulta limitado.

La fluidez de una membrana modifica discretamente la intensidad de algunas de sus funciones. Al aumentar la fluidez, también lo hace su permeabilidad al agua y otras moléculas hidrofílicas pequeñas, y aumenta la movilidad de las proteínas integrales, lo contrario ocurre si disminuye la fluidez de la membrana.

Proteínas de membrana

Las proteínas son componentes fundamentales de las membranas, que desempeñan funciones esenciales no solo porque contribuyen a la organización estructural, sino también porque manifiestan diversas actividades como enzimas, proteínas transportadoras o formadoras de canales, las cuales permiten que se produzca el paso de moléculas a través de las membranas plasmáticas o entre compartimientos celulares. Las proteínas

cumplen, además, la función de receptores de membrana, capaces de interactuar con ligandos específicos por medio del reconocimiento molecular; ello provoca que se produzca una respuesta celular determinada.

Sobre la base de su localización en la membrana, las proteínas se clasifican en periféricas o extrínsecas e integrales o intrínsecas (Fig. 20.6), estas últimas constituyen más del 70 % del total y se encuentran parcial o completamente incluidas dentro de la membrana, por tanto, solo pueden ser extraídas por medios drásticos, como detergentes o solventes orgánicos.

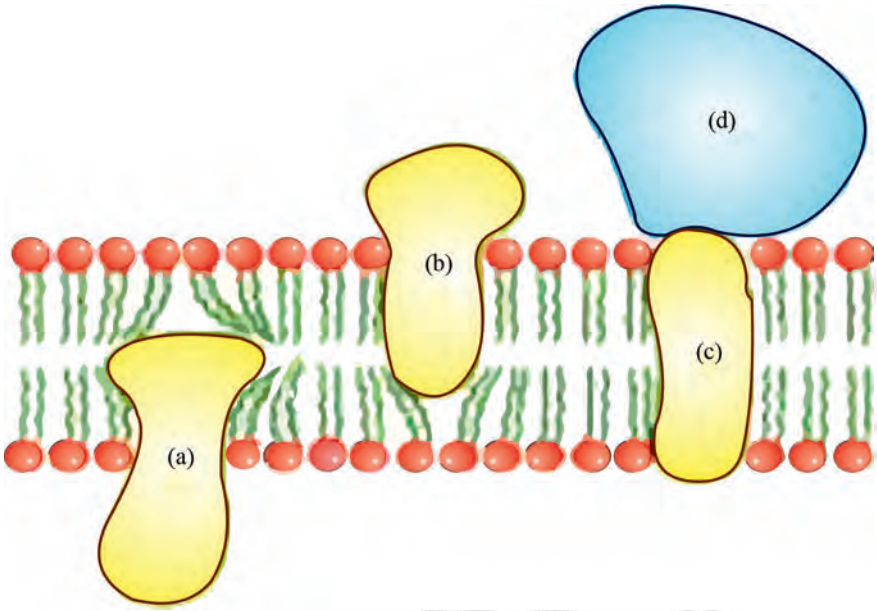


Fig. 20.6. Clasificación de las proteínas de membrana según su ubicación. Las proteínas que poseen alguna porción incluida dentro de la bicapa se conocen como proteínas integrales o intrínsecas (a, b y c). Las periféricas o extrínsecas se disponen en la superficie interna o externa de la bicapa (d).

Estas proteínas son habitualmente insolubles en solventes polares y pueden disponerse de lado a lado de la bicapa lipídica, en ese caso se denominan proteínas transmembranales. La disposición de las proteínas intrínsecas se muestra en la figura 20.6. Los receptores de membrana, las proteínas transportadoras, las proteínas que forman canales y muchas enzimas, son proteínas integrales.

Las proteínas periféricas se disponen en la superficie interna o externa de la bicapa y se unen por interacciones débiles, de tipo electrostático, a la cabeza polar de los lípidos de la membrana, por lo que son fácilmente separadas con el uso de soluciones salinas.

Estas proteínas son solubles en solventes polares. Entre las proteínas periféricas existen algunas con actividad enzimática.

Las porciones de las proteínas de membrana que se incluyen en la bicapa lipídica poseen un elevado contenido en aminoácidos apolares y predominio de la estructura en hélice α o conformación β. Como fue estudiado en el capítulo 12, la estructura en hélice α de las proteínas minimiza el carácter hidrofílico del enlace peptídico.

Glúcidos de membrana

En todas las células eucariotas se encuentra una cantidad de glúcidos que forman parte de las membranas, particularmente de la plasmática. Los glúcidos se hallan unidos de manera covalente a lípidos o proteínas formando glicolípidos o glicoproteínas, respectivamente. La fracción glucídica constituye entre el 2 % y el 10 %; desde el punto de vista estructural son oligosacáridos, la mayoría de los cuales están unidos a proteínas

y en menor cantidad a los lípidos. Los oligosacáridos de las membranas están dispuestos hacia la cara no citoplasmática (ver Fig. 20.1), estos cumplen las funciones siguientes:

– Contribuyen a la orientación de las proteínas en la membrana.
– Participan en la interacción entre membranas de células distintas.
– Desempeñan una función fundamental en las propiedades inmunológicas de las membranas.

Los monosacáridos que se encuentran formando parte de estos glicolípidos y glicoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N acetilgalactosamina y ácido siálico. La asimetría se mantiene debido a que el paso espontáneo de moléculas de una capa a la otra es prácticamente nulo.

Modelo del mosaico fluido

El modelo de membrana del mosaico fluido fue propuesto por Singer y Nicolson en l972, este es capaz de explicar numerosas propiedades físicas, químicas y biológicas de las membranas; se acepta universalmente como la organización estructural más probable de los componentes de las membranas biológicas.

El modelo se propuso sobre la base del estudio de la composición química y las propiedades físicas de las membranas biológicas, así como para resultados experimentales en los cuales se comparó el comportamiento de membranas sintéticas preparadas en el laboratorio, a partir de una mezcla de fosfolípidos y algunas proteínas, con el comportamiento de las membranas naturales.

En la figura 20.7 se puede apreciar una representación esquemática del modelo. Se considera que las proteínas forman un mosaico dentro de la bicapa lipídica, que constituye la estructura básica; además, las proteínas experimentan movimientos laterales. En este modelo se puede observar la disposición de los glúcidos en la cara no citoplasmática; las proteínas periféricas se localizan hacia ambos lados, y el conjunto adopta una estructura tridimensional compacta y flexible.

Resumiendo, el modelo del mosaico fluido considera:

– Los lípidos y las proteínas organizados en forma de mosaico.
– Las membranas son estructuras fluidas donde los lípidos y proteínas pueden efectuar movimientos de traslación dentro de la misma capa.
– Asimetría en la disposición de los lípidos, las proteínas y especialmente los glúcidos.

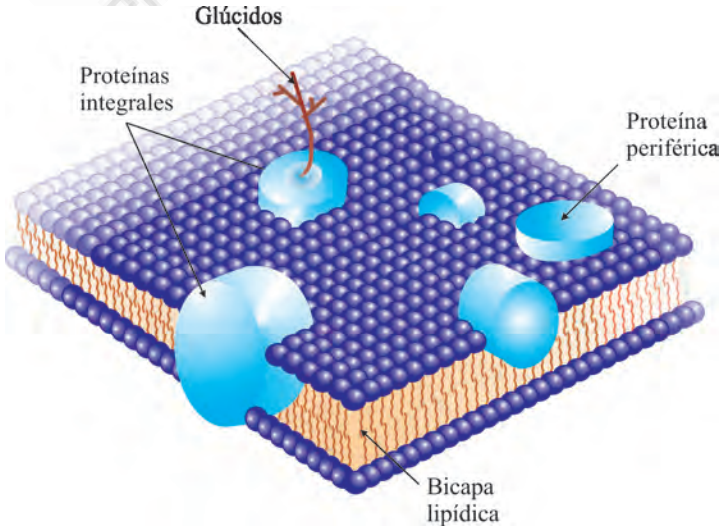


Fig. 20.7. Representación esquemática de una membrana biológica según el modelo del mosaico fluido. Se puede apreciar la bicapa lipídica, así como proteínas integrales y periféricas, y glúcidos.

Membrana plasmática

La membrana plasmática se organiza como una doble capa continua, delgada, de 4 a 5 nm de espesor. En algunas células, por fuera de la membrana, existe una cubierta celular que la cubre y protege. La membrana plasmática individualiza a la célula y permite que esta se relacione con el medio; su desarrollo constituyó un evento crucial en el proceso de evolución de la materia viva (capítulo 3).

La membrana plasmática está constituida de forma similar a la descrita para las membranas biológicas, por lo cual aquí se tratarán solo las particularidades más relevantes.

En un mismo tipo de membrana plasmática se han podido aislar e identificar unas 100 proteínas diferentes, y teniendo en cuenta los distintos tipos de membranas plasmáticas estudiadas, se ha determinado la presencia de numerosas enzimas, algunas de estas exhiben una localización hística específica, como las disacaridasas –localizadas en las microvellosidades de la mucosa intestinal–, en tanto, otras presentan una ubicación más universal –ATPasa dependiente de Na^+ y K^+.

Las proteínas transportadoras, las que forman canales y los receptores de membrana, tienen especial relevancia, ya que desempeñan una función vital en el intercambio de sustancia, energía e información de la célula con su entorno. Las proteínas de membrana pueden presentar, además, una función estructural, constituir antígenos o alguna otra función específica.

Balsas lipídicas. Las balsas lipídicas (en inglés *lipid raft*) son dominios dinámicos supramoleculares de esfingolípidos (con ácidos grasos más saturados que los del resto de la bicapa), colesterol y proteínas, incluidos en las bicapas lipídicas de las membranas plasmáticas, que "flotan" libremente en una monocapa. Los lípidos incluidos en estas balsas tienden a empaquetarse y forman áreas con alto grado de ordenamiento y menor fluidez que el resto de la bicapa. El colesterol aumenta la densidad del empaquetamiento y minimiza el espacio vacío entre las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los lípidos de la balsa; al extraer el colesterol las balsas se disocian. Las proteínas incluidas son variadas, muchas de estas constituyen proteínas de anclaje de membranas, como la Src, la subunidad α de la proteína G y la sintasa de óxido nítrico (eNOS), entre otras. Estas balsas pueden coalescer y formar agregados mayores. Se plantea que su agregación responde a la activación (Fig. 20.8).

Las balsas lipídicas se relacionan con funciones celulares importantes, como interacciones selectivas proteínas-proteínas, formación y tráfico de membranas, proceso de transducción de señales, eventos relacionados con el crecimiento y la muerte celular, así como la asociación a la célula de parásitos, virus, bacterias y otros agentes patógenos.

Se ha descrito un subtipo de balsa lipídica, las caveolas, que constituyen pequeñas invaginaciones de la membrana y mantienen su estructura por la presencia de proteínas caveolinas, a las cuales deben su nombre. Existen diferentes tipos de caveolinas, muchas de las cuales se asocian a señales de transducción, por lo que se plantea que actúan como plataformas de señalización.

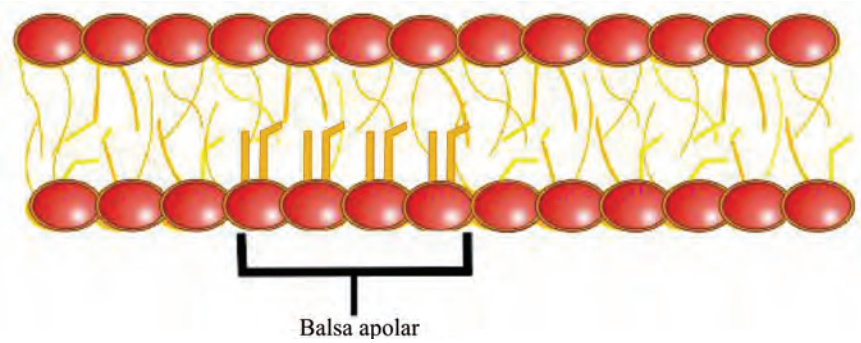


Fig. 20.8. Representación esquemática de una balsa lipídica. Estas constituyen dominios ricos en esfingolípidos, colesterol y determinadas proteínas, y participan en funciones celulares importantes, algunas de ellas relacionadas con la transducción de señales.

La membrana plasmática del eritrocito (Figs. 20.9, 20.10A y 20.10B) ha sido muy estudiada, debido a la relativa facilidad de su aislamiento y purificación; contiene 52 % de proteínas, 40 % de lípidos y 8 % de glúcidos en forma de oligosacáridos. La distribución de las proteínas en la bicapa también es asimétrica; las periféricas, que son más solubles, se encuentran en la cara citoplasmática; las externas están más asociadas con los lípidos. Las glicoproteínas se disponen en la cara externa o luminal. En el capítulo 63, el lector puede ampliar detalles al respecto.

Las proteínas transportadoras son proteínas integrales de membrana, tienen especificidad y se unen a la sustancia que se debe transportar. Los canales o poros son proteínas intrínsecas que crean un ambiente "polar" en su interior, debido a la conformación adoptada por sus niveles terciarios y cuaternarios, lo que permite la difusión de sustancias en ambos sentidos a través de la membrana.

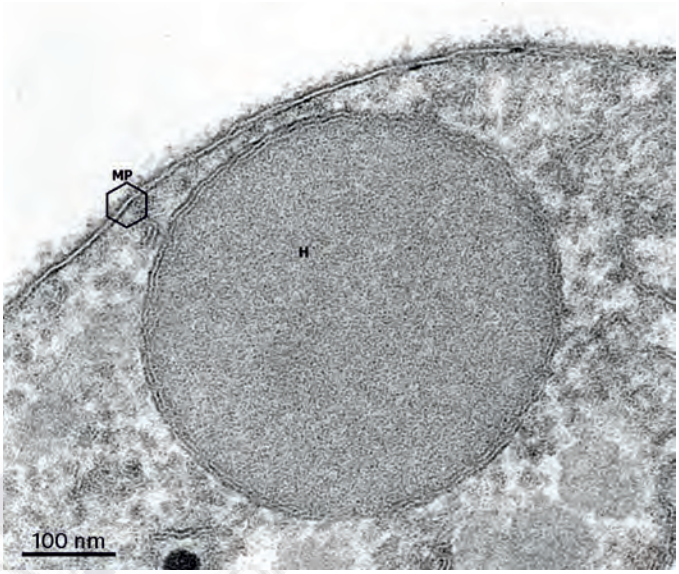


Fig. 20.9. Microfotografía electrónica de la membrana plasmática. Microfotografía electrónica de una trichomona. Se observa la estructura trilaminar de la membrana protoplasmática. En el interior de la célula se observa un hidrogenosoma. Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Marlene Benchimol, Profesora e Investigadora Titular, Universidad de Santa Úrsula, Río de Janeiro, Brasil.

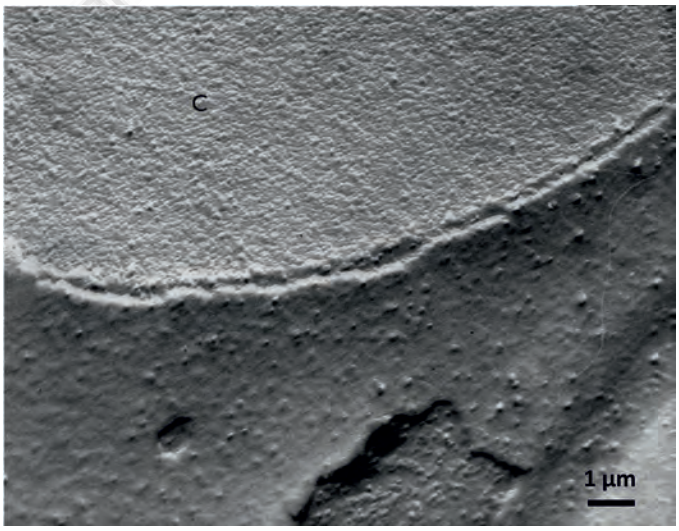


Fig. 20.10A. Microfotografía electrónica de eritrocito humano por la técnica de criofractura. Se puede apreciar la organización trilaminar de la membrana plasmática, constituida por dos láminas de proteína: una externa y otra interna, entre estas se encuentra una lámina constituida por lípidos. Cortesía del Dr. C. Juan B. Kourí Flores, Profesor e Investigador Titular del Departamento de Patología Experimental 3-D CINVESTAV y miembro del Sistema Nacional de Investigadores, México, D.F.

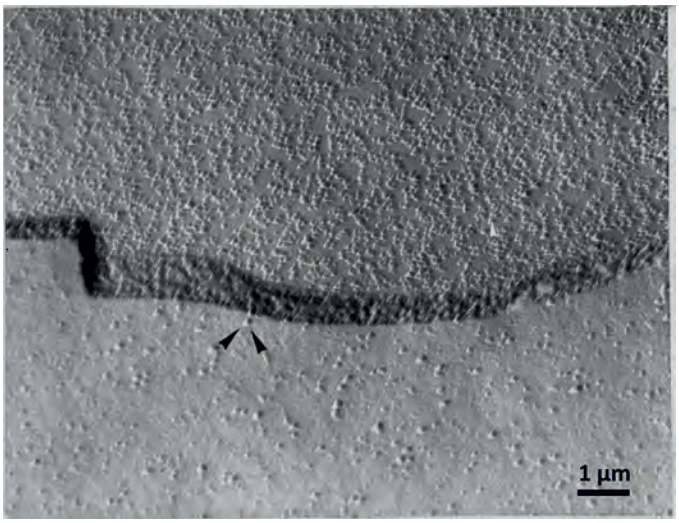


Fig. 20.10B. Microfotografía electrónica de eritrocito humano por la técnica de criofractura. A mayor aumento de la propia membrana plasmática se observan hileras de partículas que ocupan el espesor de la membrana. Las flechas indican una partícula de la lámina externa que entra en contacto con una cadena de partículas y atraviesa la membrana plasmática. Cortesía del Dr. C. Juan B. Kourí Flores, Profesor e Investigador Titular del Departamento de Patología Experimental 3-D CINVESTAV y miembro del Sistema Nacional de Investigadores, México, D.F.

Las sustancias se mueven a favor del gradiente. Aunque estas proteínas canales muestran determinada especificidad, no se unen a la sustancia que se debe transportar, y la selectividad parece más bien estar relacionada con el tamaño y la carga eléctrica de la sustancia transportada. El flujo a través del canal se controla por la regulación de su apertura y cierre.

Las proteínas receptoras son proteínas transmembranales cuya función especializada es constituir un eslabón fundamental en la comunicación intercelular. Estas captan algunas señales químicas del exterior y trasmiten información hacia el interior de la célula.

No todos los receptores son proteínas de membrana, pues en algunos casos la proteína receptora se encuentra en el interior de la célula y no forma parte de la membrana plasmática. Se hace referencia solo a los receptores de membrana. Estos, de acuerdo con sus respuestas ante las señales, pueden:

- Regular el paso de determinadas sustancias o iones a través de canales.
- Modificar la actividad de algunas enzimas.
- Provocar cambios de conformación y función de determinadas proteínas.
- Facilitar procesos de endocitosis.
- Inducir la transcripción de algún segmento del ADN.

La estructura de los receptores es muy variada, pueden estar formados por una cadena polipeptídica o constituir oligómeros más o menos complejos. En muchos casos se pueden distinguir tres dominios: uno extracelular, glicosilado, que se relaciona con el reconocimiento molecular de la señal química; otro, que atraviesa la membrana, y un tercero, intracelular, que se relaciona con la trasmisión de la información (Fig. 20.11).

El reconocimiento y la unión de la señal al dominio externo de la proteína receptora provoca un cambio conformacional en esta, el que se trasmite al dominio intracelular y desencadena el tipo de respuesta correspondiente. En el capítulo 59, en ocasión del estudio de la comunicación celular, el lector podrá ampliar este aspecto.

Las membranas plasmáticas de células animales poseen colesterol en cantidades elevadas, hasta una relación de 1:1 con los fosfolípidos. De igual forma, el contenido de oligosacáridos es relativamente elevado, al compararlo con el de otro tipo de membranas (Tabla 20.1).

Los glúcidos presentes en la membrana parecen tener importancia en las interacciones de las células, específicamente en el reconocimiento entre estas.

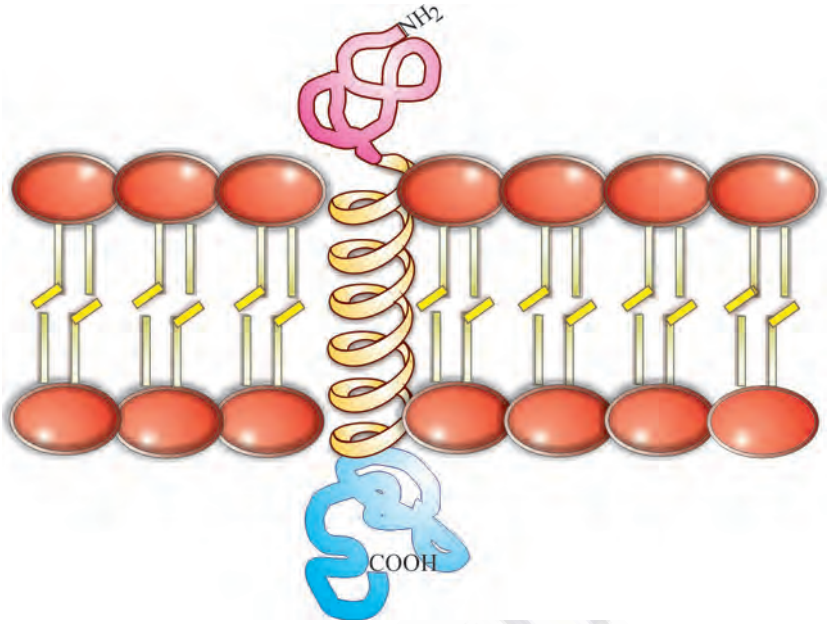


Fig. 20.11. Representación de un receptor de membrana. Estos receptores constituyen proteínas integrales, transmembranales. En el extremo amino terminal (violeta) se encuentra el dominio extracelular, frecuentemente glicosilado, donde se halla el sitio de reconocimiento para el ligando. El extremo carboxilo terminal, intracelular (azul), se relaciona con la transducción de la señal. Ambos extremos están unidos por el sector intramembranal (amarillo).

Tabla 20.1. *Composición aproximada de lípidos en distintas membranas celulares*

Tipo de lípido	MPH	MPE	MIE	MIT	RE
Colesterol	17	23	22	3	6
Fosfatidiletanol amina	7	18	15	35	17
Fosfatidilserina	4	7	9	2	5
Fosfatidilcolina	24	17	10	39	40
Esfingomielina	19	18	8	0	5
Glicolípidos	7	3	28	trz	trz
Otros	22	13	8	21	27

Nota: los valores se expresan en por cientos del peso total de lípidos.
Leyendas: MPH: membrana plasmática hepática. MPE: membrana plasmática del eritrocito. MIE: mielina. MIT: mitocondria. RE: retículo endoplasmático. trz: trazas.

A la zona externa de la membrana plasmática, abundante en glúcidos, se le denomina glicocálix. Con frecuencia se adsorben glicoproteínas y proteoglicanas, secretadas por la propia célula a esta cara externa de la membrana plasmática.

La cubierta celular está formada por polisacáridos. En las células vegetales la pared celular está constituida por celulosa y pectina. En algunas células animales está presente una capa de heteropolisacárido que rodea la membrana y forma la cubierta externa. Esta capa, aunque no tiene función en relación con la permeabilidad de la membrana, puede, sin embargo, actuar como filtro, por ejemplo, el ácido hialurónico, presente en el tejido conectivo, puede en alguna medida modificar la velocidad de difusión a través de la membrana.

Funciones de la membrana plasmática

Las membranas plasmáticas presentan un conjunto de funciones, entre estas:

– Delimitan la célula y la interrelacionan con otras.
– Presentan permeabilidad selectiva, permiten el paso libre de algunas sustancias e impiden el de otras, según el tamaño y la solubilidad de estas.

– Participan en los mecanismos mediante los cuales la célula secreta y expulsa sustancias al exterior.
– Contribuyen al mantenimiento del balance hidromineral de las células.
– Trasmiten ondas excitatorias a las células vecinas, como respuesta de algunas señales.
– Reciben señales del medio a través de las proteínas receptoras de membranas.
– Participan en el transporte selectivo de sustancias entre la célula y el medio.
– Incorporan grandes moléculas mediante el mecanismo de fagocitosis.
– Confieren especificidad antigénica a la célula.

Transporte de sustancias a través de las membranas

Por su naturaleza apolar, la bicapa lipídica de la membrana plasmática actúa como barrera impermeable para los iones y las moléculas polares, con la excepción del agua. El transporte de moléculas pequeñas a través de la bicapa lipídica se realiza mediante proteínas transmembranales especializadas; estas moléculas transportadoras son muy específicas y cada una acepta determinada molécula o grupo de ellas, muy relacionadas. El paso de moléculas mayores, como las macromoléculas, a través de las membranas se produce por los mecanismos de endocitosis y exocitosis, que serán estudiados en el capítulo 21. Algunas moléculas apolares sí son capaces de atravesar libremente la bicapa lipídica, ello depende de su solubilidad y tamaño.

Existen mecanismos diferentes relacionados con el paso de sustancias a través de las membranas: en algunos casos el paso se produce sin la intervención de transportador alguno (difusión simple y ósmosis); en otros, el paso ocurre con la participación de alguna proteína transportadora (transportes pasivo y activo) o que delimita un espacio por donde pasa la sustancia (poros o canales), y en otras ocasiones el paso ocurre por movimientos de la membrana que incluye a la sustancia que se debe transportar (endocitosis o exocitosis).

Difusión y ósmosis

La difusión simple constituye un mecanismo de paso de sustancia, en la que se trata de moléculas para las cuales la membrana plasmática es permeable, lo que le permite difundir, y la velocidad de difusión dependerá únicamente de la diferencia de concentración de dicho soluto, fuera y dentro de la célula, o sea, de su gradiente de concentración (Fig. 20.12).

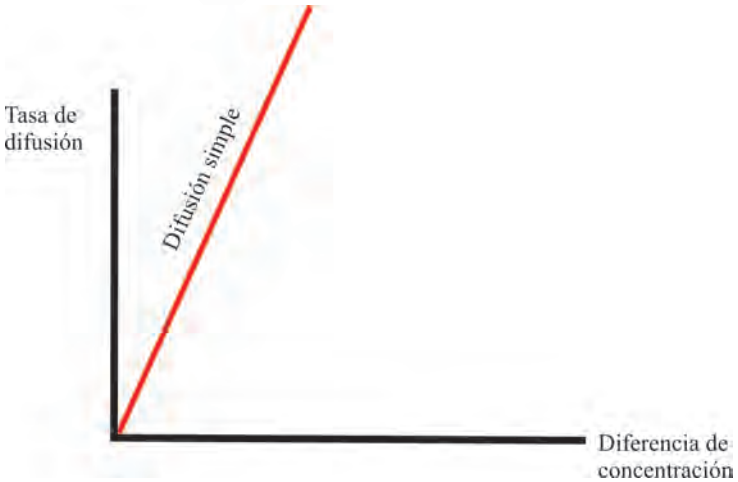


Fig. 20.12. Gráfico sobre la difusión simple donde se puede visualizar la línea recta que pone de manifiesto la proporcionalidad directa entre la velocidad de la tasa de difusión del soluto con la diferencia de concentración.

Este tipo de transporte se realiza a favor del gradiente y no requiere energía ni transportador, aunque en algunos casos participan proteínas que forman canales y permiten el paso de determinadas sustancias mediante el mecanismo de difusión simple (Fig. 20.13). Al igualarse las concentraciones de la sustancia transportada, fuera y dentro de la célula, el flujo neto se hace cero.

La ósmosis es un caso particular de la difusión simple, en el que lo que atraviesa la membrana es el líquido. Si en ambos lados de una membrana semipermeable existen dos soluciones de concentraciones diferentes de un soluto que no puede atravesarla, se produce el paso del solvente acuoso desde el lado donde se encuentra la solución más diluida hacia el de la más concentrada, hasta que ambas concentraciones se igualen.

Se conoce como presión osmótica la fuerza que hay que ejercer en el lado de la solución más concentrada (C_2) para impedir el paso del agua desde el lado de la solución más diluida (C_1) (Fig. 20.14).

La presión osmótica depende del número de partículas disueltas, por ello de la diferencia de concentración entre ambos compartimientos (C_1 y C_2). La adición de sustancias a las células debe ser de soluciones isotónicas (poseer concentración de partículas similar a la del líquido intracelular) para que no se produzca algún daño a la célula receptora.

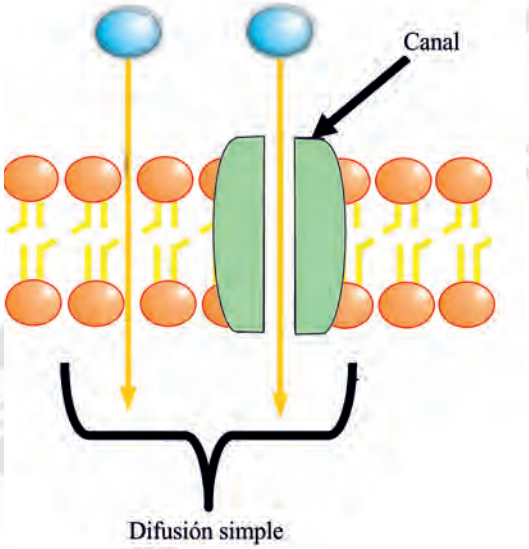


Fig. 20.13. Representación de la difusión simple típica para sustancias apolares que atraviesan la bicapa o en el caso de la existencia de canales formados por proteínas que crean un espacio que permite el paso de los solutos por el mecanismo de difusión simple.

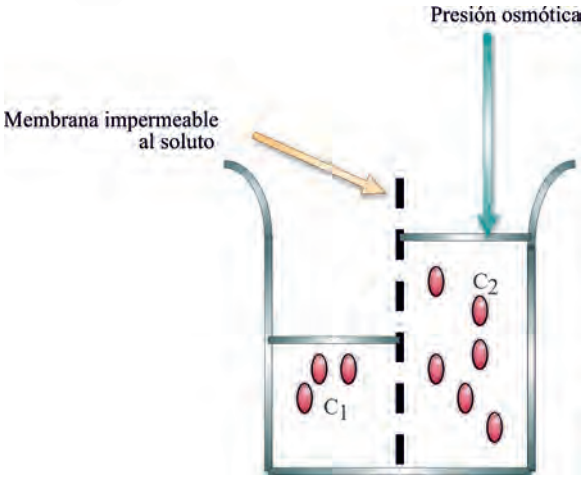


Fig. 20.14. Dos disoluciones de concentraciones diferentes del mismo soluto, separadas por una membrana semipermeable que permite el paso del solvente, pero no del soluto. El disolvente pasará del compartimento de menor concentración (C_1) al de mayor concentración (C_2), hasta que se igualen las concentraciones a ambos lados de la membrana; la columna del líquido sube en C_2 y baja en C_1. La presión que se debe ejercer en C_2 para impedir el ascenso de la columna de líquido se conoce como presión osmótica.

Si cualquier célula se sumerge en una sustancia isotónica en relación con el líquido intracelular, no habrá paso neto del líquido en ningún sentido y la célula se mantiene normal. Si la célula se sumerge en un líquido hipertónico (mayor concentración de partículas que el líquido intracelular), este último difunde hacia el exterior, la célula se deshidrata y se daña severamente; por el contrario, si la célula se sumerge en una sustancia hipotónica (menor número de partículas que el líquido intracelular), la sustancia hipotónica penetrará al interior de la célula por ósmosis, la célula aumentará su volumen y eventualmente puede romperse (Fig. 20.15).

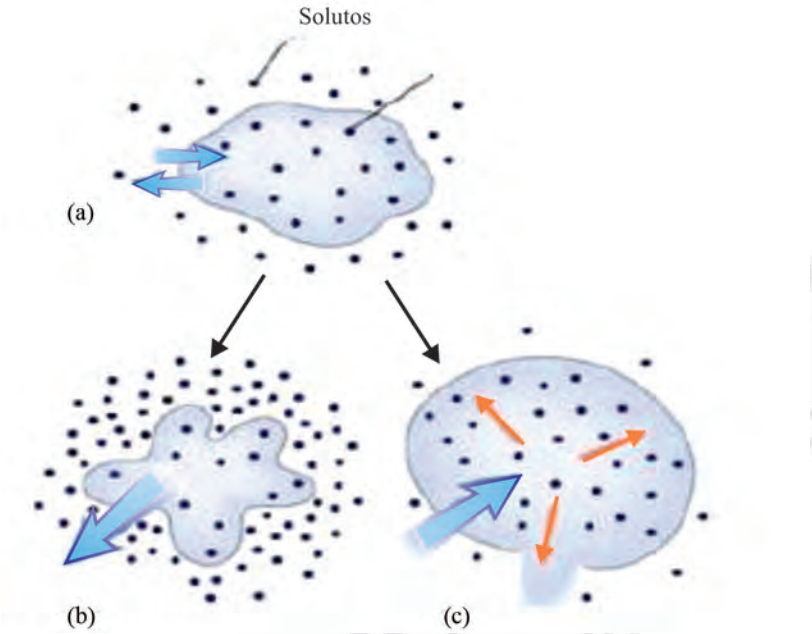


Fig. 20.15. Se muestran tres condiciones: (a) la célula se sumerge en una disolución isotónica con respecto al líquido intracelular, no hay paso neto del solvente y la célula se mantiene normal; (b) la célula se sumerge en una disolución hipertónica; el líquido intracelular sale de la célula y esta se deshidrata; (c) en esta situación la disolución es hipotónica, por ello el líquido entra a la célula, la que aumenta su volumen y puede romperse eventualmente.

Paso de sustancia a través de proteínas

Poros o canales. El paso de sustancia con la participación de proteínas puede ser por poros o canales y en este caso el mecanismo es similar al de difusión simple, como se ha señalado.

Los canales y los poros son proteínas transmembranales que delimitan espacios a través de los cuales se realiza el paso de algunas sustancias.

Los poros son menos selectivos y dejan espacios mayores, un ejemplo lo constituyen los poros de la envoltura nuclear. Los canales poseen mayor selectividad en cuanto a la sustancia que los atraviesa, esta selectividad parece estar relacionada con su tamaño y carga, ya que no presentan sitios de unión para ellas. A diferencia de los poros, que siempre se mantienen abiertos, la apertura y el cierre de los canales están regulados por determinados ligandos u otras señales, un ejemplo lo constituyen los canales del Na^+.

Paso del agua a través de las membranas biológicas

Acuaporinas (aquaporinas). Como se trató antes, el agua y otros iones pequeños pueden atravesar las membranas biológicas, especialmente cuando estas se encuentran en estado fluido. Aunque el agua puede difundir a través de las membranas celulares, este mecanismo no es suficientemente rápido y eficiente para garantizar los procesos fisiológicos; el mecanismo fundamental del paso del agua a través de las biomembranas

es mediante poros que regulan la entrada y salida de agua de las células, formados por las acuaporinas (aquaporinas). Estas últimas constituyen una familia de proteínas que se subdividen en dos grupos: las acuaporinas clásicas, que son selectivamente permeables al agua, y las acuagliceroporinas, que permiten el paso del agua y de otras moléculas de bajo peso molecular, como el glicerol y la urea.

Todas son proteínas transmembranales que están organizadas como homotetrámeros, en el que cada subunidad atraviesa seis veces la membrana y participa en la formación del poro (Fig. 20.16A), este poro tiene 2,8 Å de diámetro –mucho menor que cualquier ion hidratado– y presenta elevada afinidad y selectividad para el agua, que permite el paso de hasta 3×10^9 moléculas por segundo (Fig. 20.16B). A través del poro no puede pasar el agua protonizada (H^+_3O), debido a la barrera que forma la arginina 195 (R195), conservada en todos los miembros de la familia, y por otra barrera constituida por un fuerte dipolo que se localiza en el centro del poro y formado por dos segmentos con la secuencia asparagina-prolina-alanina (NPA); este dipolo reorienta las moléculas de agua al pasar, rompiendo las interacciones entre estas (Figs. 20.17A y 20.17B). La sustitución de la histidina 180 (H180), por ejemplo, por glicina, aumenta el diámetro del poro, como se verifica en las acuagliceroporinas, lo que permite el paso del glicerol y otras moléculas pequeñas, pero de mayor tamaño que el agua.

Las acuaporinas se encuentran presentes en casi todos los seres vivos, incluso en el ser humano, en el que se han descrito varios tipos de acuaporinas, distribuidas en los diferentes tejidos (Tabla 20.2).

Determinadas mutaciones u otras afecciones de las acuaporinas están relacionadas con diversas enfermedades como las cataratas, afecciones renales, diabetes insípida, falla cardíaca congestiva, colestasis y cirrosis hepática, edema cerebral, entre otras.

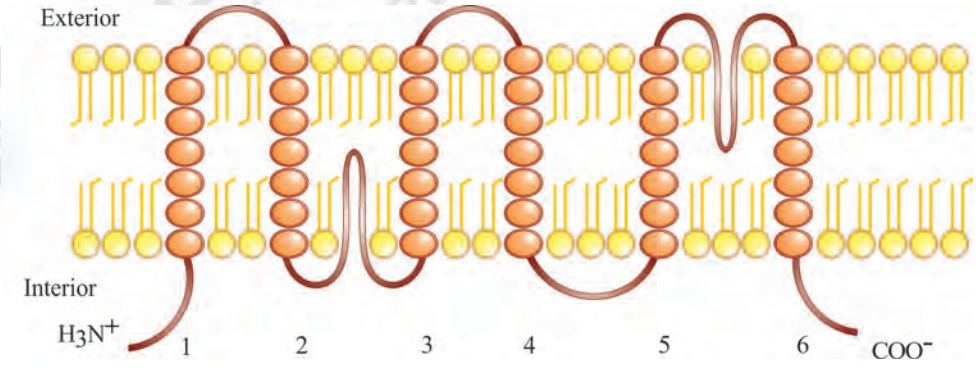


Fig. 20.16A. Estructura de las acuaporinas. Están formadas por proteínas transmembranales que atraviesan seis veces la membrana plasmática.

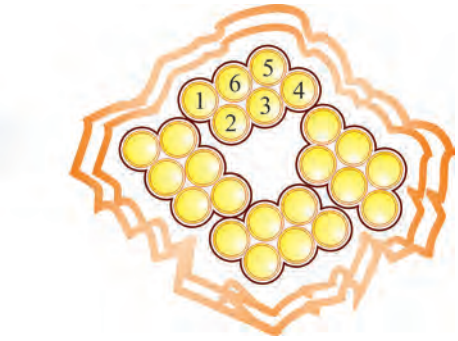


Fig. 20.16B. Estructura de las acuaporinas. Las proteínas se organizan como homotetrámeros y forman los poros con 2,8 Å de diámetro.

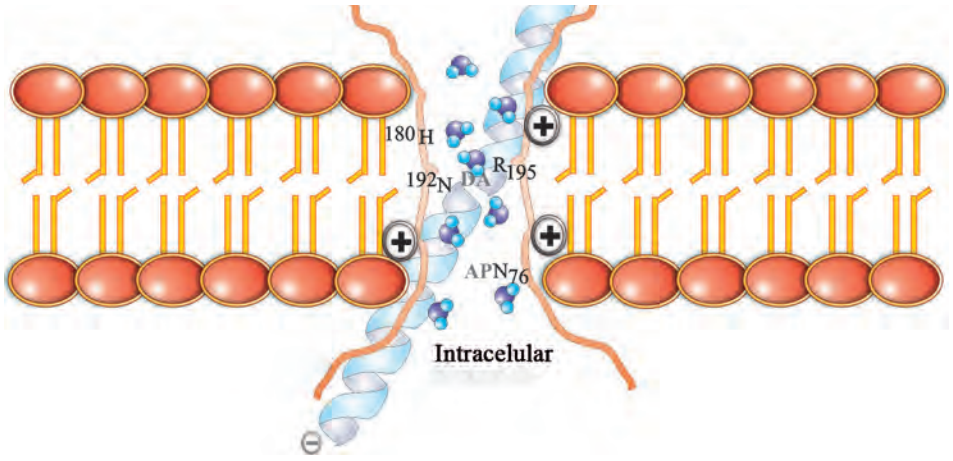


Fig. 20.17A. Paso del agua por las acuaporinas. En el canal se aprecia una barrera formada por la arginina 195 (R195) y otra en el centro del canal, formada por dos segmentos de asparagina-prolina-alanina (NPA), que reorienta las moléculas de H_2O y rompe las interacciones entre estas, e impide la entrada de H^+_3O.

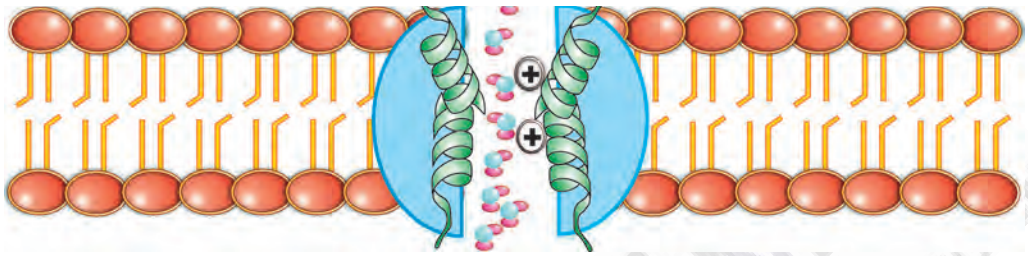


Fig. 20.17B. Paso del agua por las acuaporinas. Esquema simplificado de un poro de acuaporina, que presenta una elevada afinidad para el agua y permite el paso de 3×10^9 moléculas de agua por segundo.

Tabla 20.2. *Algunas características de diferentes acuaporinas presentes en el ser humano*

Tipo de acuaporina	Clasificación	Localización	Función	Regulación	Enfermedad asociada con su disfunción
AQP0	Acuaporina clásica	Células fibrilares del cristalino. Se denomina AQP0 por haber sido aislada antes que la AQP1, aunque no se había relacionado con las AQP	Proteína de adhesión entre células del cristalino	Activada por disminución del pH e inactivada por aumento de $[Ca^{2+}]$ intracelular	Cataratas de diferente gravedad
AQP1	Acuaporina clásica	La más abundante y parece ser la de expresión menos selectiva. Eritrocitos, túbulo proximal renal, asa de Henle, cristalino, córnea, en los epitelios y otras	Reabsorción renal del agua, secreción de humor acuoso en ojos y líquido cefalorraquídeo, homeostasis del agua en el pulmón, intercambio del fluido capilar	Estímulos locales y sistémicos, algunos provocados por corticosteroides	Edema cerebral, edema pulmonar, edema periférico, glaucoma

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Tabla 20.2. (Continuación)

Tipo de acuaporina	Clasificación	Localización	Función	Regulación	Enfermedad asociada con su disfunción
AQP2	Acuaporina clásica	Membranas apicales en los túbulos distales y colectores renales	Permeabilidad al agua en los túbulos colectores	Regulados por hormona antidiurética (ADH). Se encuentran en vesículas intracelulares y se traslocan a membranas por acción de esta hormona	Diabetes insípida nefrogénica
AQP3	Acuagliceroporina	Membranas basolaterales del túbulo distal renal asociada con la AQP2. También en vías aéreas, piel y ojo	Permeabilidad al agua de membrana basolateral. Permeable también al glicerol	Parece ser regulada por ADH, pero su presencia en membranas no depende de esta hormona. Inactivada por disminución del pH y puede que por fosforilación	
AQP4	Acuaporina clásica	La más abundante en el cerebro, células del tubo colector renal asociadas con AQP3	Transferencia de fluidos como respuesta al flujo de K^+, producción de líquido cefalorraquídeo	No sensible a ADH ni a otra hormona	Edema cerebral y otras situaciones relacionadas
AQP5	Acuaporina clásica	Membrana apical de células epiteliales de glándulas salivales, sudoríparas, lacrimales y epitelioalveolar del pulmón y corneal	Regular el flujo de agua hacia la luz glandular, secreción de dichas glándulas. Hidratación de la córnea	No se reporta	Asma, bronquitis crónica, síndrome de Sjögren
AQP6	Acuaporina clásica	Túbulo colector renal en células intercaladas, incluidas en vesículas asociada con bomba H^+- ATPasa, en otros tejidos epiteliales	Regulación del pH intracelular al controlar el flujo de agua como respuesta a flujos de protones y otros iones	Regulable por pH. Activada a bajas [H^+] e inhibida a altas [H^+]	No reportada

Tabla 20.2. (Continuación)

Tipo de acuaporina	Clasificación	Localización	Función	Regulación	Enfermedad asociada con su disfunción
AQP7	Acuaglice-roporina	Tejido adiposo, túbulo proximal renal, esperma-tocitos y otros	Permeable al glicerol. Parece participar en la salida del glicerol de tejido adiposo durante la lipólisis	No deter-minado aún	No reportada
AQP8	Acuaporina clásica	En membranas intracelulares, hallada en células epitelia-les del túbulo proximal renal, túbulo colector renal, íleon, colon, bronquios, glándulas salivales, hígado y testículo	Única acuaporina conocida con permeabilidad a la urea. Aún se estudia su función	Se ha demos-trado su traslo-cación a la membrana plasmática por el glucagón	No reportada
AQP9	Acuaglice-roporina	Hepatocitos y leucocitos	Permeable a glicerol y otros solutos de bajo peso molecular. Parece cons-tituir una ruta de entrada al glicerol durante la gluconeogé-nesis. Tal vez funcione en coordinación con la AQP7 del tejido adiposo	No se conoce, pero se cree que se active en condiciones en las que se favorecen la gluconeogénesis y la lipólisis	No reportada
AQP10	Acuaporina clásica	Hallada en duodeno y yeyuno	No se conoce su significa-ción funcional	No se conoce	No reportada

Transporte pasivo. Participan proteínas transmembranales, conocidas como permeasas (o translocasas). Este tipo de transporte se realiza también a favor del gradiente y se le denomina pasivo porque no requiere energía.

Las proteínas transportadoras reconocen la o las sustancias específicas transportadas por ellas; tienen un comportamiento similar a las enzimas en cuanto a su capacidad para saturarse, así como para experimentar inhibición de tipo competitiva. La diferencia fundamental con las enzimas es que no transforman su ligando.

En la figura 20.18 se observa la forma de actuar de una proteína transportadora en el caso de uniporte, esta presenta dos conformaciones; también se aprecia cómo el paso de una a otra resulta esencial para la realización de su función. En la figura 20.19 se puede observar la diferencia que existe en el comportamiento de la velocidad de transporte en el caso de la difusión simple y el transporte pasivo (o difusión facilitada).

El transporte puede ser uniporte si se traslada una única sustancia cada vez. Si se transporta más de una (2 en la figura) se denomina cotransporte, este a su vez se denomina simporte si ambas sustancias pasan en el mismo sentido y antiporte si lo hacen en sentido contrario (Fig. 20.20).

Transporte activo. Las proteínas que intervienen en el transporte activo se conocen como *bombas* y son proteínas transmembranales.

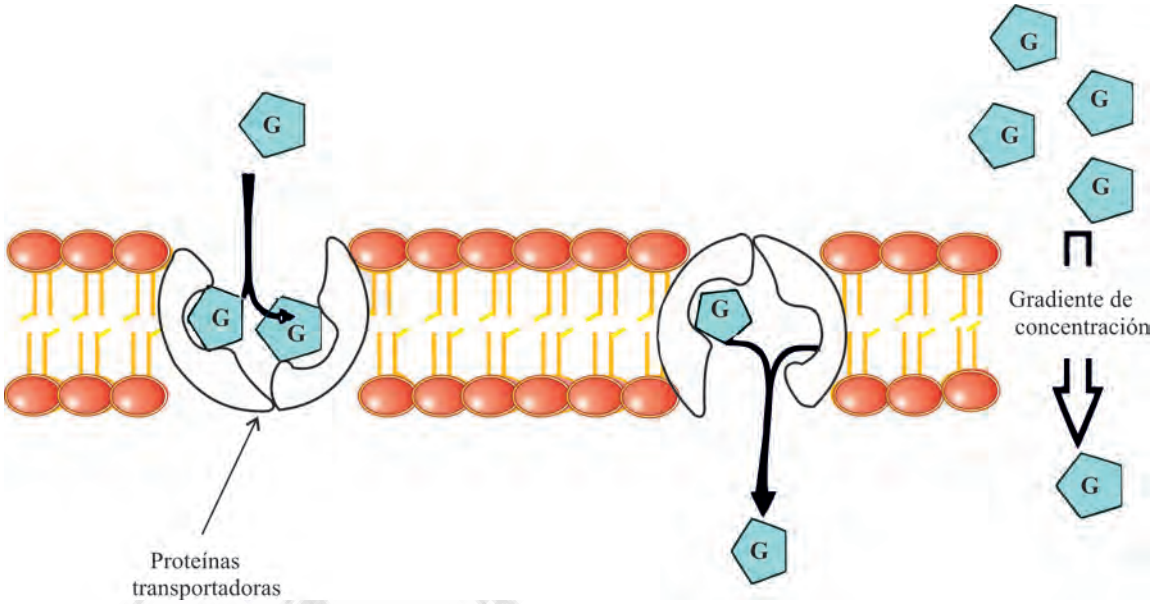


Fig. 20.18. Representación esquemática del mecanismo de transporte pasivo. La proteína transportadora (permeasa o translocasa) experimenta una transconformación que le permite desempeñar su función. La sustancia a transportar (G) se una a la permeasa por reconocimiento molecular y de este modo se incorpora al interior de la célula al recuperarse la conformación inicial. Este mecanismo experimenta el fenómeno de saturación, no requiere energía y el paso se realiza a favor del gradiente de concentración de G.

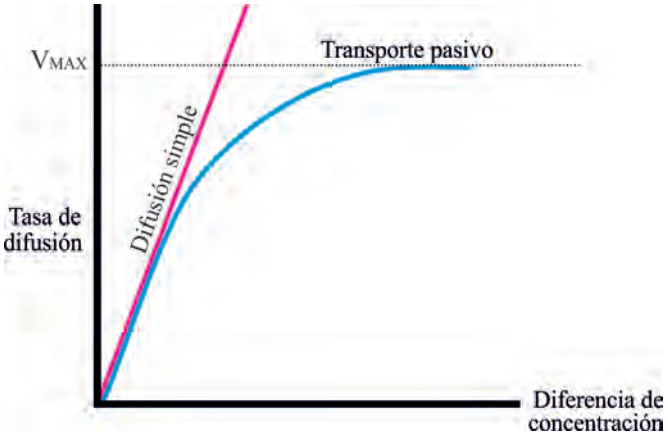


Fig. 20.19. Se presenta el gráfico que compara la cinética de difusión simple y del transporte pasivo. Se puede comprobar que en el caso del transporte pasivo se obtiene una hipérbola equilátera que tiende al valor de V_{Max}, el que corresponde a la velocidad de la tasa de difusión cuando la permeasa está saturada del soluto que transporta. Se define también un valor de K_M, que se relaciona con la afinidad de la permeasa por la sustancia que transporta. Este mecanismo muestra un comportamiento similar al de la cinética enzimática, aunque en el caso del transporte la sustancia no experimenta transformación alguna, contrario a lo que sucede en la reacción enzimática.

La concentración de iones y otros solutos en el interior y exterior de las células es diferente (Tabla 20.3); esta diferencia es esencial en el mantenimiento de un potencial energético, debido a la existencia de un gradiente de concentración y a la diferencia de cargas eléctricas, lo que condiciona el potencial electroquímico, este último está ligado a procesos fundamentales como la generación del impulso nervioso, la contracción muscular y la síntesis de ATP. El mantenimiento de la concentración iónica diferente (dentro y fuera de la célula) se garantiza por la existencia del transporte activo.

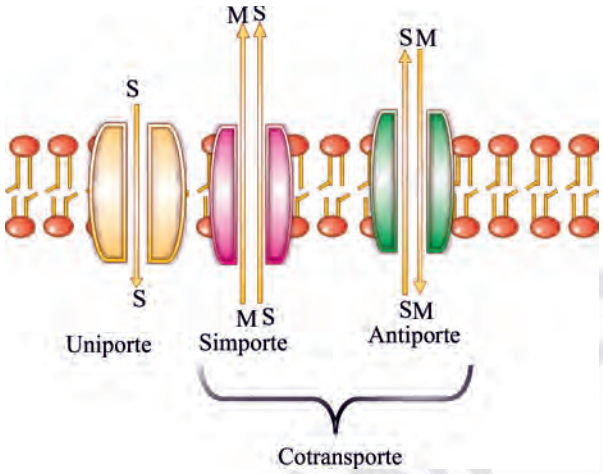


Fig. 20.20. En el esquema se resumen las posibilidades del transporte. Uniporte, en caso del transporte de una única sustancia. Cotransporte, si se transportan varias sustancias: en este último caso si las sustancias se transportan desde y hacia el mismo lado, se denomina simporte y en caso de que el transporte sea en sentido opuesto, se conoce como antiporte.

Tabla 20.3. *Concentración iónica (mEq.L^{-1}) dentro y fuera de la membrana celular, en mamíferos*

Componente	Concentración intracelular	Concentración extracelular
Cationes		
Na^+	5-15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	30	1-2
Ca^{2+}	1-2	2,5-5
H^+	4×10^{-5}	4×10^{-5}
Aniones		
Cl^-	4	110

Nota: también constituyen aniones numerosas proteínas, los ácidos nucleicos y otras sustancias.

El transporte activo se realiza en contra del gradiente de concentración, por lo cual requiere energía.

Un ejemplo típico y muy estudiado lo constituye la enzima adenosintrifosfatasa dependiente de Na^+ y K^+ (ATPasa Na^+-K^+ dependiente), esta enzima constituye una bomba que utiliza la energía de hidrólisis del ATP para extraer tres iones Na^+ hacia el espacio extracelular e incorporar dos iones K^+ hacia el interior de la misma célula (Fig. 20.21).

La bomba posee acción quinásica, mediante la cual se le une un grupo fosfato donado por el ATP, esto condiciona el cambio conformacional que le permite ejercer su función; posteriormente, por su acción fosfatídica se separa el grupo fosfato y retorna a su conformación inicial.

La bomba de Na^+-K^+ contribuye a regular el volumen celular, ya que coopera para mantener la concentración de solutos dentro y fuera de la célula, donde las macromoléculas y otros compuestos cumplen funciones importantes.

El transporte activo puede ser primario o secundario (Fig. 20.22). En el primer caso, el transporte de la sustancia S se produce directamente, al hidrolizarse el ATP; en tanto que en el segundo caso la hidrólisis del ATP provoca el flujo de un ion u otra molécula (M en la figura) y el incremento de la concentración de esta última es el que impulsa el paso de la sustancia S.

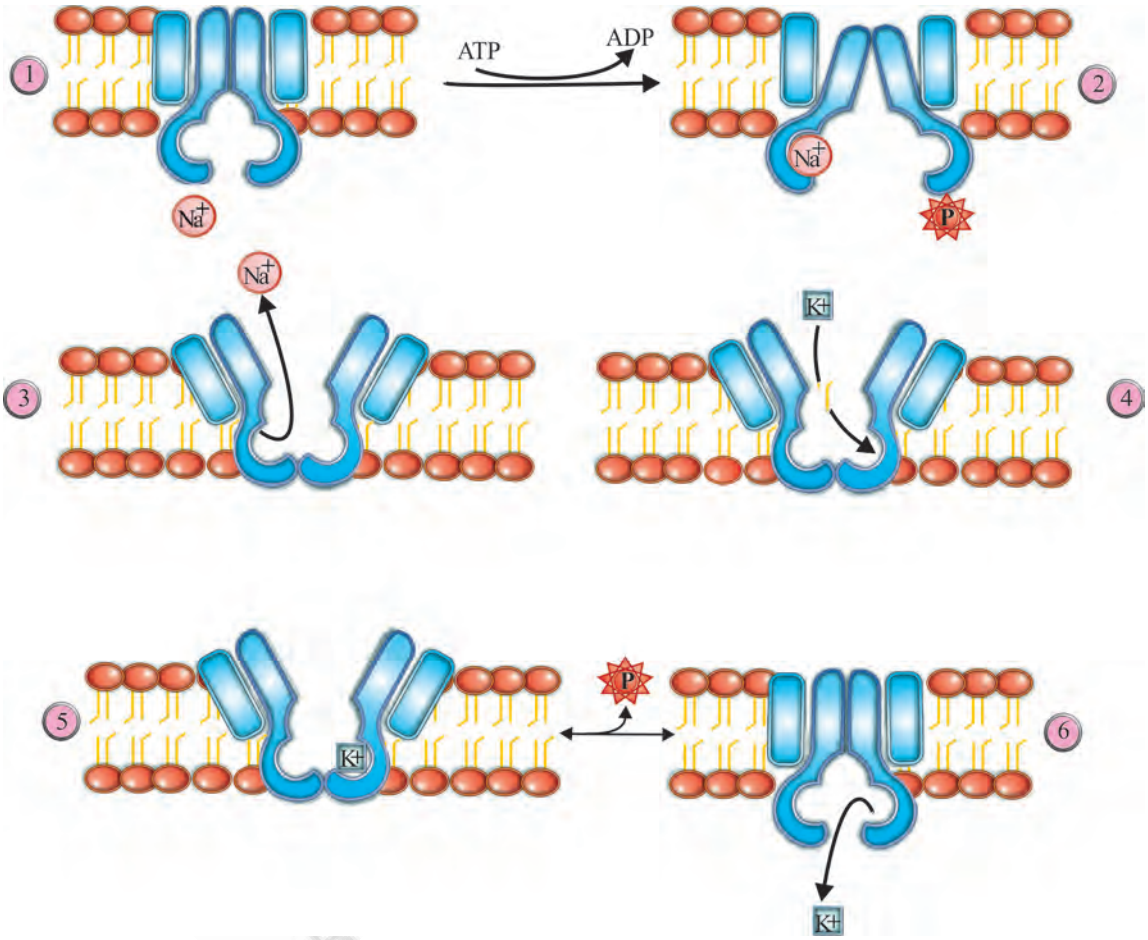


Fig. 20.21. Bomba ATPasa dependiente de Na^+-K^+ (bomba Na^+-K^+). La bomba, por su acción quinásica, capta un grupo fosfato donado por el ATP, lo que le permite cambiar su conformación para cumplir su función, transporte de tres iones Na^+ hacia el espacio exterior y de dos iones K^+ hacia el interior. La acción fosfatásica de la bomba garantiza que esta pierda el grupo fosfato y retorne a su conformación inicial.

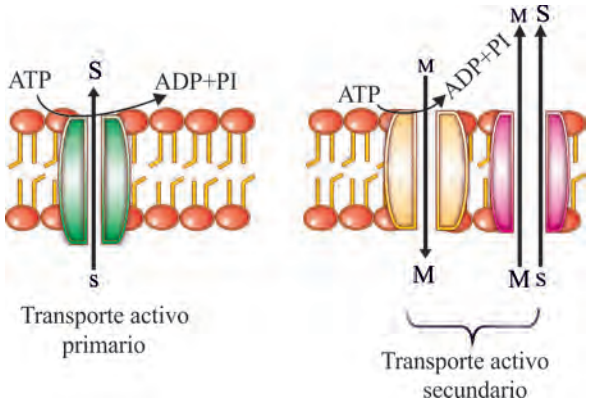


Fig. 20.22. Comparación entre el transporte activo primario y secundario. En el primer caso (a la izquierda) el consumo de energía se utiliza directamente para el transporte de S, en contra de su gradiente; en el transporte activo secundario (a la derecha) el consumo de ATP transporta a M en contra de su gradiente y aumenta su concentración a ese lado de la membrana y es M la que, por simporte, permite el paso de S hacia el otro lado de la membrana.

Potencial de membrana en reposo

El potencial de membrana en reposo es la diferencia de potencial eléctrico a través de la biomembrana, donde el interior es negativo con respecto al exterior.

Esto se debe a los canales de salida de K^+ de la célula, al funcionamiento de la bomba ATPasa Na^+-K^+ dependiente, ya que provoca en su acción un desbalance instantáneo de cargas por la salida de tres iones de sodio y la entrada de dos iones de potasio. A esta diferencia contribuye, además, la presencia de proteínas aniónicas de forma predominante en el interior de la célula.

La diferencia de potencial entre el exterior y el interior de las células oscila de -20 a -200 mV y el valor en muchos tejidos, como el nervioso, es de -70 mV.

Si por alguna causa, como pudiera ser la entrada de iones de sodio al interior de la célula, la diferencia de potencial se hace menor, se produciría una despolarización. Por el contrario, si la entrada de iones cloruro (Cl^-) o la salida de iones positivos provoca un aumento de la diferencia de potencial respecto al valor de reposo, sucede una hiperpolarización. Estos cambios de los valores de potencial en las células excitables se relacionan con la trasmisión del impulso nervioso (capítulo 64) y otros procesos fisiológicos.

Diferenciación de la membrana plasmática

La membrana plasmática de algunas células experimenta diferenciaciones relacionadas con su especialización, ello permite que cumplan mejor su función; de esta manera se pueden encontrar las diferenciaciones que hacen posible la unión o adherencia con otras células, como los desmosomas o *nexus*, o la disposición característica de la membrana plasmática de las células de la mucosa intestinal y del túbulo proximal renal; en estos últimos casos se comprueba la presencia de abundantes proyecciones finas del citoplasma, cubiertas por la membrana plasmática, denominadas microvellosidades (Fig. 20.23), que aumentan considerablemente la superficie de absorción efectiva, aspecto fundamental en la función de dichas células.

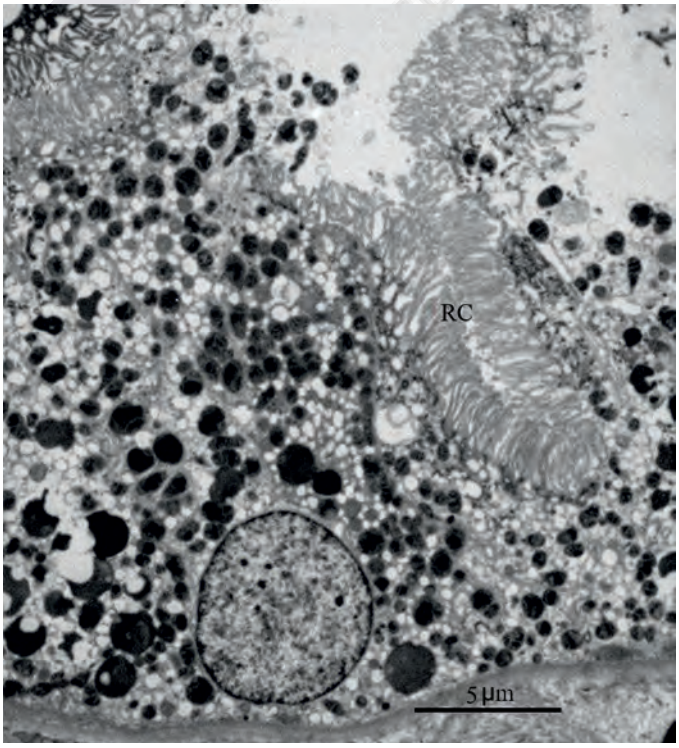


Fig. 20.23. En la microfotografía se puede observar el ribete en cepillo (RC) de un túbulo proximal renal. Las microvellosidades incrementan notablemente la superficie de absorción. Cortesía de la Dra. en Ciencias Médicas, Lucía González, Profesora e Investigadora Titular del Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch", La Habana, Cuba.

Resumen

Las membranas biológicas son organizaciones supramoleculares, flexibles y fluidas, formadas fundamentalmente por lípidos y proteínas en proporciones variables, según el tipo de célula y la localización intracelular de la membrana.

Además de lípidos y proteínas, las membranas animales suelen tener determinados tipos de glúcidos en su composición, los lípidos presentes en estas estructuras se caracterizan por ser anfipáticos y se organizan formando bicapas que constituyen la estructura básica de las membranas.

Las proteínas pueden ser extrínsecas o intrínsecas, de acuerdo con su ubicación en las superficies o en el interior de la bicapa, respectivamente. Las intrínsecas son más abundantes y entre estas se encuentran numerosas enzimas, las proteínas transportadoras y los receptores de membranas.

Los glúcidos se encuentran unidos a proteínas o lípidos, formando glicoproteínas o glicolípidos, se localizan hacia la cara externa o luminal de las membranas y contribuyen a la orientación de las proteínas.

La membrana plasmática está formada por una doble capa continua y delgada, que delimita a la célula y permite que esta se relacione con el medio; por fuera de la membrana plasmática existe una cubierta celular que la cubre y protege. Las funciones de esta membrana son variadas, pero el paso selectivo de sustancias es una de las funciones más importantes.

La bicapa lipídica resulta permeable a las moléculas apolares e impermeable a los iones y moléculas polares. La incorporación de macromoléculas a través de las membranas se produce por el mecanismo de endocitosis que será objeto de estudio en el capítulo 21.

Los mecanismos de transporte de sustancia a través de la membrana son de tres tipos: difusión simple, transporte pasivo y transporte activo. En el primer caso no se requiere transportador ni energía y el paso del soluto se realiza a favor del gradiente. El transporte pasivo se realiza también a favor del gradiente de concentración, pero se requiere la presencia de una proteína transportadora, aunque no se necesita energía. El transporte activo requiere la participación de algunas proteínas, conocidas como bombas, que funcionan con consumo de energía; el paso de sustancia en este caso se realiza en contra del gradiente de concentración, un ejemplo típico de este tipo de transportador lo constituye la ATPasa Na^+-K^+ dependiente.

Las membranas plasmáticas experimentan diferenciaciones relacionadas con la especialización celular, que le permiten a la célula realizar de manera más eficiente su función.

Ejercicios

1. ¿Por qué las membranas biológicas constituyen estructuras supramacromoleculares?
2. Enumere los componentes fundamentales de las membranas biológicas y explique las proporciones en que ellos se encuentran.
3. ¿Cuál es la propiedad común que tienen los lípidos presentes en las membranas biológicas y diga por qué esta propiedad es fundamental para constituir la estructura básica de las membranas?
4. Enumere los distintos tipos de lípidos y explique cómo se disponen en las membranas.
5. Explique el paso del estado gel al estado fluido de las biomembranas y refiérase a sus causas y consecuencias.

6. Cite los distintos tipos de proteínas presentes en las membranas biológicas y explique las diferencias entre ellas.
7. Mencione las distintas funciones que cumplen las proteínas en la membrana plasmática.
8. Explique la importancia del carácter informacional en la realización de las funciones de las proteínas de membrana.
9. Explique la disposición de los glúcidos en la membrana plasmática.
10. Describa la estructura general y refiérase a la función de las acuaporinas.
11. Cite las funciones de la membrana plasmática.
12. Establezca una comparación entre la difusión simple y el transporte pasivo en relación con requerimientos energéticos, necesidad de proteína transportadora y dirección del flujo de sustancia.
13. Establezca una comparación entre los transportes activo y pasivo. Refiérase a los tres aspectos indicados en el ejercicio número 12.
14. Exprese la diferencia entre el transporte activo primario y el secundario.

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Organelos membranosos intracelulares

Entre las características que distinguen una célula eucariota típica, junto con la presencia de un núcleo bien delimitado, se encuentra el hecho de que estas células poseen, además de la membrana plasmática, un complejo sistema de membranas internas denominado sistema de endomembranas.

Este complejo sistema parece ser imprescindible para el mantenimiento de la actividad vital de las células que tienen un volumen relativamente grande. El sistema de endomembranas está ausente en las pequeñas células procariotas.

La extensión del sistema de endomembranas se deduce cuando se conoce que, en las células eucariotas típicas, estas endomembranas representan de 95 % a 98 % de todas las membranas celulares, de modo que la membrana plasmática que rodea la célula solo es una pequeña fracción del total de estas.

Las endomembranas no son homogéneas, presentan un grado definido de diferenciación y especialización que implica la formación de organelos subcelulares, distinguibles desde los puntos de vista estructural y funcional, por lo que resulta muy válido estudiar estos componentes celulares bajo la denominación de organelos membranosos internos (Fig. 21.1).

Tipos de organelos membranosos internos

Los organelos membranosos internos de las células eucariotas son: retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas, mitocondrias, membrana nuclear y cloroplastos.

El retículo endoplasmático constituye la mayor fracción del sistema de endomembranas, representa de 50 % a 70 % de las membranas internas, posee dos variedades: el retículo endoplasmático liso y el retículo endoplasmático rugoso.

El aparato de Golgi representa entre 5 % y 10 % del total de las endomembranas, mientras que los lisosomas y los peroxisomas representan menos del 1 %.

Estos cuatro organelos membranosos se estudian detalladamente en este capítulo, las mitocondrias y la membrana nuclear se tratarán en demás capítulos, las primeras se estudiarán en la respiración celular (sección VI) y la segunda cuando se estudie el núcleo celular (capítulo 23).

Los cloroplastos son organelos membranosos típicos de las células vegetales (capítulo 45).

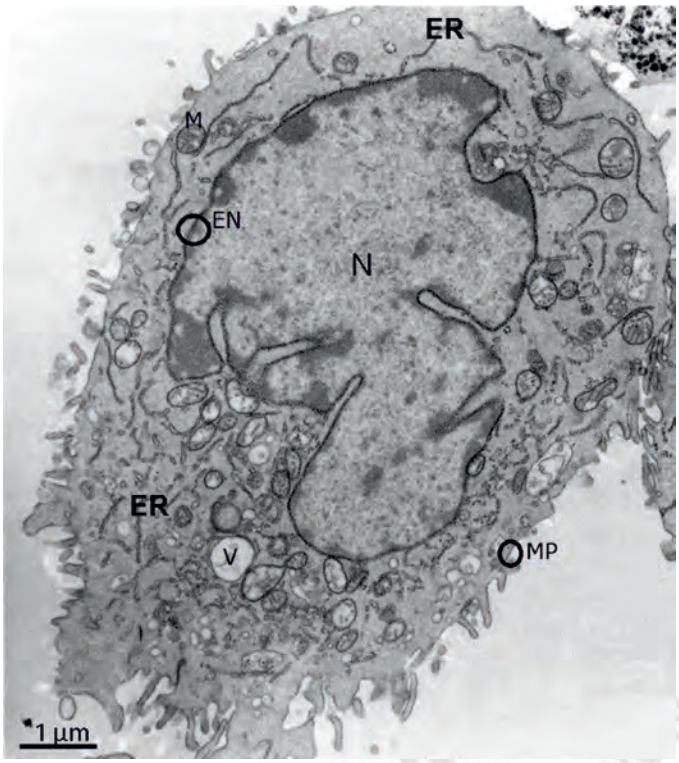


Fig. 21.1. Célula eucarionte (hepatocito) vista a través del microscopio electrónico de trasmisión. Obsérvense en el interior celular varias estructuras de aspecto membranoso: núcleo (N); envoltura nuclear (EN); retículo endoplasmático (RE); mitocondria (M); vacuola (V) y membrana plasmática (MP). Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Profesora e Investigadora Titular, Marlene Benchimol, Universidad de Santa Úrsula, Río de Janeiro, Brasil.

Estructura general de las endomembranas

Si bien la composición exacta de cada una de las membranas que integran los organelos membranosos intracelulares difiere de uno a otro, todos ellos presentan una estructura general común que se representa mediante el modelo de mosaico fluido. Esto significa que las membranas intracelulares muestran una doble capa de lípidos donde se encuentran diferentes proteínas; estos constituyentes se mantienen unidos mediante interacciones débiles. Las diferencias de composición se refieren al tipo y proporción de los diferentes lípidos de la bicapa y a las proteínas que están asociadas.

Los organelos membranosos internos de la célula se distinguen, además, por la forma de organizarse en el espacio intracelular.

Algunos organelos membranosos, como las mitocondrias, presentan en su estructura una doble membrana, pero la mayoría posee una sola. Todas estas diferencias de los organelos membranosos se relacionan con la función que desempeñan en el metabolismo celular.

Funciones generales de los organelos membranosos

Aunque cada organelo membranoso realice funciones propias, algunas son comunes a todos ellos:

– Compartimentación: el sistema de endomembranas divide el espacio celular en compartimientos, a su vez mantiene separadas diferentes sustancias que participan en el metabolismo, como las enzimas, los sustratos y los cofactores; esto hace que cada organelo membranoso constituya un reducto metabólico casi independiente del resto de la célula, lo que posibilita que en una célula puedan ocurrir, de manera simultánea, procesos metabólicos incompatibles de producirse en un mismo compartimiento.

– Establecimiento de gradientes de concentración: el carácter semipermeable de las membranas biológicas posibilita que a través de ellas se establezcan gradientes de concentración de diferentes sustancias, estos gradientes de concentración representan determinada energía potencial que puede manifestarse en diversas funciones celulares.
– Disponibilidad de superficie: muchas funciones celulares solo pueden realizarse en las membranas o a través de ellas. Los organelos membranosos proveen extensas superficies donde se producen diferentes reacciones metabólicas, y a través de estas áreas se lleva a cabo el intercambio de sustancia entre compartimientos.
– Incremento de las velocidades de los procesos metabólicos: en relación con los dos aspectos anteriores se encuentra la función general de las endomembranas, de acelerar la velocidad con que pueden ocurrir en el interior de las células, determinados procesos dependientes de la difusión de sustancias. La compartimentación reduce los espacios intracelulares, donde los sustratos deben difundir para interactuar con las enzimas que los transforman; por otra parte, muchos sustratos difunden en las dos dimensiones determinadas por las membranas, lo cual incrementa de manera extraordinaria la velocidad con que acceden a los sitios activos de enzimas localizadas en la propia membrana.
– Generación de nuevas membranas: hasta donde se conoce, las membranas biológicas solo se forman por el crecimiento de membranas preexistentes. El sistema de endomembranas provee un soporte que posibilita el crecimiento de las propias membranas, lo cual resulta imprescindible para el crecimiento y la multiplicación celulares.

Relaciones entre los organelos membranosos

La diferenciación de los organelos membranosos y su delimitación de compartimentos celulares separados, no implican que los organelos sean totalmente independientes. Los organelos membranosos establecen importantes relaciones estructurales y funcionales entre sí; estas ocupan un área de intensa investigación en la actualidad.

Retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático es el organelo membranoso más abundante en la mayoría de las células eucariotas, gran parte del interior celular se encuentra ocupado por el conjunto de membranas que componen este organelo.

En las secciones celulares preparadas para obtener imágenes de microscopia electrónica, el retículo endoplasmático aparece como un conjunto de espacios muy aplanados, rodeados por una membrana; se considera que este organelo es un enorme saco membranoso único, muy replegado y comprimido, conectado también por finos tubos (Fig. 21.2).

El espacio encerrado dentro del retículo endoplasmático constituye un compartimiento intracelular independiente y suele denominarse *lumen* o *espacio cisternal*.

La separación entre las membranas del retículo endoplasmático es de 20 a 30 nm, este también presenta continuidad con la membrana nuclear externa y en él se distinguen dos porciones diferentes, tanto desde el punto de vista estructural como funcional.

El retículo endoplasmático *rugoso* se caracteriza por presentar gran cantidad de ribosomas, unidos a la cara externa de sus membranas, lo que le da el aspecto que origina su denominación; su organización es en forma de sacos aplanados y apilados, denominados cisternas (Fig. 21.3).

El retículo endoplasmático rugoso está presente en todas las células nucleadas, pero es mucho más abundante en células secretoras que sintetizan proteínas, las que luego son exportadas al exterior de la célula.

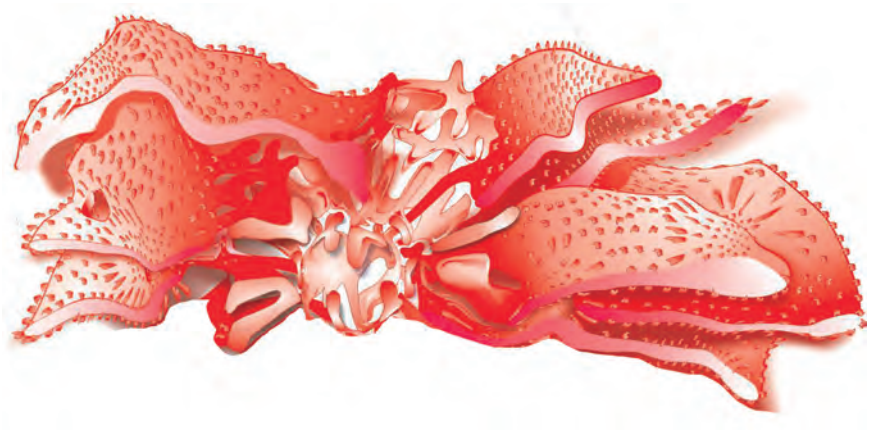


Fig. 21.2. Esquema del retículo endoplasmático. Se distinguen porciones con aspecto de sacos aplanados, mientras en otras zonas existen tubos membranosos finos que interconectan los anteriores.

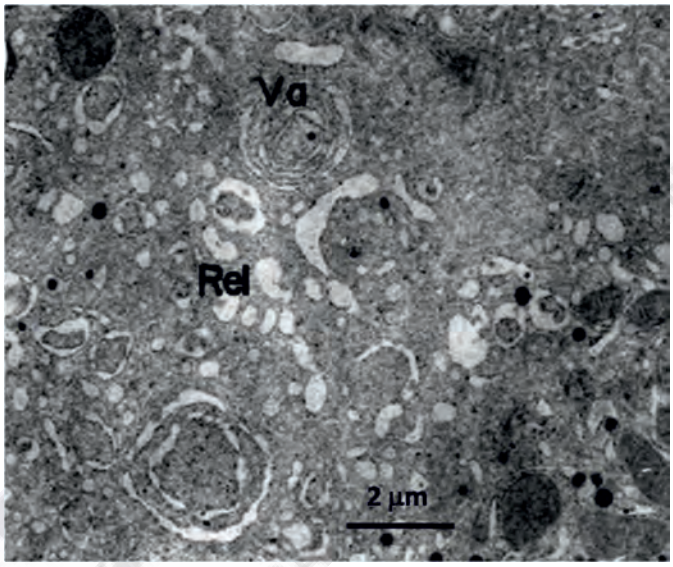


Fig. 21.3. Microscopia electrónica de transmisión, de biopsia hepática de persona sana. Se detectan el núcleo (N) y el citoplasma dentro de límites normales. Se señalan el retículo endoplasmático rugoso (RER) y las mitocondrias (m). Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Viviana Falcón Cama, Profesora e Investigadora Titular, Departamento de Microscopia Electrónica, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

El retículo endoplasmático *liso* es la continuación del rugoso y representa porciones del retículo endoplasmático, desprovistas de ribosomas; se organiza en forma de finos tubos interconectados con las cisternas del retículo endoplasmático rugoso; es muy abundante en las células que sintetizan lípidos de forma activa, aunque en general representa solo una pequeña fracción del retículo endoplasmático (Fig. 21.4).

El término "microsoma", que aparece con frecuencia en textos de Bioquímica, se utiliza para denominar pequeñas vesículas que se originan por fragmentación y sellaje del retículo endoplasmático, al someter las células a diferentes técnicas de homogeneización. Según la porción del retículo endoplasmático donde se originan, se formarán microsomas rugosos o lisos que pueden ser separados mediante centrifugación.

Aunque estos microsomas no conservan toda la estructura del retículo endoplasmático, han resultado muy útiles en el estudio de algunas características de este organelo membranoso.

La función del retículo endoplasmático rugoso es fundamentalmente la síntesis de proteínas –en especial glicoproteínas. Las proteínas se sintetizan en los ribosomas que tapizan la superficie externa del retículo endoplasmático rugoso; hoy se sabe que estos ribosomas unidos a este retículo son idénticos a los que se encuentran libres en la célula.

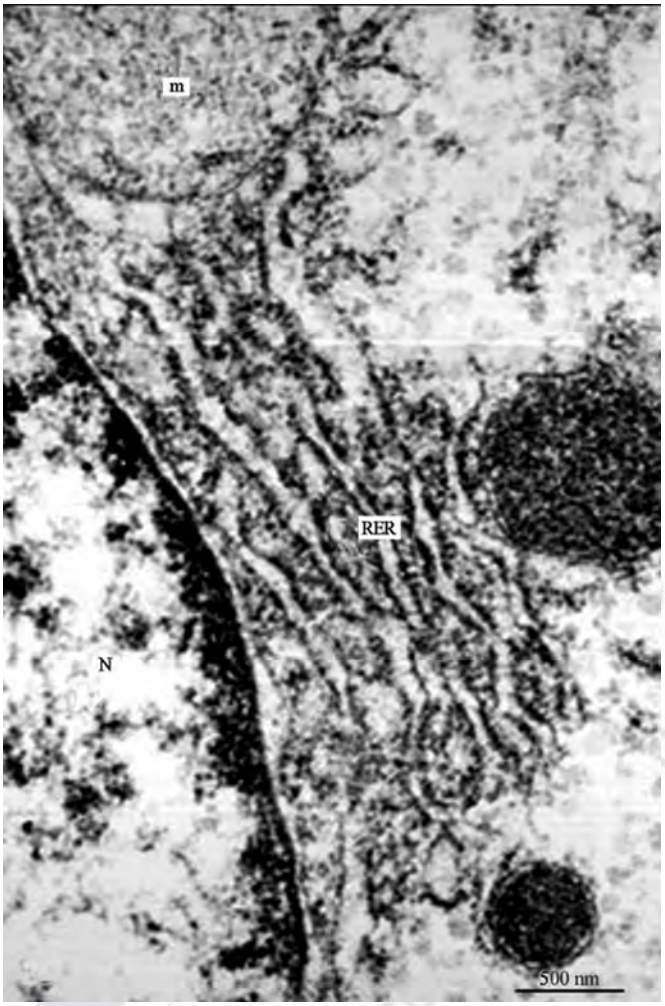


Fig. 21.4. Hepatocito de rata tratada con galactosamina. REL: vacuola de retículo endoplasmático liso; Va: vacuola autofágica. Cortesía de la MSc. Sandra Rodríguez Salgueiro, Laboratorio de Microscopia Electrónica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

En la actualidad se considera que la mayoría o todas las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso comienzan su síntesis en los ribosomas libres, pero una vez formado el péptido señal (capítulo 30), una "partícula reconocedora de señal" se une a este e impide la continuación de la síntesis. Esta partícula interviene también en el reconocimiento de receptores específicos en la superficie externa del retículo endoplasmático rugoso. Una vez unido el ribosoma a la membrana, la unión se estabiliza y la síntesis proteínica continúa.

Esta síntesis de proteínas ocurre de modo que la cadena polipeptídica en crecimiento surge hacia el espacio del lumen o bien queda incorporada a la membrana (incorporación cotraduccional) (Fig. 21.5).

Además del proceso biosintético descrito, se sabe que algunas proteínas sintetizadas en los ribosomas libres pueden ser incorporadas a las membranas del retículo endoplasmático rugoso y a otros organelos membranosos (incorporación postraduccional); para estos casos existen evidencias muy claras de que hay secuencias señales específicas y de que, al menos en algunos de ellos, el proceso requiere el consumo de energía (Tabla 21.1).

Se plantea que posiblemente todas las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso experimentan un proceso de glicosilación; no existe un acuerdo de que este proceso de glicosilación se inicie en el retículo endoplasmático rugoso, o sea, privativo del aparato de Golgi.

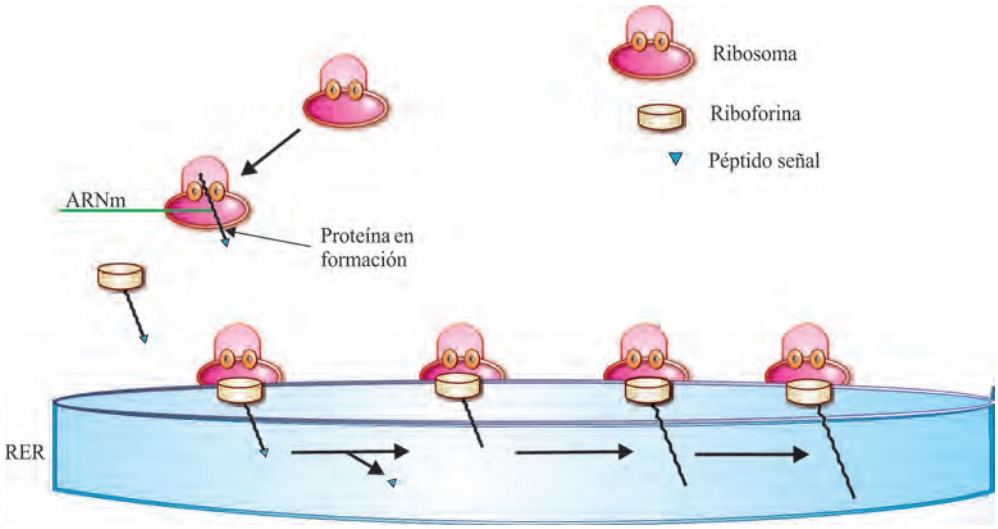


Fig. 21.5. Síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso. La síntesis comienza en ribosomas libres, pero una vez formado el péptido señal, el complejo se une a la superficie externa del retículo endoplasmático y la unión se estabiliza por proteínas específicas, posteriormente la síntesis de proteínas continúa.

Tabla 21.1. *Secuencias aminoacídicas implicadas en la incorporación a algunos organelos de proteínas sintetizadas en los ribosomas libres del citosol*

Enzima	Sustrato
Fosfatasa	Ésteres de fosfato
Glicosidasa	Glicósidos y polisacáridos
Ribonucleasa	Ácidos ribonucleicos
Desoxirribonucleasa	Ácido desoxirribonucleico
Catepsinas	Proteínas
Colagenasa	Proteínas
Alfa galactosidasa	Alfa galactósidos
Beta galactocerebrosidasa	Beta galactocerebrósidos
Hexosaminidasa	Ganglióside GM2
Arilsulfatasa	Ésteres de sulfato

Se ha postulado que la glicosilación de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso puede ocurrir de manera simultánea con el crecimiento de la cadena polipeptídica en la cara luminal. Ella consiste en el traspaso de un oligosacárido desde un portador lipídico, localizado en la membrana, hasta determinados residuos de aminoácidos de la proteína, principalmente hasta el nitrógeno amídico de la asparagina (capítulo 46). El oligosacárido incorporado a las proteínas, en este proceso de glicosilación, se modifica por la eliminación de monosacáridos en el propio retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi.

El retículo endoplasmático participa además en la síntesis de lípidos (esteroles, glicéridos, etc.); en esta función están implicadas ambas porciones del retículo (sección VIII). Las enzimas que intervienen en la síntesis de lípidos se encuentran formando parte de la membrana del retículo endoplasmático, y sus sitios activos se ubican hacia el citosol, de donde reciben sus sustratos; los lípidos sintetizados quedan incluidos en la membrana, lo que implica el crecimiento extendido de la bicapa lipídica.

Resulta sorprendente que este mecanismo solo añade nuevos componentes lipídicos a una de las capas de la membrana; hoy se sabe que los lípidos sintetizados en una cara de la membrana son trasladados a la cara opuesta por un mecanismo denominado *flip-flop*. La velocidad a la que sucede este proceso obedece a la existencia, en la propia

membrana del retículo endoplasmático, de proteínas transferidoras que se denominan *flipasas*.

El retículo endoplasmático liso de algunas células posee sistemas enzimáticos que participan en reacciones de detoxificación de sustancias potencialmente dañinas, que experimentan modificaciones y facilitan su excreción, ya que aumentan su solubilidad; el citocromo P450 es una enzima de este tipo que cataliza la hidroxilación de múltiples sustancias; la glucuroniltransferasa es otra enzima que adiciona restos de ácido glucurónico y aumenta la solubilidad de diferentes compuestos.

Cuando determinadas sustancias tóxicas, que son metabolizadas por enzimas del retículo endoplasmático liso, ingresan en cantidades apreciables al organismo, el volumen y la actividad enzimática de este retículo se incrementa mucho en el hígado. Las células musculares poseen un tipo especial de este retículo liso, denominado *retículo sarcoplasmático*, que posee funciones específicas relacionadas con la contracción muscular (capítulo 66).

Aparato de Golgi

El aparato de Golgi es un organelo membranoso que se localiza en las cercanías del núcleo celular y se relaciona con los centríolos; tiene un aspecto de sacos aplanados, de superficie lisa, apilados unos encima de otros, en grupos de seis cisternas o más, denominados *dictiosomas*. El aparato de Golgi puede ser un órgano único o múltiple, según el tipo celular donde se localice (Fig. 21.6).

En las células secretoras la porción del aparato de Golgi más cercana al núcleo celular se denomina cis (formadora), y se asocia con porciones del retículo endoplasmático, mientras que la más cercana a la membrana plasmática se denomina trans (maduradora); esta disposición puede estar invertida en otros tipos celulares; entre ambas regiones del aparato de Golgi existen diferencias estructurales y funcionales, fundamentadas en variaciones de su aspecto y en la localización de sus componentes enzimáticos.

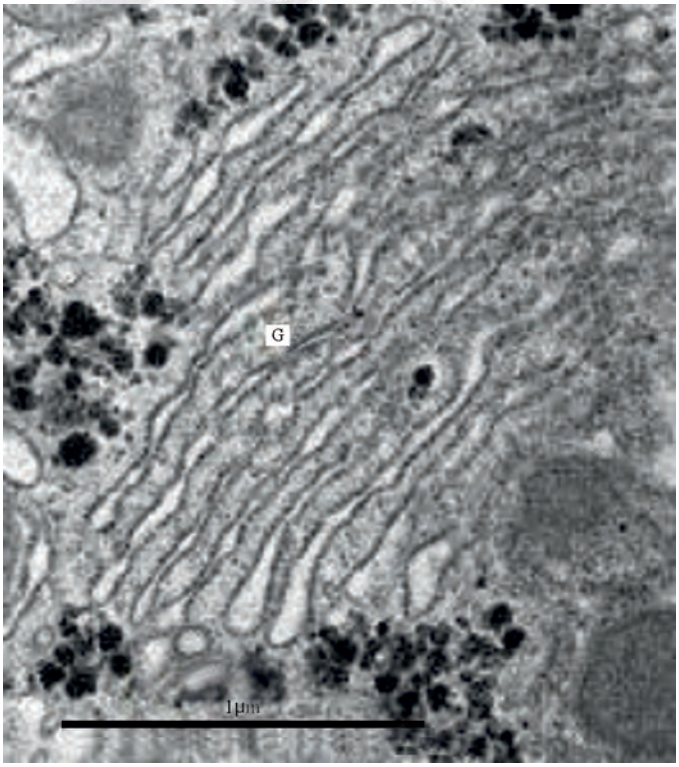


Fig. 21.6. Aparato de Golgi. Puede observarse esta estructura (G) al microscopio electrónico de trasmisión. Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Marlene Benchimol, Profesora e Investigadora Titular de la Universidad de Santa Úrsula, Río de Janeiro, Brasil.

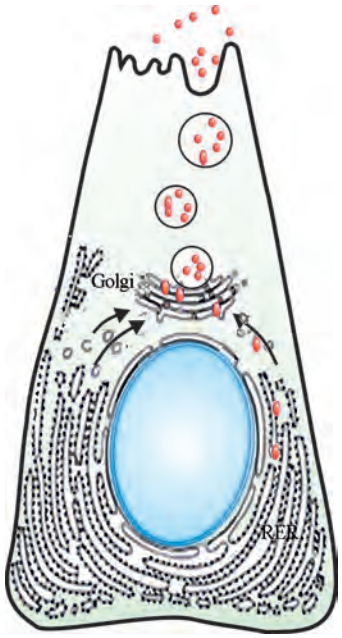


Fig. 21.7. Esquema de la síntesis acoplada de proteínas entre el RER y el aparato de Golgi. La proteína de secreción recién sintetizada se traslada al aparato de Golgi por su región cis; la síntesis continúa y se va trasladando hacia la cara trans, experimentando modificaciones en el trayecto. Las moléculas maduras se separan en forma de vesículas y al final son secretadas por exocitosis.

El aparato de Golgi se considera un centro de procesamiento y distribución de biomoléculas dentro de la célula, especialmente glicoproteínas y glicolípidos.

Se plantea que las biomoléculas en proceso de síntesis, como las glicoproteínas, se incorporan al aparato de Golgi por su región cis mediante relaciones de continuidad de su lumen con el del retículo endoplasmático liso, o bien a través de vesículas transportadoras. Estas biomoléculas se van trasladando de una cisterna a otra para aproximarse a la región trans, y durante dicho traslado sufren un procesamiento de glicosilaciones –sobre todo en residuos de serina y treonina–, modificación de los oligosacáridos unidos a residuos de asparagina, proteólisis parcial, sulfatación y adición de ácidos grasos. Todos estos cambios son catalizados por enzimas localizadas en el sistema de cisternas del Golgi.

Las biomoléculas que maduran en el aparato de Golgi emergen a través de su región trans –aunque también de algunas cisternas intermedias– en forma de vesículas que siguen diferentes destinos dentro de la célula (Fig. 21.7).

El aparato de Golgi tiene una participación destacada en la preparación y concentración de proteínas que son secretadas por la célula; de hecho, el aparato de Golgi está muy desarrollado en las células que realizan esta función secretora.

Los productos de secreción, una vez maduros y concentrados, se separan del aparato de Golgi en forma de vesículas, donde suele ocurrir una concentración ulterior. Las vesículas de secreción se adosan a la membrana plasmática y se fusionan con esta y vierten su contenido al exterior de la célula, en un proceso denominado exocitosis, que se produce ante estímulos específicos.

Lisosomas

Los lisosomas son vesículas membranosas de tamaño y forma diversos, cuya heterogeneidad obedece a las distintas etapas evolutivas de su ciclo funcional; constituyen organelos que están implicados en la degradación de diferentes biomoléculas, por lo cual se les compara con un aparato digestivo intracelular.

Esta función típica de los lisosomas se realiza gracias a las enzimas hidrolíticas que contienen, representadas por varias decenas de diferentes hidrolasas, capaces de actuar sobre los distintos sustratos (Tabla 21.2).

Las enzimas lisosomales se sintetizan en el retículo endoplasmático, de donde pasan al aparato de Golgi. Las enzimas lisosomales se caracterizan por ser glicoproteínas y poseen pH óptimo en la región ácida. El lisosoma, como organelo independiente, se origina por evaginaciones del aparato de Golgi en forma de pequeñas vesículas de 0,5 µm de diámetro, que se denominan *lisosomas primarios* (Fig. 21.8A).

La membrana de los lisosomas posee una bomba de protones (H^+) dependiente de ATP, que mantiene el interior de este organelo en un valor de pH cercano a 5,0, en correspondencia con el valor óptimo de pH para la acción de las hidrolasas que contiene. Las características de permeabilidad de esta membrana son tales que, mientras mantienen separadas sus potentes hidrolasas del resto de la célula, permiten la salida de los productos de degradación de las biomoléculas que son digeridas.

Los mecanismos, mediante los cuales las enzimas lisosomales son dirigidas hacia la formación de este organelo, no están del todo esclarecidos, pero se le ha atribuido elevado significado a la presencia en las enzimas lisosomales de un oligosacárido que contiene manosa 6 fosfato, lo cual se considera un marcador específico de estas enzimas y que pudiera participar en interacciones con receptores vinculados a su transporte intracelular.

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Los lisosomas participan en el recambio normal de los componentes celulares y en la digestión de materiales provenientes del exterior celular; también intervienen en la remodelación de tejidos durante la embriogénesis y el desarrollo, e incluso, en mecanismos emergentes de supervivencia celular ante un inadecuado suministro de nutrientes.

En su funcionamiento, los lisosomas primarios dan origen a diversos tipos de lisosomas secundarios de morfología variada (Fig. 21.8B), cuya nomenclatura diverge de un autor a otro. Resulta de interés referirse a dos tipos de lisosomas secundarios, ya que sus denominaciones se basan en el origen del material en proceso de digestión, localizado en su interior: los *autofagosomas* (lisosoma secundario autofágico) y los *heterofagosomas* (lisosoma secundario heterofágico).

Tabla 21.2. *Algunas enzimas lisosomales y sustratos sobre los cuales actúan*

Organelo	Localización	Secuencia
Retículo endoplasmático	Extremo N terminal*	De 6 a 12 aminoácidos (lumen) hidrofóbicos, frecuentemente precedidos por uno o más aminoácidos básicos
Mitocondria	Extremo N terminal*	Hélice anfipática de 20 (matriz) residuos con Arg y Lis por un lado y residuos hidrofóbicos por el otro
Peroxisomas	Extremo C terminal*	Ser-Lis-Leu (matriz) (la mayoría)
Núcleo	Extremo C terminal**	Pro-Lis-Lis-Lis-Arg-Lis-Val

* Estas secuencias son eliminadas de la proteína, una vez que llegan a su destino.
** Requieren la unión con proteínas transportadoras, denominadas "importinas".

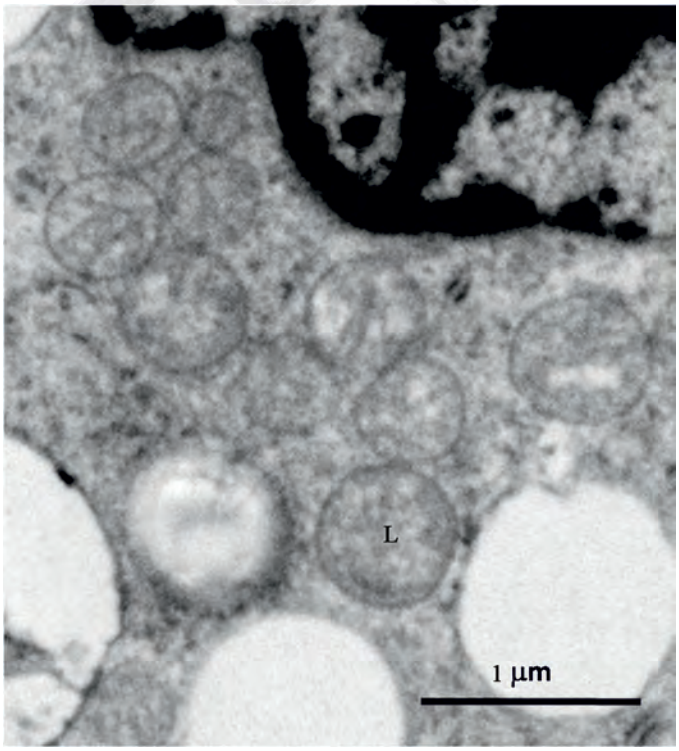


Fig. 21.8A. Microscopia electrónica de tumor de glándula suprarrenal. Célula de la capa glomerular. L: lisosoma primario. Cortesía de la Dra. en Ciencias Médicas, Lucía González, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch", La Habana, Cuba.

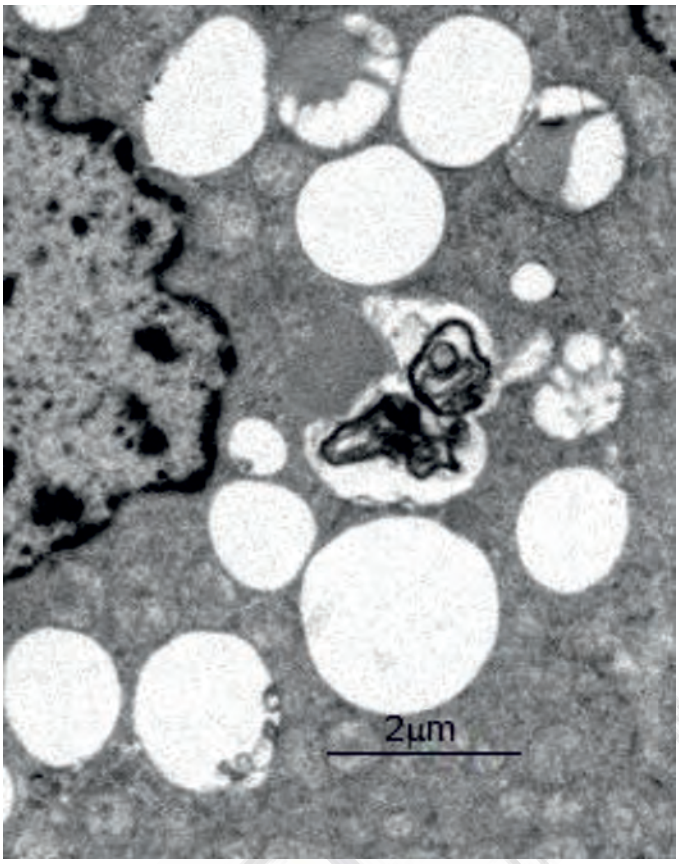


Fig. 21.8B. Microscopia electrónica de trasmisión, de células provenientes de un paciente afecto de carcinoma de glándula suprarrenal. Lisosoma secundario, obsérvese la dilatación de tipo lipídico no digerido. Cortesía de la Dra. en Ciencias Médicas, Lucía González, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch", La Habana, Cuba.

Los heterofagosomas son vesículas digestivas que se forman por la fusión de lisosomas primarios con vesículas heterofágicas, constituidas por invaginaciones de la membrana plasmática que incluyen en su interior un material proveniente del exterior celular (fagocitocis y pinocitocis).

La fagocitocis y la pinocitocis son dos variantes de un proceso general denominado endocitocis; como su nombre indica, la endocitocis consiste en la incorporación al interior celular de material proveniente del exterior. En el caso de la fagocitocis el material incorporado es relativamente voluminoso (virus, bacterias, fragmentos de otras células y complejos supramacromoleculares), mientras que la pinocitocis se refiere a la incorporación de moléculas o pequeñas porciones del medio extracelular.

El mecanismo general de la endocitocis consiste en la invaginación de la membrana plasmática, con formación de una vesícula donde queda incluido el material endocitado; por tanto, la membrana que rodea este material tiene su origen en la membrana plasmática. Al menos, en algunos casos el mecanismo de endocitocis se desencadena por la unión del material que será endocitado a los receptores específicos, localizados en la propia membrana plasmática.

Los autofagosomas se forman por la fusión de lisosomas primarios con vesículas autofágicas, que contienen en su interior un material procedente de la propia célula. En la figura 21.9 se representan estos procesos de autofagia y heterofagia. Al lisosoma secundario que contiene en su interior un material que no es digerible, se le denomina cuerpo residual.

Se ha descrito un numeroso grupo de enfermedades hereditarias, debidas a deficiencias de algunas de las enzimas lisosomales. Estas enfermedades de "atesoramiento" con frecuencia afectan el desarrollo normal del sistema nervioso central y de otros órganos. La enfermedad de Gaucher se debe a una deficiencia de galactosidasa; la de Fabry

es causada por la deficiencia de cerebrosidasa, mientras que un déficit de hexosaminidasa A da lugar a la enfermedad de Tay Sachs. En células de pacientes con estas afecciones es común observar numerosos lisosomas distendidos y "abarrotados" con el sustrato de la enzima que está en déficit.

Los lisosomas también están implicados en otro tipo de alteraciones, como los procesos inflamatorios y degenerativos. En otras partes del texto se hará referencia a algunas de estas enfermedades.

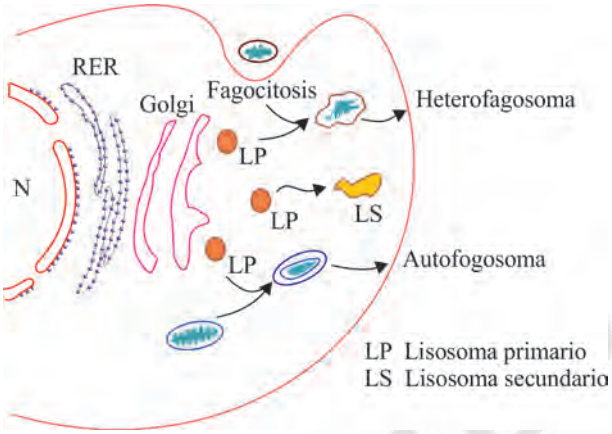


Fig. 21.9. Esquema representativo de los eventos que ocurren durante la autofagia y la heterofagia.

Peroxisomas

Los peroxisomas son pequeños organelos membranosos, de forma esférica, que en los cortes estudiados al microscopio electrónico suelen presentar en su interior zonas de aspecto cristalino (Fig. 21.10).

En la mayoría de las células los peroxisomas no rebasan los 0,25 µm de diámetro, pero en algunas, como las del hígado y el riñón, alcanzan 0,5 µm.

Los peroxisomas se originan por la vesiculación del retículo endoplasmático y en ocasiones se les observa unidos por porciones tubulares al mismo. No obstante, la mayoría de las proteínas de los peroxisomas son importadas desde el citoplasma.

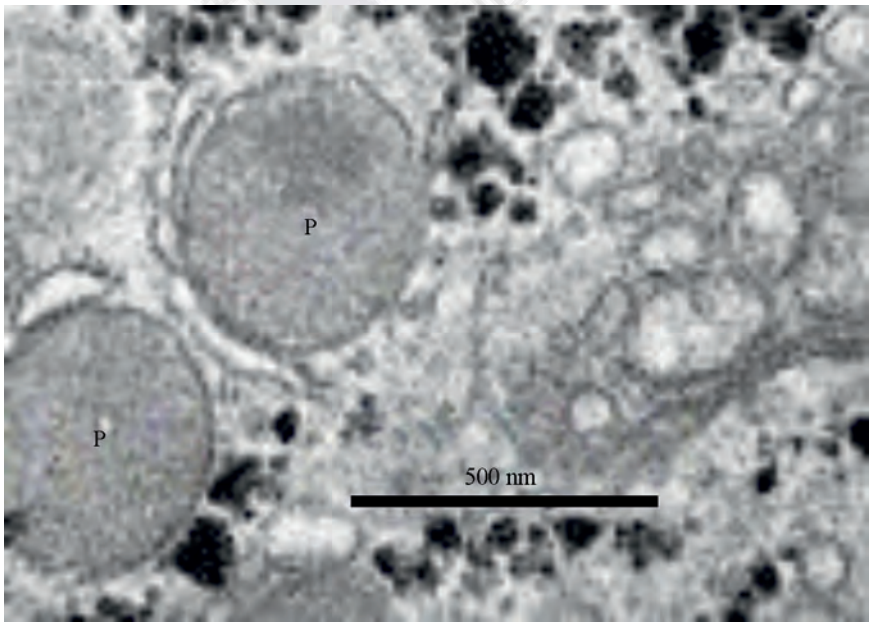


Fig. 21.10. Peroxisomas vistos a través de microscopia electrónica de trasmisión (P). Obsérvese dentro del organelo una zona más electrón densa, correspondiente a un cuerpo cristaloide. Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Marlene Benchimol, Profesora e Investigadora Titular de la Universidad de Santa Úrsula, Río de Janeiro, Brasil.

Si bien el contenido enzimático de los peroxisomas es variable de un tipo celular a otro, en todos los casos parecen estar presentes enzimas que intervienen en el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En efecto, la catalasa participa en la oxidación de algunas sustancias, utilizando directamente el oxígeno molecular según la reacción:

$$RH + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

Por su parte la peroxidasa tiene a su cargo la descomposición del H_2O_2, una sustancia potencialmente dañina para la célula:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Los peroxisomas intervienen en procesos de detoxificación, y en algunos tejidos pueden participar en la degradación de ácidos grasos. En las plantas estos organelos cumplen diversas funciones que incluyen procesos metabólicos que permiten a sus células convertir ácidos grasos en glúcidos, lo cual es imposible en las células animales.

Relaciones del sistema de endomembranas

Como se señaló al inicio, el sistema de endomembranas se encuentra relacionado de manera estructural y funcional, ejemplos de estas relaciones son las que se establecen entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, así como entre los peroxisomas y los lisosomas. Sin embargo, hoy día se atribuye una función vital en las relaciones entre membranas a las vesículas membranosas que establecen conexiones no solo entre los organelos del sistema de endomembranas, sino de estos con la propia membrana plasmática; estas vesículas constituirían verdaderas unidades para transportar componentes de membranas y proteínas específicas entre las diferentes membranas celulares.

Cuando las vesículas de secreción se fusionan con la membrana plasmática no solo vierten su secreción al exterior, sino que su membrana se integra a la plasmática. También se ha observado que los componentes de estas vesículas son reciclados, de modo que también se forman vesículas por invaginación de la membrana plasmática, las cuales se integran de nuevo al sistema de endomembranas; esto explica que no ocurre crecimiento ilimitado de la membrana plasmática en las células secretoras, además, tiene un sentido económico dado por la reutilización de algunos componentes de las propias vesículas secretoras. Relaciones similares parecen establecerse entre otros organelos membranosos, aunque el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi se encuentran en el centro de estos vínculos.

Las vesículas transportadoras explican el crecimiento de otras membranas a partir de la incorporación de algunos componentes al retículo endoplasmático. Con frecuencia estas vesículas se observan envueltas por una capa de aspecto poliédrico, a las cuales se les ha denominado vesículas cubiertas, y el componente fundamental de su envoltura es una proteína denominada *clatrina*. Probablemente, la formación y la separación de la cubierta de clatrina guardan relación con la orientación de estas vesículas hacia diferentes compartimientos celulares.

Sin embargo, se han descubierto más de 50 proteínas diferentes en las vesículas cubiertas, las cuales se incluyen en tres tipos fundamentales. Según sus principales proteínas de cubierta, estas vesículas se agrupan en tres clases fundamentales: las COPII (COP, de *coat protein* = proteína de cubierta) que transportan su carga desde el retículo endoplasmático rugoso hasta el aparato de Golgi; las COPI, que lo hacen desde la cara cis del aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático rugoso; y las clatrinas que transportan desde la membrana plasmática y la cara trans del aparato de Golgi hacia los

endosomas. Aparentemente algunas secuencias de aminoácidos o grupos unidos a estas proteínas determinan el organelo diana al cual se unirán y con el cual se fusionarán. En particular, la presencia de manosa 6 fosfato dirige las vesículas hacia los lisosomas.

Otras proteínas implicadas en el reconocimiento de las vesículas y los organelos de destino son las denominadas V-*snare* en las vesículas y T-*snare* en los organelos diana (*snare* = trampa). La interacción específica entre V-*snare* y T *snare* es crucial en el acercamiento y la fusión de las membranas de las vesículas y las membranas de los organelos de destino. Las vesículas cubiertas también contienen proteínas que unen GTP pertenecientes a la llamada familia Rab. En seres humanos se han encontrado 60 proteínas Rab y 35 proteínas *snare*.

Además de estas vesículas de transporte, en el interior de las células existe la proteína transferidora de fosfolípidos, que traslada moléculas de este tipo de lípidos entre diferentes organelos membranosos, como pudieran ser el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Sin dudas, el conocimiento sobre las complejidades estructural y funcional del sistema de endomembranas se encuentra en su inicio.

Resumen

Las células eucariotas presentan en su interior un complejo sistema de membranas, las cuales componen un conjunto diverso de organelos membranosos intracelulares.

Los organelos membranosos intracelulares son: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, los lisosomas, los peroxisomas, las mitocondrias, la membrana nuclear y los cloroplastos.

Los cloroplastos solo se encuentran en células que llevan a cabo el proceso de fotosíntesis, el resto está presente con mayor o menor desarrollo en la mayoría de las células eucariotas.

La estructura general de las endomembranas se corresponde con el modelo de mosaico fluido, cada organelo membranoso se diferencia de los demás por las composiciones lipídica y proteica de sus membranas y el modo de organizarse estas.

Las funciones generales que realizan los organelos membranosos son las siguientes:

- Compartimentación.
- Establecimiento de gradientes de concentración.
- Disponibilidad de superficie extensa.
- Incremento de la velocidad de los procesos metabólicos.
- Generación de nuevas membranas.

El retículo endoplasmático es el organelo membranoso más extenso; sus funciones se relacionan con la síntesis de proteínas que han de ser exportadas al exterior de la célula, la modificación estructural de estas proteínas y la síntesis de lípidos. En algunas células también realiza funciones de detoxificación.

En el retículo endoplasmático se distinguen dos porciones, denominadas retículos endoplasmáticos liso y rugoso, cuya diferencia fundamental es la presencia de ribosomas asociados con la superficie externa del segundo.

El aparato de Golgi es un centro procesador y distribuidor de macromoléculas en el interior de las células. Este aparato interviene en la modificación postraducción de numerosas proteínas. Estas modificaciones son glicosilaciones y modificaciones de los oligosacáridos unidos a las proteínas, proteólisis parcial, sulfatación y adición de ácidos grasos.

El aparato de Golgi adopta una estructura peculiar, formada por sacos aplanados de superficie lisa, cuyos conjuntos se les denomina dictiosomas. Los productos madurados

en el aparato de Golgi salen al exterior de las células o son distribuidos a otros compartimientos intracelulares a través de vesículas de transporte.

Los lisosomas constituyen centros de la digestión intracelular de numerosas biomoléculas, se caracterizan por poseer numerosas hidrolasas, cuyo pH óptimo se encuentra en la zona ácida. Se originan en el aparato de Golgi, en forma de pequeñas vesículas, denominadas lisosomas primarios; estos lisosomas primarios, por fusión con otras membranas, dan lugar a lisosomas secundarios de tipo autofágico o heterofágico, según el origen del material que se digiere en su interior. La deficiencia hereditaria de enzimas lisosomales ocasiona diversas enfermedades. Los peroxisomas son pequeños organelos membranosos en forma de vesículas que suelen presentar en su interior un contenido de aspecto cristalino; debido a sus enzimas, intervienen en reacciones de oxidación de diferentes sustancias y, en especial, en la descomposición del H_2O_2, el cual se forma en estas reacciones y puede resultar dañino para la célula.

Todos los organelos membranosos intracelulares presentan relaciones estructurales y funcionales entre sí; estas relaciones pueden ser por continuidad física de sus membranas o, lo que es más común, por la comunicación que se establece entre ellos y con la membrana plasmática por medio de las vesículas de transporte. También una proteína transferidora de fosfolípidos contribuye al intercambio de componentes entre los diferentes organelos membranosos.

Ejercicios

1. Enumere todos los organelos intracelulares que están formados por membranas.
2. ¿Cuál es la estructura general de las membranas que constituyen los organelos membranosos intracelulares? ¿Cuáles características las distinguen?
3. Explique las funciones generales de los organelos membranosos.
4. ¿Cuáles son las características estructurales y funcionales de las dos porciones del retículo endoplasmático?
5. Explique cuáles son los mecanismos que intervienen en la unión de los ribosomas con el retículo endoplasmático rugoso.
6. ¿Cuál es la participación del retículo endoplasmático en la formación de membranas intracelulares?
7. ¿Cuáles son las características estructurales y funcionales del aparato de Golgi?
8. ¿Mediante cuál mecanismo los productos madurados en el aparato de Golgi alcanzan otras localizaciones?
9. ¿Cuáles son las funciones generales de los lisosomas y cómo se asegura el cumplimiento de estas funciones?
10. ¿Cuáles son las diferencias entre un lisosoma primario, un autofagosoma y un heterofagosoma?
11. ¿Cuáles son las características estructurales y funcionales de los peroxisomas?
12. ¿Cómo se establecen las relaciones estructurales y funcionales entre los diferentes organelos membranosos?

Citoesqueleto

El citoplasma se consideraba una fase soluble amorfa, y aunque desde hace un siglo se planteó por algunos investigadores la presencia de estructuras trabeculares en él, estas estructuras se dieron por artefactos hasta que, aproximadamente dos décadas atrás, mediante técnicas especiales de microscopia electrónica, quedó establecida la existencia de tal esqueleto celular. Entonces hoy –citosol– es el término más usado para designar el medio interno acuoso, donde se hallan los organelos y las moléculas disueltas intracelularmente, lo que equivaldría a la antigua concepción del citoplasma amorfo.

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos y microtúbulos que atraviesa el citoplasma y determina la forma de cada célula, así como su organización estructural interna. Diversos tipos de movimientos celulares están asociados con esta fina red tridimensional de estructuras proteínicas que forman el citoesqueleto.

Los principales avances logrados en el conocimiento de esta dinámica estructura subcelular derivan de estudios realizados en músculos y en tejidos, cuyas células presentan cilios o flagelos, los cuales poseen funciones evidentemente asociadas con el movimiento mecánico. Los componentes moleculares presentes en estas estructuras están también en aquellas que forman el citoesqueleto de todas las células. Los filamentos y microtúbulos que participan en los movimientos del músculo y de los cilios presentan propiedades muy semejantes a las observadas en el citoesqueleto, pero difieren en estabilidad. Los movimientos del citoesqueleto son muy lábiles y cambiantes, mientras que los del músculo y de los cilios son más estables.

En este capítulo trataremos las características de los diferentes componentes del citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Para ello se estudiarán las interacciones que varias drogas establecen con algunos de sus componentes moleculares, las cuales han servido de insustituible instrumento para conocer su dinámica, y naturalmente se referirán las funciones que se hallan asociadas con estas organizaciones subcelulares.

Por último, se tratará de los gránulos bien definidos que permanecen en el interior de algunos tipos de células especializadas y a los cuales se les conoce como inclusiones citoplasmáticas.

Citoplasma soluble

A la luz del microscopio óptico se denominó citoplasma al contenido delimitado entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear; algunos distinguieron una zona periférica que llamaron exoplasma o plasmagel y una más fluida en el interior, el endoplasma o plasmasol.

No existen dudas de que el endoplasma es una fase acuosa, pero estudios posteriores permitieron descubrir la trama de filamentos y microtúbulos que le proporcionan una armazón, por lo cual pasó a la historia la idea del citoplasma como un contenido amorfo. Ello no niega que, a pesar de la existencia de los organelos y el reconocido citoesqueleto, existe un medio interno representado por el citosol.

El término citosol, surgido del fraccionamiento celular por medio de la centrifugación, se aplica a la fracción soluble que se obtiene después de centrifugar un homogeneizado de tejidos a velocidades muy elevadas.

Este citosol es particularmente abundante en las células poco diferenciadas; en este se hallan las proteínas y enzimas solubles de la matriz citoplasmática, entre estas últimas se encuentran las de la glucólisis y las encargadas de la activación de los aminoácidos, previo a la biosíntesis de las proteínas. Por supuesto que en esta fase acuosa también se hallan los distintos metabolitos que intervienen en las transformaciones químicas del metabolismo intermediario.

Microfilamentos

Los microfilamentos son estructuras que resultan de la polimerización de un tipo fundamental de proteína: la actina. Existen, por lo menos, 6 tipos diferentes de actina en las células de los vertebrados.

Estas proteínas homólogas son codificadas por genes diferentes, que determinan cadenas polipeptídicas con secuencias y propiedades muy semejantes. El lector debe remitirse al capítulo 66 para profundizar en los aspectos de estas proteínas descubiertas y estudiadas detalladamente en el tejido muscular.

Por debajo de la membrana plasmática existen haces de filamentos que se continúan con una trama similar, la cual atraviesa el citoplasma. Estos microfilamentos se relacionan durante su recorrido con vesículas del retículo endoplasmático, con microtúbulos y otros organitos (Fig. 22.1).

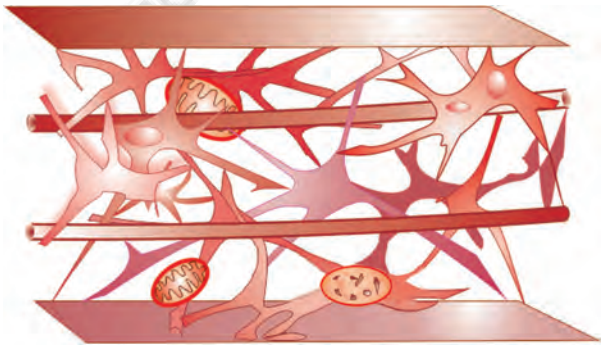


Fig. 22.1. Esquema de la trama del citoesqueleto. Se representan los microfilamentos, los microtúbulos, la membrana y otras estructuras del citoplasma.

En la asociación de los microfilamentos de actina con la membrana plasmática y con otros organelos intervienen proteínas específicas tales como espectrina, anquirina y aducina.

Estos microfilamentos tienen una existencia muy dinámica, su polimerización y despolimerización permiten los movimientos de los organelos del citoesqueleto. Los

microfilamentos de otras células que no sean las musculares son menos fáciles de localizar, tanto por su dinámica como por aparecer de ordinario menos agregados; existen excepciones, como es el caso de las microvellosidades de las células intestinales y las células epiteliales del túbulo proximal del riñón, donde forman haces compactos (Fig. 22.2).

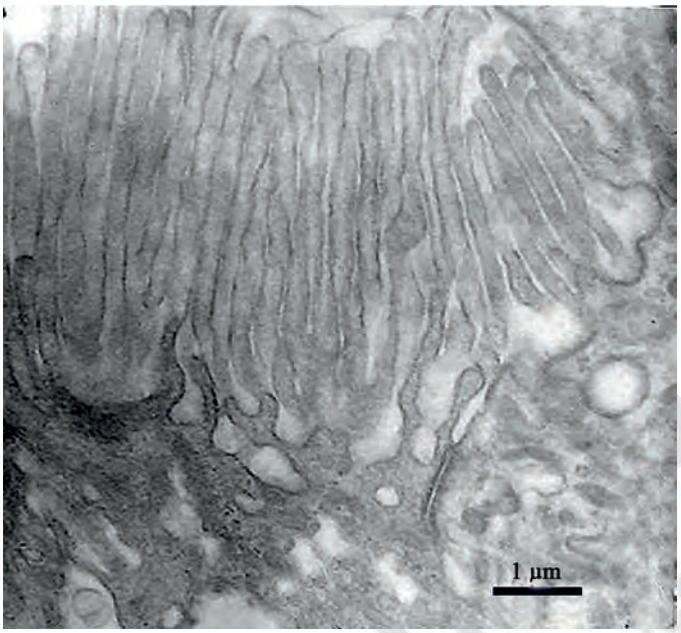


Fig. 22.2. Microfotografía electrónica de trasmisión de células epiteliales del túbulo proximal de riñón de rata. Las microvellosidades se observan como extensiones digitales de la membrana plasmática. Cortesía de la Dra. en Ciencias Médicas, Lucía González, Profesora Titular y Consultante e Investigadora Titular del Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch", La Habana, Cuba.

La actina globular o actina G, que se obtiene de los microfilamentos de las células musculares, tiene una masa molecular de 41 000 D y se asocia con un Ca^{2+} y una molécula de ATP. El calcio contribuye a mantener la estructura globular de la molécula. La función del ATP es curiosa, ya que la polimerización de la actina en la formación de los filamentos es un proceso espontáneo, pero resulta acelerado por la hidrólisis de aquel. Los CTP, GTP y TTP pueden sustituir al ATP *in vitro* sin afectar el proceso de polimerización. Los microfilamentos o filamentos de actina, observados al microscopio electrónico, presentan doble hélice que se forma por la polimerización de moléculas de esta proteína con 13,5 moléculas por vuelta (Fig. 22.3).

En estos estudios se ha puesto de manifiesto que la velocidad de polimerización no es constante. La formación del núcleo de polimerización inicial es muy lenta y requiere de la participación de otras proteínas.

En el citoplasma existe una reserva de moléculas de actina libre en equilibrio con la actina polimerizada (actina F) y este equilibrio depende del control de factores celulares que permite la coordinación de los movimientos, ejemplo, uno de estos factores es la proteína profilina, la cual se une a la actina e interfiere con la polimerización; se desconoce a través de qué mecanismos reguladores se debilita esta asociación.

Cada molécula de profilina se une a una molécula de actina y de este modo interfiere con la polimerización. Existen algunas evidencias aisladas que sugieren la existencia de mecanismos reguladores, los cuales modulan la interacción actina-profilina, afortunadamente se establece un dispositivo de control capaz de disparar una rápida polimerización.

La mayor parte del conocimiento acerca del equilibrio dinámico entre la polimerización y la despolimerización de la actina, así como de los movimientos en los que participan los microfilamentos, proviene de estudios realizados con un tipo de drogas: las citocalasinas, obtenidas de algunas especies de moho (Fig. 22.4).

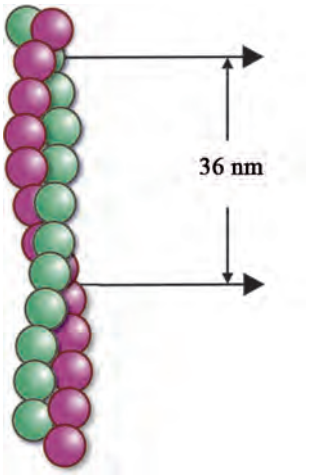


Fig. 22.3. Dibujo esquemático de un filamento de actina. Se señalan los 36 nm de longitud y las 13,5 unidades de actina que corresponden a una vuelta de la disposición helicoidal en la sucesión de monómeros.

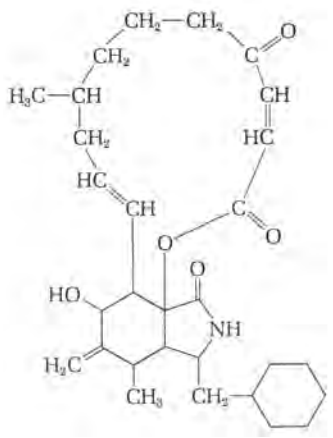


Fig. 22.4. Estructura química de la citocalasina B.

Estas sustancias interactúan con las moléculas de actina por uno de los extremos del filamento e impiden su polimerización. Se ha comprobado que el uso de estas drogas inhibe varios movimientos celulares, como la locomoción celular, la fagocitosis, la citocinesis y otros. Sin embargo, ellas no interfieren la mitosis ni la contracción muscular, en la cual no intervienen la polimerización ni la despolimerización de filamentos lábiles.

Contrario a la acción de las citocalasinas, existe otro tipo de drogas del grupo de los alcaloides: la faloidina, que estabiliza los filamentos de actina, de manera que impide su desorganización; cuando esta sustancia se le inyecta a los protozoos, como la ameba (la faloidina no atraviesa la membrana) impide los movimientos ameboides. Parece estar claro que la dinámica de la formación y desagregación de los microfilamentos es esencial para la consecución de los diferentes movimientos que dependen de estas estructuras.

Cabe destacar que los filamentos de actina son estructuras que presentan polaridad, es decir, que sus extremos son diferentes, porque esta es una propiedad que permite explicar cómo ocurren algunos de los movimientos en los que ellos participan.

La afinidad de las moléculas de actina para asociarse es diferente en cada extremo. La concentración crítica de actina libre es aquella a la cual la velocidad de incorporación es igual a la de disociación del polímero. Parece que la hidrólisis del ATP provoca un cambio conformacional, de manera que la concentración crítica se hace menor en uno de los extremos que en el otro, por tanto, en determinadas concentraciones intermedias, el filamento se puede mantener en un estado estacionario, según el hecho de que las moléculas se separan predominantemente de un extremo (-) y se añaden de manera predominante al otro (+). En el estado estacionario la velocidad neta de incorporación al extremo (+) es igual a la de desagregación del extremo (-). La consecuencia de esto (Fig. 22.5) es que la longitud del filamento permanece constante, pero se va desplazando en el espacio desde el extremo (-) al (+).

Existen numerosos ejemplos donde la actina se polimeriza rápidamente; en los seres humanos se tiene el caso de las plaquetas; cuando estas responden ante la lesión de un vaso sanguíneo se desarrollan múltiples prolongaciones finas que intervienen en la formación y la contracción del coágulo. Estas proyecciones contienen grandes cantidades de filamentos que se han estructurado a partir del *pool* de actina G. Además de la profilina, ya mencionada, que une una buena proporción de la actina despolimerizada, otras proteínas capaces de unirse a la actina se han descrito en la mayoría de las células de vertebrados e invertebrados.

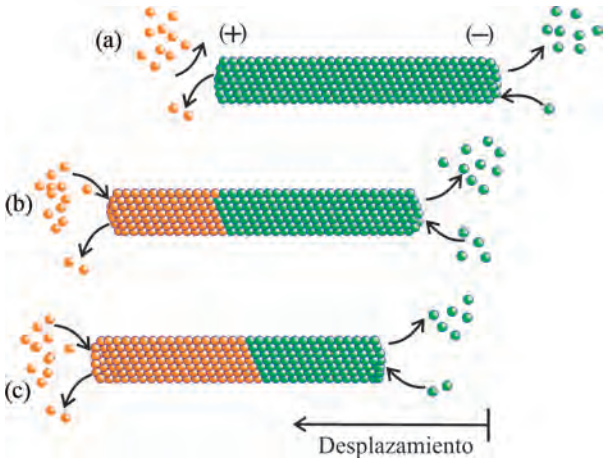


Fig. 22.5. Representación de la progresión de un filamento por la cinética polimerización-despolimerización en extremos opuestos. Los monómeros de actina-G se muestran con un color diferente: (a) a partir de un instante arbitrario 0; (b) se comienza a alargar el extremo (+) en la misma medida que la estructura decrece por el extremo (-); (c) transcurrido un intervalo determinado, se aprecia en la figura el desplazamiento del filamento.

Principales funciones de los microfilamentos

Existen dos tipos clásicos de movimientos celulares en que estas estructuras constituyen la fuerza motriz: las corrientes citoplasmáticas, conocidas como ciclosis, y el movimiento ameboide, característico de las amebas y de muchas células libres; junto con los demás componentes del citoesqueleto contribuyen a las transformaciones sol-gel que experimentan las células. Los microfilamentos, mediante los mecanismos de su dinámica que hemos estudiado, participan en las funciones de endocitosis y exocitosis.

Microtúbulos

Son estructuras tubulares presentes en el citoplasma de las células eucariotas, se distribuyen preferentemente alrededor del núcleo y aparecen en el microscopio electrónico como si sus extremos se fijaran en la membrana o en formaciones cercanas a ella.

Como los microfilamentos, los microtúbulos son muy lábiles, sobre todo los que forman parte del citoesqueleto, pues los que se hallan en cilios y flagelos son más estables.

Los microtúbulos son el resultado de la polimerización de un tipo fundamental de proteína globular: la tubulina, esta proteína constituye un dímero formado por dos monómeros, que presentan estructuras primarias muy semejantes y peso molecular de 50 000 cada uno. Se distinguen como α-tubulina y β-tubulina. La γ-tubulina, un tercer tipo de subunidad, solo se encuentra en las cercanías de los centrómeros, donde se generan los microtúbulos.

Un alcaloide, la colchicina, se une al dímero de tubulina e inhibe su polimerización, mientras que otra droga, el taxol, estabiliza la estructura de los microtúbulos, ya que favorece el proceso inverso.



Colchicina

El corte transversal de un microtúbulo permite observar 13 unidades dispuestas en forma circular alrededor de un eje imaginario central, cada una de estas unidades corresponde a un componente de los 13 protofilamentos que integran el microtúbulo (Figs. 22.6A y 22.6B).

En cada protofilamento las unidades de alfa y beta tubulina se alternan a lo largo de este, de modo que cada subunidad queda entre dos subunidades distintas; además, cuando se estudia la disposición de los protofilamentos a lo largo del microtúbulo, las subunidades alfa y beta se disponen en forma escalonada e integran un retículo regular definido.

En la dinámica de la polimerización-despolimerización de los microtúbulos interviene el GTP, como lo hacía el ATP en los filamentos de actina; participan dos moléculas de GTP en la adición de cada dímero, una de ellas está unida reversiblemente y se hidroliza de manera simultánea con el ensamblaje; la otra molécula de GTP se une de forma irreversible y no es hidrolizada.

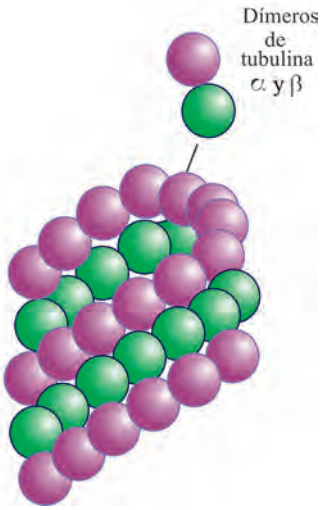


Fig. 22.6A. Esquema de un microtúbulo en vista longitudinal.

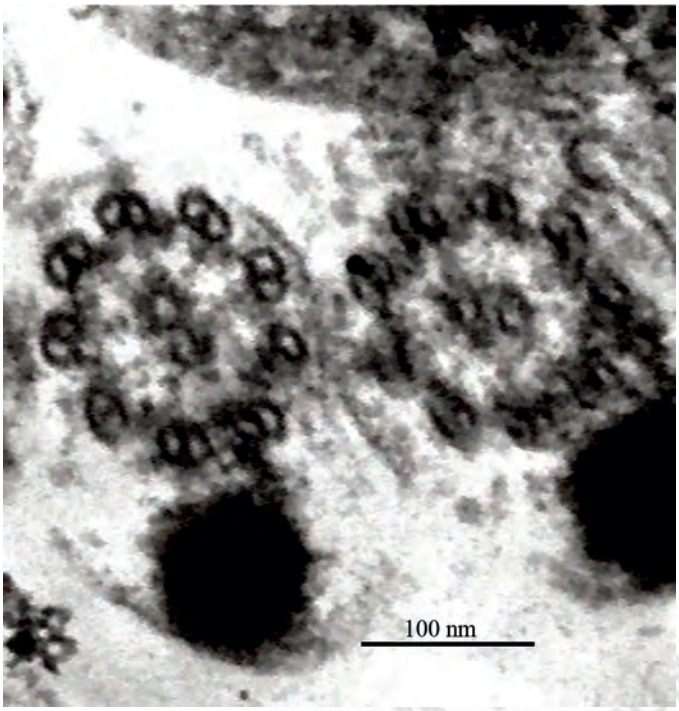


Fig. 22.6B. Microtúbulos en flagelo de espermatozoide de anfibio. Microscopia electrónica de trasmisión. Se observan los nueve pares de microtúbulos periféricos y el par central. Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Yamilka Rodríguez, Profesora e Investigadora Titular de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Los microtúbulos también presentan polaridad y sus extremos se denotan por (+) y (-); ellos se van "ensamblando" desde los denominados centros organizadores, los cuales protegen su extremo (-) como si estuviera encapsulado, presumiblemente estableciendo interacciones con proteínas específicas que inhiben el crecimiento de ese extremo. Este extremo encapsulado se encuentra en la región adyacente al núcleo (centro celular o citocentro) durante la interfase y la mitosis.

A partir de estos sitios precisamente es que se iniciará la organización de los microtúbulos, razón por la que estos centros se denominan centros organizadores, los cuales están relacionados con los centríolos.

De estas interacciones dependerá también la unión de los microtúbulos a los componentes membranales y a algunas proteínas enzimáticas que antes se creían libres en la fracción soluble del citoplasma. Se han descrito dos tipos principales de proteínas accesorias: las tau y las MAP (*microtubules associated proteins*). Las primeras, de peso molecular entre 60 000 y 70 000, se enlazan a la tubulina e incrementan la polimerización. Las MAP de peso molecular entre 200 000 y 300 000 parecen poseer dos dominios, uno se enlaza al microtúbulo, mientras que el otro queda libre y puede estar involucrado en la unión a otros componentes celulares; las mejores conocidas son las miosinas, la kinesina, dineína y la nexina.

Estas proteínas tienen actividad de ATPasa y en ellas la hidrólisis del ATP se acopla con cambios conformacionales que provocan su movimiento a lo largo de los microtúbulos (y en algunos casos de los microfilamentos), arrastrando consigo cargas como macromoléculas, vesículas membranosas y otros orgánulos. Se comprenderá la relevante contribución de estos mecanismos a los movimientos celulares.

Para la comprensión del sentido de algunas de estas interacciones, es necesario antes esbozar las principales funciones en que intervienen los microtúbulos.

Principales funciones de los microtúbulos

La adopción de las formas características de algunos tipos celulares, así como de sus prolongaciones se relaciona con la orientación y distribución de los microtúbulos. Los axones de las células nerviosas son un ejemplo típico de esta función.

Numerosos cambios que tienen lugar en la morfogénesis están relacionados con la función mecánica de los microtúbulos. La inducción de la placoda en la diferenciación del cristalino se acompaña de la aparición de numerosos microtúbulos, por citar solo un caso.

Todas las células eucariotas tienen geometría espacial distintiva, dada por la posición de sus organelos; esta polaridad celular depende de la integridad de los microtúbulos. Cuando son destruidos, el desplazamiento celular se torna azaroso y pierde su carácter direccional.

No cabe duda que los microtúbulos se pueden constituir en una especie de sistema de transporte interno, lo que permitiría la circulación de macromoléculas, al delimitar canales en el citoplasma.

Se conoce que en algunos receptores sensoriales se hallan presentes conjuntos de microtúbulos, lo cual presume que intervengan de alguna manera en la transducción de diferentes formas de energía en esos neurorreceptores.

En el capítulo 23 se expone la participación en la mitosis de los microtúbulos; de estos se derivan los cilios, flagelos y centríolos.

De todo lo dicho, se comprende que los microtúbulos intervienen en muchos movimientos celulares guiando algunas corrientes citoplasmáticas, que pueden transportar gránulos de secreción hacia la superficie celular, donde descargan su contenido por exocitosis: movimientos que agrupan en un polo de la célula a las proteínas integrales de la membrana plasmática, movimiento de los cromosomas durante la división celular y otros.

Se considera como muy probable la intervención directa de los microtúbulos en la generación de fuerzas en el caso de los movimientos ciliares o flagelares; estos movimientos provocan un desplazamiento del líquido extracelular con respecto a las células si ellas están fijadas, o de la propia célula si es libre y suficientemente pequeña.

Filamentos intermedios

Si bien los dos tipos más importantes de componentes del citoesqueleto son los microfilamentos y los microtúbulos, caracterizados por su dinámica labilidad, existe otro tipo de filamento, de diámetro intermedio entre aquellos y que resulta ser mucho más estable. Esta propiedad se debe a que sus constituyentes moleculares son proteínas de naturaleza fibrosa y no globular, que los hace muy resistentes a la extracción con soluciones de variadas concentraciones salinas y con detergentes no iónicos; sin embargo, esta insolubilidad hace posible su observación microscópica mucho más fácil que la de los restantes componentes del citoesqueleto. En la figura 22.7 se presentan microfotografías correspondientes a la célula endotelial de un capilar de placenta humana.

Los filamentos intermedios tienen una disposición que también parece partir del centro de la célula, pero con recorridos menos sinuosos; se hallan relacionados con las zonas de las células que están bajo grandes tensiones. Varios tipos de proteínas están presentes en los filamentos intermedios, muestran masas moleculares de 40 000 a 200 000 D y se polimerizan, sin dar lugar a estructuras tan regulares como las de los microtúbulos y los microfilamentos. El número de estas proteínas fibrosas varía según el tipo de célula y la especie.

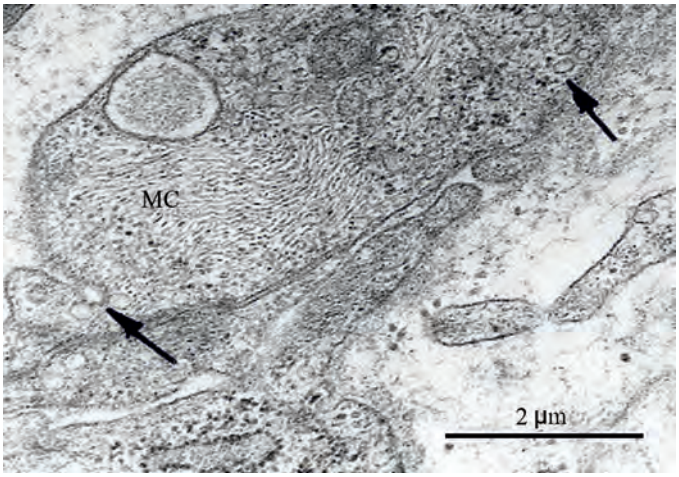


Fig. 22.7. Microfotografía de la célula endotelial de un capilar de placenta humana, vista a microscopia electrónica de trasmisión. Disposición en haces irregulares de los microfilamentos (MC). Además, en el extremo inferior izquierdo se observa una imagen de micropinocitosis (flecha). Cortesía de la Dra. en Ciencias Médicas, Lucía González, Profesora Titular y Consultante e Investigadora Titular del Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch", La Habana, Cuba.

Cada filamento parece presentar un trímero como unidad de polimerización, aunque ello no está confirmado, y todavía los factores que controlan estas estructuras y sus funciones son objeto de especulación. Lo que sí se puede afirmar es que cada tipo de célula presenta filamentos intermedios característicos, que están constituidos por proteínas diferentes que se asocian; ejemplo de ello son los filamentos de queratina en las células epiteliales, los de vimentina en los fibroblastos y los neurofilamentos de las neuronas.

Precisamente, su diversidad hace mucho más difícil su estudio y el de sus proteínas constituyentes. La asociación de estas proteínas fibrosas parece presentar características estructurales semejantes a la de la colágena (capítulo 68).

De acuerdo con lo expresado se comprende que la polimerización de los filamentos intermedios, hasta el momento, parece ser un proceso irreversible; de ello no deben deducirse que el número, tamaño y disposición de estas estructuras a de mantenerse constantes durante toda la vida celular. Se han descubierto enzimas proteolíticas que degradan específicamente un tipo u otro de filamentos intermedios, y se desconoce cómo es regulada la actividad de estas enzimas *in vivo*; *in vitro*, muchas de ellas son activadas por el Ca^{2+}; lo cierto es que la única forma conocida en que pueden ser desagregados los filamentos de esta clase es mediante la hidrólisis de sus proteínas en péptidos más pequeños.

En tanto no se demuestre lo contrario, la función de los filamentos intermedios parece restringida a soporte mecánico de la estructura celular.

Inclusiones citoplasmáticas

Se denominan inclusiones a las estructuras que existen en el citoplasma y no son más que verdaderos almacenes de sustancias específicas que se hallan disponibles para ser utilizadas en la célula o por el organismo. Estas sustancias incluyen desde compuestos de reserva energética, entre estos, la grasa y el glucógeno, hasta elementos simples, por ejemplo, el hierro, y pigmentos como la melanina.

Glóbulos de grasa

Estas inclusiones se encuentran en las células del tejido adiposo de los mamíferos, son cúmulos de lípidos del tipo de los triacilgliceroles (capítulo 13). Constituyen una reserva de energía muy eficiente, debido al elevado contenido calórico que poseen; en algunos tejidos especializados en la síntesis de algún tipo de lípido, como la capa fascicular de la corteza suprarrenal (Fig. 22.8).

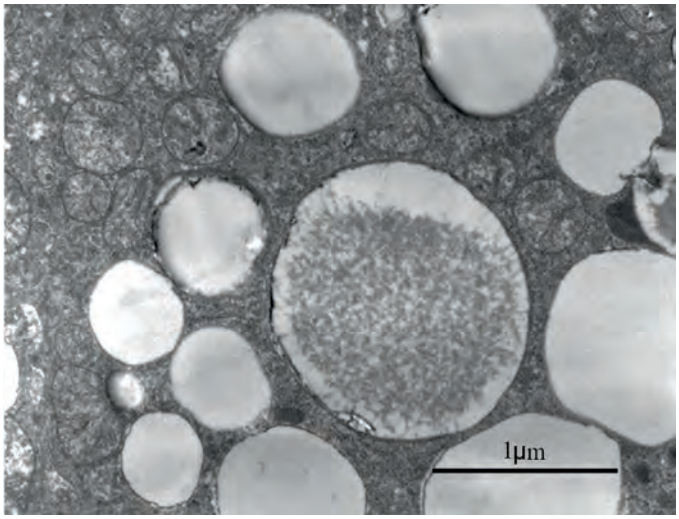


Fig. 22.8. Se observan vacuolas en el microscopio electrónico de trasmisión, una con contenido lipídico en citoplasma de célula de la zona fascicular de la corteza suprarrenal de un paciente con adenoma de la glándula suprarrenal. Cortesía de la Dra. en Ciencias Médicas, Lucía González, Profesora Titular y Consultante e Investigadora Titular del Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch", La Habana, Cuba.

No obstante, estas inclusiones aparecen en otras células del organismo, como las musculares y en los hepatocitos; en estos últimos pueden acumularse excesivamente y causar daño hepático bajo determinadas circunstancias, es el denominado hígado graso que en algunos casos puede evolucionar hacia la cirrosis hepática.

Gránulos de glucógeno

El glucógeno es un polisacárido formado por unidades de glucosa, lo que le permite constituir, igual que los triacilgliceroles, una reserva energética para la célula o el organismo (capítulo 10). Los gránulos de glucógeno ofrecen un aspecto muy denso en las microfotografías (Fig. 22.9A).

En el gránulo, además se encuentran las enzimas que participan en las síntesis y degradación del polisacárido, y otro conjunto de enzimas que tienen una función reguladora del metabolismo del glucógeno (Figs. 22.9B y 22.9C). Tanto el peso molecular del glucógeno, como la proporción en que se hallan las proteínas enzimáticas en el gránulo, son variables, de modo que estas inclusiones poseen diámetros que van desde los 1 000 a los 4 000 nm.

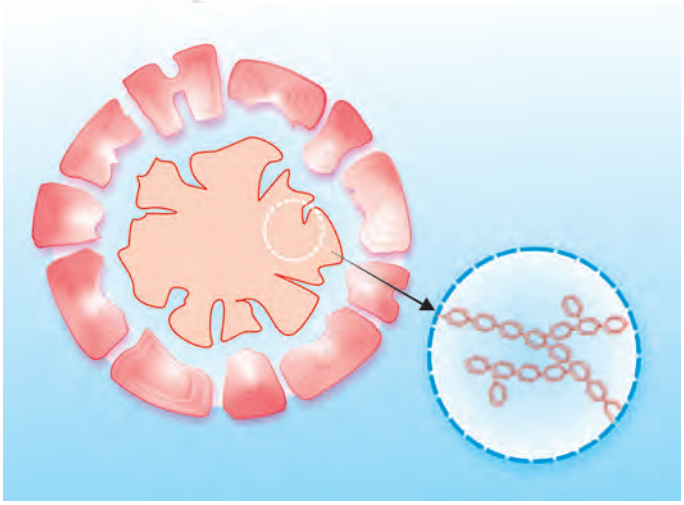


Fig. 22.9A. Representación esquemática de un gránulo de glucógeno.

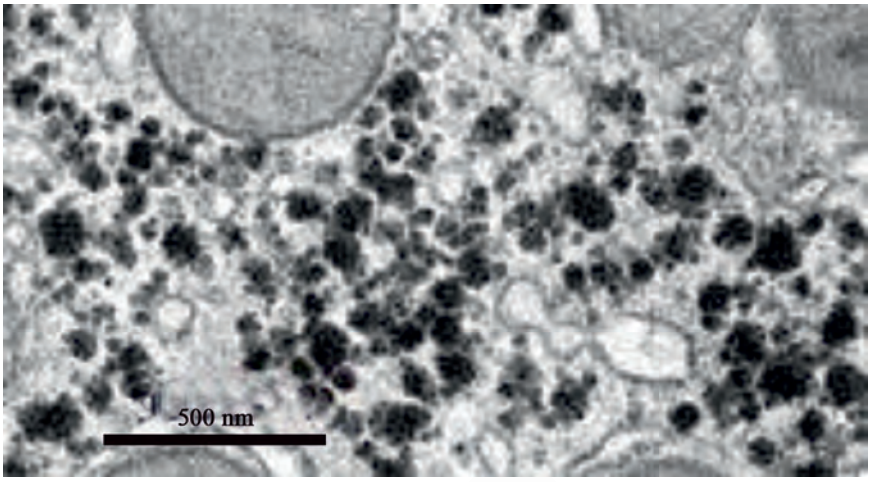


Fig. 22.9B. Gránulos de glucógeno que forman conglomerados electrón densos, observados en microscopia electrónica de trasmisión. Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Marlene Benchimol, Profesora e Investigadora Titular de la Universidad de Santa Úrsula, Río de Janeiro, Brasil.

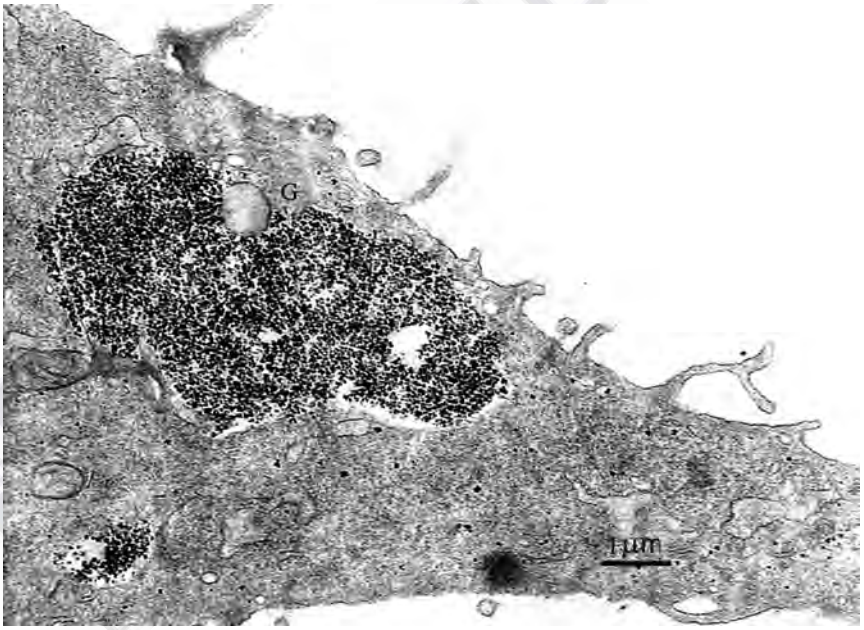


Fig. 22.9C. Gránulos de glucógeno. Se utilizó la técnica citoquímica para demostrar polisacáridos por microscopia electrónica de tiosemicarbasida proteinato de plata, según Thiery J.P. Se observan cúmulos de glucógeno en citoplasma de fibroblasto en cultivo. Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas, Odelsa Ancheta Niebla, Profesora Auxiliar y Consultante e Investigadora Titular de la Escuela Latinoamericana de Medicina, La Habana, Cuba.

Resumen

La fase soluble que se obtiene como sobrenadante en una centrifugación de homogeneizados celulares a muy elevada velocidad se conoce como citosol. Las técnicas avanzadas de microscopia electrónica no niegan que el medio interno celular, donde se encuentran los organelos y el citoesqueleto, se halla bañado por una fase acuosa, el citosol. En este se encuentran disueltos metabolitos, proteínas y enzimas solubles. El citoesqueleto es una compleja red de filamentos y microtúbulos que atraviesan el citoplasma, y determina la forma celular, así como la organización del hialoplasma.

Los microfilamentos son el resultado de la polimerización de monómeros de la proteína actina, una de las dos proteínas fundamentales que participan en la propiedad

contráctil de las fibras musculares. Estos polímeros, en el caso de los filamentos del citoesqueleto de una célula cualquiera, se agregan y despolimerizan de forma continua, lo cual les confiere una dinámica en su localización, tamaño y estabilidad, además, les permite intervenir en funciones relacionadas con algunos movimientos celulares.

Esta dinámica y su importancia en algunas propiedades celulares han podido ser estudiadas con la ayuda de drogas que, como la citocalasina, impiden la polimerización de las moléculas de actina. La profilina es una proteína que parece tener una función parecida en el control fisiológico del equilibrio polimerización-despolimerización de los microfilamentos.

Si se interfiere la mecánica normal de los microfilamentos se impide la locomoción celular, la fagocitosis, la citocinesis y el desarrollo de las digitaciones que ocurren en la respuesta fisiológica de las plaquetas, entre otros procesos.

Los microtúbulos poseen dinámica similar, pero están constituidos por otra proteína, la tubulina.

Las dos estructuras citadas presentan polaridad y generalmente en un extremo predomina la desagregación de los monómeros, y en el opuesto la polimerización, característica que hace posible la movilidad de ambos.

Los microtúbulos del citoesqueleto tienen dinámica semejante a la de los microfilamentos, pero como los polímeros estables de actina se hallaron en los músculos, existen también microtúbulos más duraderos y menos cambiantes en los cilios y flagelos.

Los microtúbulos se originan de ordinario en regiones adyacentes al núcleo celular, denominadas centros organizadores, los que están relacionados con los centríolos.

Las proteínas accesorias establecen nexos entre las moléculas de tubulina y de estas con otros componentes celulares.

Los microtúbulos son determinantes en la especificidad de la forma de los diferentes tipos de células, intervienen en la morfogénesis y en la formación del huso mitótico, confieren polaridad a las células que la poseen y parece que desempeñan una función en algunos neurorreceptores y, por supuesto, forman parte importante del sistema circulatorio intracelular.

Por último, los filamentos intermedios los forman diferentes proteínas en las distintas células y son más estables que los microfilamentos y microtúbulos. También se diferencian de aquellos en que las proteínas que los integran son fibrosas en vez de globulares. Su diversidad ha hecho más difícil el estudio y comprensión de sus estructuras y funciones: en las células epiteliales existen filamentos de queratina; en los fibroblastos y la mayoría de otras células suele estar presente la vimentina, entre las proteínas componentes de los filamentos intermedios.

Se presume que estos filamentos se destruyan por proteólisis y se han aislado enzimas específicas para sus diversas proteínas constituyentes.

Las tres estructuras estudiadas conforman el citoesqueleto, que como su nombre indica constituye el soporte mecánico del conjunto de la arquitectura celular.

Las inclusiones citoplasmáticas son acumulaciones de sustancias que se almacenan durante algún tiempo en la célula. Los exponentes más comunes son los glóbulos de grasa y los gránulos de glucógeno, ambos tienen función de reserva energética para la célula o el organismo.

Ejercicios

1. Realice una comparación entre las proteínas que integran los microfilamentos y los microtúbulos.
2. ¿Qué característica especial presentan las proteínas de los filamentos intermedios que no la poseen las de los microfilamentos y microtúbulos?
3. ¿Cuál es el sentido del gran dinamismo que presentan las estructuras poliméricas fundamentales del citoesqueleto?
4. Trate de deslindar las funciones de los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios que les son propias y las que les son comunes a los tres.
5. La división celular no se afecta por la droga citocalasina, pero sí por la colchicina. ¿Qué conclusión puede usted inferir en cuanto a las estructuras del citoesqueleto que intervienen en la mitosis y las que no lo hacen?
6. De acuerdo con lo estudiado en el capítulo 18 y en este, ¿cree usted que los gránulos de glucógeno constituyen sistemas multienzimáticos?
7. ¿Son los glóbulos de grasa inclusiones exclusivas del adipocito?

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Núcleo celular

La diferencia fundamental entre las células procariotas y eucariotas es la presencia en estas últimas de la envoltura nuclear que separa al núcleo (donde se encuentra el ADN del citoplasma); también existen diferencias entre estos tipos de células en cuanto a los procesos relacionados con el ADN y los procesos que ocurren en el citoplasma. En las células procariotas, la síntesis de ARN (transcripción) y la síntesis de proteína (traducción) se llevan a cabo casi de manera simultánea, sin haberse separado aún los ARNm del ADN. La aparición durante el proceso de la evolución de la envoltura nuclear posibilitó la separación del proceso de transcripción (nuclear) del de traducción (citoplasmática), esto permitió el desarrollo de ambos procesos. Se debe recordar que también existen la transcripción y la traducción mitocondrial.

En este capítulo se describirán las diferentes estructuras del núcleo: la envoltura nuclear, el nucléolo, la cromatina-cromosoma y el jugo nuclear, además, se hará referencia a la relación entre estas estructuras y su función. También se describe el proceso de división celular –la mitosis.

Concepto

El núcleo celular es un organelo membranoso grande de las células eucariotas que contiene al ADN que porta la información genética celular (Fig. 23.1A).

Al estudiar el núcleo celular se muestran ejemplos del principio de la organización de las macromoléculas, ya que se observa durante el desarrollo de la mitosis, cómo diferentes estructuras nucleares desaparecen bajo determinados mecanismos de regulación, no del todo conocidos, y vuelven a formarse, entre otras causas, por el reconocimiento molecular entre sus componentes. La propiedad del reconocimiento molecular ligado a las diferentes estructuras fue tratada en el capítulo 9.

Cuando la célula se encuentra en interfase, se pueden observar todas las estructuras nucleares: el material genético se encuentra estructurado en forma de cromatina, la envoltura nuclear está presente y se puede observar, al menos, un nucléolo. Cuando en la célula comienza la división mitótica, ocurren cambios que implican la desaparición de la envoltura nuclear, la conversión de la cromatina en cromosomas y la desaparición del nucléolo. Una vez terminada la separación del material genético en dos partes iguales, entre las células hijas se producen cambios que le devuelven a la célula la estructura que tenía en la interfase.

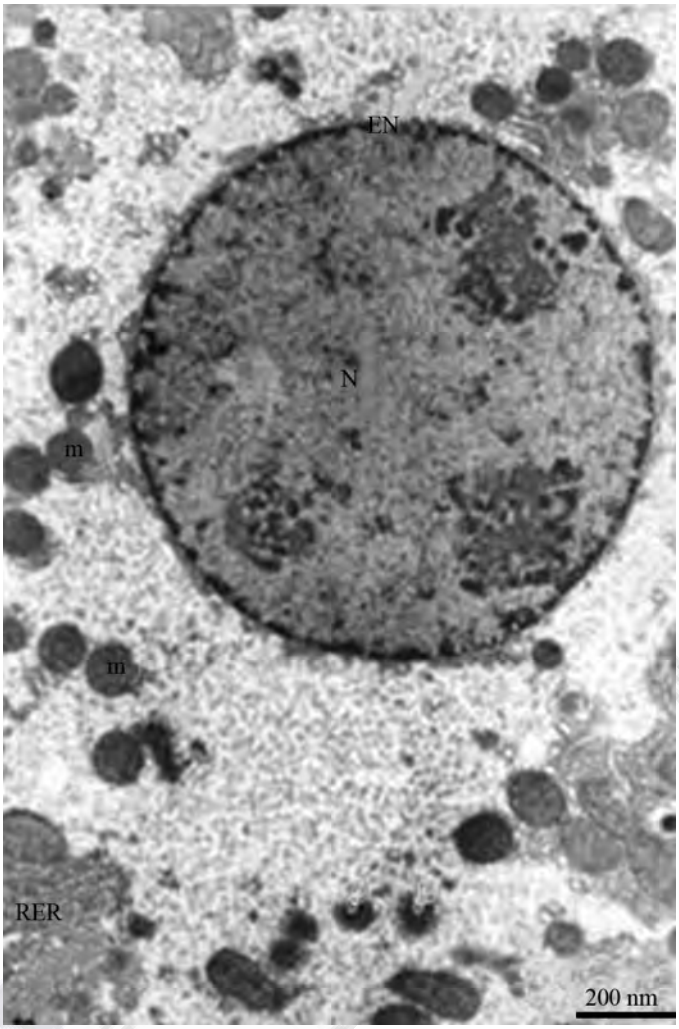


Fig. 23.1A. Microscopia electrónica de trasmisión, de biopsia hepática de persona sana. Se detecta el núcleo (N) y el citoplasma dentro de límites normales. Se señalan la envoltura nuclear (EN), el retículo endoplásmico rugoso (RER) y las mitocondrias (m). Cortesía de la Dra. en Ciencias Biológicas Viviana Falcón Cama, Profesora e Investigadora Titular. Departamento de Microscopia Electrónica. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

Componentes estructurales del núcleo y su organización

El núcleo celular consta de los componentes estructurales siguientes (Fig. 23.1B):

- Nucleoplasma o jugo nuclear.
- Envoltura nuclear.
- Cromatina.
- Nucléolo.

El núcleo tiene una organización interna, pues sus componentes internos y sus funciones se localizan en determinados sitios específicos.

Los diferentes cromosomas no se entremezclan, sino que se encuentran separados unos de otros por un espacio y están unidos a la membrana interna de la envoltura nuclear (Fig. 23.2); el o los nucléolos se localizan en las secuencias del ADN que contienen la información para la síntesis de los ARN ribosomales y en los nucléolos es donde tiene lugar el ensamblaje de los ribosomas.

Cuando el ADN se va a duplicar, se encuentran cientos de sitios específicos, denominados fábricas de replicación, en los que se agrupan las horquillas de replicación y otros sitios, las manchas nucleares, en las que se encuentran acumulados los componentes del aparato de ensamblaje, de donde se extraen estos para procesar los preARNm; también se observan los cuerpos nucleares y en uno de ellos se hallan reunidos los snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*).

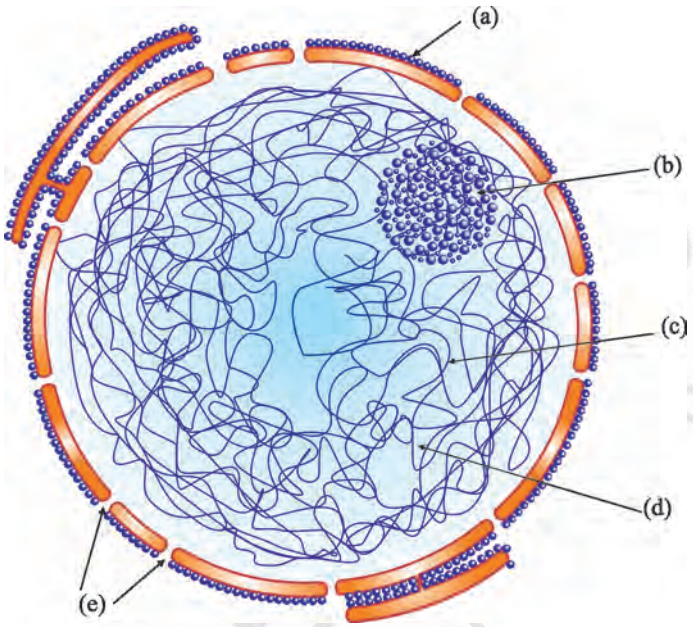


Fig. 23.1B. Componentes del núcleo: (a) membrana nuclear; (b) nucléolo; (c) cromatina; (d) nucleoplasma o cariolinfa. Se observan ambas membranas de la envoltura nuclear y los ribosomas unidos a la membrana externa; (e) poros de la membrana.

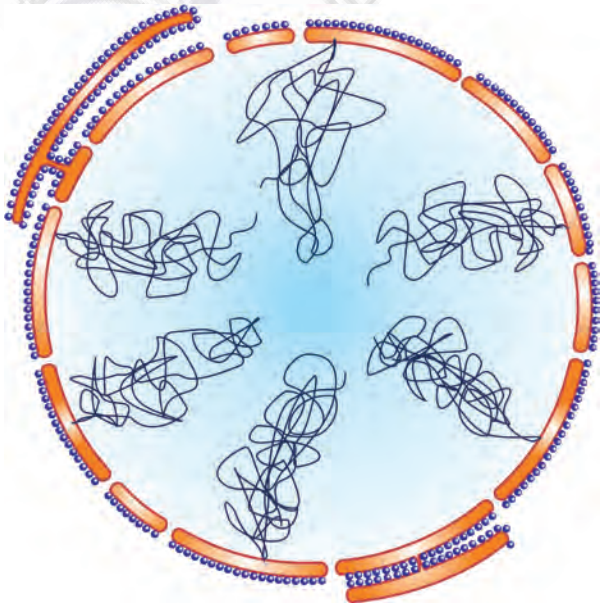


Fig. 23.2. Se observa que los ADN se encuentran unidos a la membrana interna y existe espacio entre estos.

Envoltura nuclear

La envoltura nuclear es la doble membrana que rodea al núcleo; está formada por una membrana interna, que tiene adosada por su cara interna a la lámina nuclear, y otra externa, que tiene adosados los ribosomas, pues es continuación de la membrana del retículo endoplasmático rugoso. Ambas membranas están atravesadas por poros que unen el interior del núcleo con el citoplasma.

La presencia de la envoltura nuclear es lo que distingue fundamentalmente a las células de los organismos eucariontes, ya que los procariontes no la tienen. La aparición de este componente celular introdujo cambios celulares, como la separación de la célula en dos compartimentos: el citoplasmático y el nuclear. Esto resultó ventajoso al limitar el paso de sustancias entre ambos compartimentos y, por ende, pudieron evolucionar tanto los procesos intranucleares como los extranucleares, así como sus mecanismos de regulación respectivos. La aparición de la membrana también permitió que evolucionara la organización estructural de los ADN nucleares.

La envoltura nuclear está formada por doble membrana y queda entre estas un espacio intermembranas, denominado espacio perinuclear. Este espacio es continuación de la luz del retículo endoplasmático rugoso. La doble membrana está atravesada por poros que unen el espacio intranuclear (nucleoplasma) y el citoplasmático (Fig. 23.3). Al nivel de los poros se funden ambas membranas. Ocupando el espacio de los poros se encuentra el complejo del poro nuclear, que tiene paso selectivo. Adosada por dentro de la membrana interna se encuentra un enrejado proteico: la lámina nuclear.

Si se observa una de las dos caras de la membrana, se nota que los poros presentan una distribución hexagonal (Fig. 23.4). Estos constituyen de 10 % a 36 % del área total de la membrana, y existen entre 40 y 145 poros por micrómetro cuadrado.

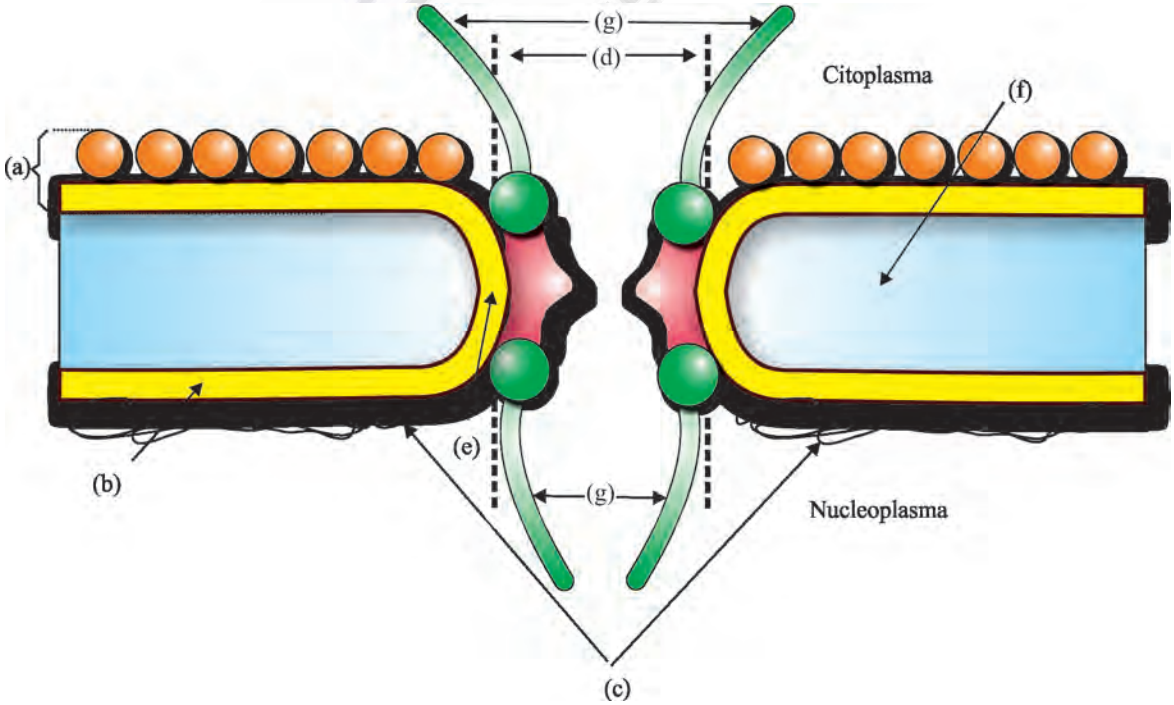


Fig. 23.3. Representación sencilla del complejo del poro nuclear. Se observan: (a) membrana externa; (b) membrana interna con (c) lámina nuclear. Ambas están atravesadas por los poros (d) y a este nivel las dos membranas (e) se unen en (f) el espacio perinuclear y en (g) los filamentos internos y externos.

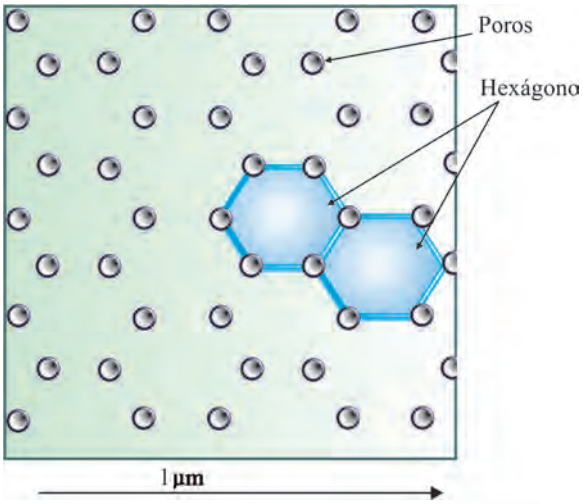


Fig. 23.4. Disposición de los poros. Tienen una disposición hexagonal y en el micrómetro representado existen 45 poros que ocupan aproximadamente 10 % de esta área.

Cada una de las membranas que forman la envoltura nuclear tiene una estructura semejante a la membrana descrita en el capítulo 20; sin embargo, cada una tiene sus particularidades. De las dos membranas, la que está en contacto con el citoplasma es continuación de las membranas del retículo endoplasmático rugoso, por lo que su composición (lipídica y proteínica) es casi la misma y contiene las proteínas que intervienen en el reconocimiento de los ribosomas. Al microscopio electrónico se observan los ribosomas funcionales adosados a esta.

La membrana interna posee proteínas y funciones nucleares específicas. Se le han reconocido aproximadamente 80 proteínas transmembranales diferentes, pero pocas han sido caracterizadas. Algunas se unen a la cromatina y otras a las proteínas de la lámina nuclear. Mutaciones en algunas de las proteínas de la membrana interna ocasionan enfermedades hereditarias.

Lámina nuclear

La lámina nuclear es un enrejado de proteínas fibrosas, del tipo de los filamentos intermedios, que se encuentran adosadas a la superficie interna de la membrana interna de la envoltura nuclear y en contacto con el jugo nuclear.

En los mamíferos la lámina nuclear está constituida por un enrejado de cuatro proteínas, las lamininas A, B1, B2 y C, que tienen aproximadamente de 60 a 80 kD cada una. La estructura de las lamininas es semejante a la de los filamentos intermedios del esqueleto citoplasmático (capítulo 22) (Fig. 23.5). Cada molécula de laminina tiene una estructura globular en cada extremo, unidas por un segmento en α-hélice; dos moléculas se enrollan entre sí y forman un dímero. Los dímeros se unen cabeza con cola y forman un filamento; estos se adosan entre sí, lado a lado, se entrecruzan y constituyen el enrejado.

Residuos de prenilo, unidos a los C terminales, unen las lamininas con la membrana interna y parecen unirse también con la cromatina (Fig. 23.6). Además de fijar la cromatina, la lámina nuclear parece intervenir en el mecanismo de la desagregación y reagregación de la envoltura nuclear durante la mitosis, mecanismo que está regulado por modificación covalente (procesos de fosforilación y desfosforilación).

ECMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

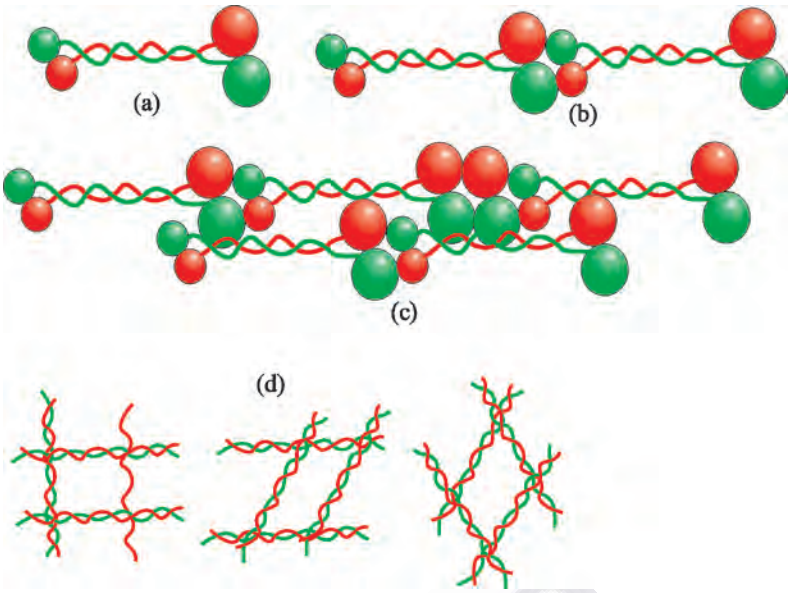


Fig. 23.5. Modelo de cómo se ensamblan las lamininas de la lámina nuclear: a) monómero; b) dímero; c) asociación entre estas y d) enrejado.

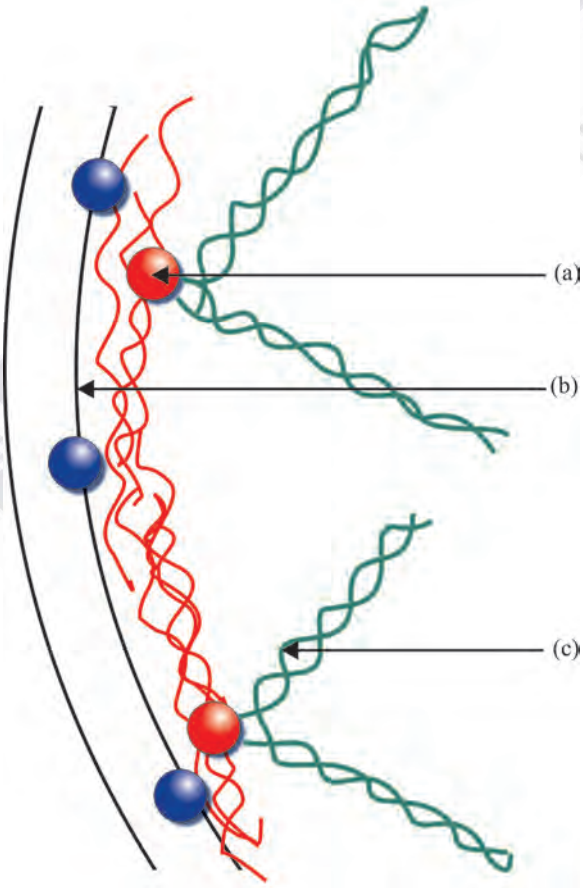


Fig. 23.6. Unión de las lamininas con los cromosomas: (a) unión de las lamininas con (b), la membrana interna, y (c), el cromosoma.

Complejo del poro nuclear

Es un complejo de muchas proteínas, denominadas nucleoporinas, que forman un canal –el poro nuclear–, se encuentran en la envoltura nuclear y permiten el paso selectivo de macromoléculas entre el citoplasma y el nucleoplasma.

Los poros (de 2 000 a 4 000 por célula) se pueden observar muy bien en una fotografía al microscopio electrónico (Fig. 23.7); parecen ser canales abiertos que conectan ambos compartimentos y están ocupados por un complejo proteico. El diámetro del poro es de 80 nm, sin el complejo proteico, y con este, de 9 nm.

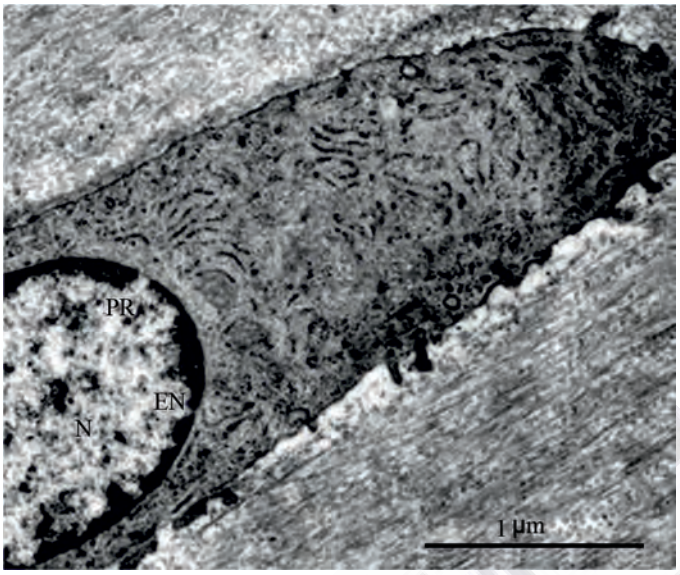


Fig. 23.7. Microscopia electrónica de trasmisión de cartílago. Puede observarse el núcleo (N), la envoltura nuclear (EN) y se visualiza con nitidez un poro nuclear (PR). Cortesía del Dr. en Ciencias Biológicas, Juan B. Kourí Flores, Investigador y Profesor Titular del Departamento de Patología Experimental 3-D CINVESTAV y miembro del Sistema Nacional de Investigadores, México, D.F.

Este complejo multiproteico es el complejo del poro nuclear, que tiene un peso de partícula de 125 millones de daltons en vertebrados, 30 veces mayor que el de un ribosoma, y el de levaduras tiene de 55 a 72 millones de daltons. Está formado por 30 polipéptidos diferentes que se denominan nucleoporinas (Nups). El complejo del poro nuclear tiene aproximadamente 145 nm de ancho y 80 de altura. Las Nups parecen estar distribuidas simétricamente en él y existen de cada una entre 8 y 56 copias. Sin embargo, en el complejo del poro nuclear de levaduras, cinco de estas se localizan exclusivamente en la cara nuclear y cuatro predominan en uno u otro lado. Siete de las Nups tienen secuencias repetidas de fenilalanina-glicina (F-G), las cuales, según algunos autores, son importantes en el mecanismo del paso a través del poro. Además, estas proteínas, por su localización en las estructuras periféricas, las hacen ideales para interactuar con los transportadores móviles.

Aún no se conocen todos los detalles de la estructura de este complejo, pero se puede afirmar que posee simetría octogonal. Dos aros finos bordean el poro por cada lado de la envoltura nuclear: uno por la cara nuclear y otro por la citoplasmática. Entre estos se encuentran, como en un emparedado, ocho subcomplejos o subunidades que se extienden entre estos aros y están formados por 20 de las proteínas del complejo del poro nuclear. Sus porciones más periféricas se relacionan con la fusión de las membranas externa e interna de la envoltura nuclear. Hacia ambas superficies –la citoplasmática y la nuclear– parten ocho filamentos, los de la cara citoplasmática tienen 2 nm de ancho y 50 nm de largo, y los de la cara nuclear poseen igual ancho, pero tienen 100 nm de largo. Estos ocho últimos se unen por sus extremos libres a una especie de aro que le da un aspecto de cesta de baloncesto al conjunto de filamentos nucleares con el aro (Fig. 23.8).

Aun cuando en estas subunidades la mayoría de las Nups parecen estar distribuidas de forma simétrica, se piensa que por el hecho de que se producen en estos poros tránsitos selectivos en ambos sentidos, debiera existir una asimetría en ellos. Además de estas translocaciones, ocurre el anclaje selectivo por ambos lados de la membrana, de los transportadores móviles: las importinas y las exportinas.

Hacia el centro de estas subunidades se encuentra un espacio ocupado, que se denomina transportador central. Este espacio se cierra y se abre como si fuera un diafragma, pero se desconoce su mecanismo. El transportador central es variable en su volumen y posición, lo cual para algunos autores sugiere que en realidad no exista y lo que se observa es que el canal esté ocupado o no por el paso de los transportadores móviles de entrada y salida unidos a sus cargamentos.

Se ha estudiado la Nup 133, miembro de una de esas subunidades, y se ha observado que su estructura está formada por diferentes dominios en ambos extremos. Por el dominio del carboxilo terminal se ancla, a través de la Nup 107, al subcomplejo y por el extremo amino terminal se pliega en una estructura de siete hojas, parecida a las aspas de un ventilador (Fig. 23.9).

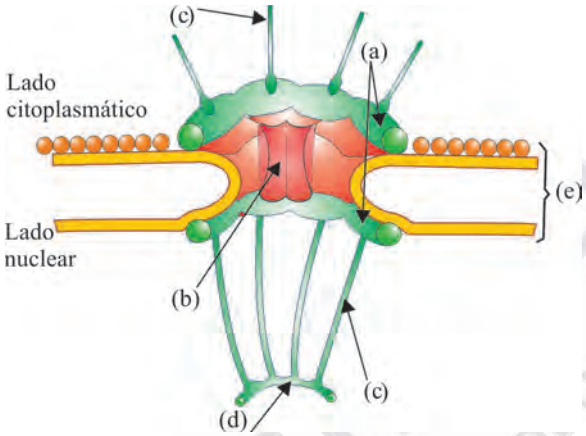


Fig. 23.8. Complejo del poro nuclear: (a) aros proteicos que bordean el poro por los lados citoplasmático y nuclear; (b) una de las ocho subunidades; (c) filamentos citoplasmáticos y nucleares y (d) aro que une estos últimos.



Fig. 23.9. Esquema del extremo amino terminal de la Nup 133. Se puede observar la conformación que asemeja las siete aspas de un ventilador.

Transporte a través del complejo del poro nuclear. Se han señalado dos mecanismos de paso por el complejo del poro nuclear: uno de difusión simple para iones y moléculas pequeñas, menores de 50 kD, y que pasarían por el espacio central de 9 nm de diámetro. Por este mecanismo pasan: el citocromo c (13 kD) que difunde libremente, y la ovalbúmina (43 kD), la cual demora en pasar, ya que la seralbúmina bovina (66 kD) no pasa. Más allá de 50 kD el paso es por transporte activo: requiere energía, depende de señales y tiene saturabilidad.

Las moléculas que pasan por este segundo mecanismo son reconocidas por transportadores móviles, las carioferinas (importinas y exportinas), y las pasan en una sola dirección. Este paso parece estar regulado por señales y el espacio central se abre más de 25 nm de diámetro, por donde pudieran pasar bien las subunidades ribosomales.

También entran por este mecanismo diversas proteínas que se sintetizan en el citoplasma: las ADN y ARN polimerasas, factores de transcripción, proteínas ribosomales, histonas (nucleoplasminas), y del núcleo al citoplasma salen sobre todo ARNm, ARNt y las subunidades del ribosoma.

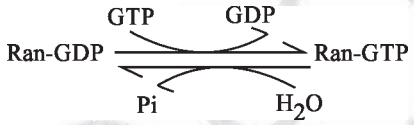
El transporte mejor estudiado ha sido el de las proteínas que pasan hacia el espacio nuclear. Estas proteínas tienen señales de localización nuclear, es decir, secuencias de aminoácidos reconocidas por receptores-transportadores, que las dirigen del citoplasma al núcleo. La primera señal descubierta fue la del virus del simio (SV40) y se reconoció como tal, ya que al sufrir una mutación en una secuencia aminoacídica, que contenía lisina, esto impidió su paso al núcleo. Luego se reconoció que la secuencia completa era -pro-lis-lis-lis-arg-lis-val-. Se han hallado otras señales de aminoácidos básicos, algunas bipartitas, como la de la nucleoplasmina: --lis-arg --10 aminoácidos--lis-lis-lis-lis--.

Las señales de reconocimiento de las proteínas ribosomales son diferentes y no se relacionan con las anteriores, que contienen aminoácidos básicos.

Los transportadores móviles de entrada son receptores citoplasmáticos y se denominan importinas. Poseen dos subunidades: la α y la β. La primera reconoce las señales básicas, presentes en las proteínas, y la segunda se une a los filamentos citoplasmáticos del complejo del poro nuclear. Las señales de las proteínas ribosomales son reconocidas por otras proteínas receptoras, semejantes a la subunidad β de la importina, y funcionan de manera diferente al mecanismo anterior de las importinas αβ.

También existen proteínas receptoras-transportadoras para la salida de compuestos del núcleo al citoplasma, las exportinas. Estas se asemejan también a las importinas β.

Para el paso por el complejo del poro nuclear se requiere de otra proteína –la Ran– una proteína G monomérica que cambia su conformación y actividad en dependencia de que esté unida al GTP o al GDP.



A través del poro se crea un gradiente de estas dos formas de la Ran, con mayor concentración de Ran-GTP del lado nuclear y mayor concentración de Ran-GDP del lado citoplasmático (Fig. 23.10).

El transporte de proteínas con señales básicas hacia el núcleo se lleva a cabo en cuatro pasos: el primer paso no requiere energía. La importina αβ se une por su subunidad α a la proteína diana y por su subunidad β a los filamentos citoplasmáticos del complejo del poro nuclear y se va "deslizando" por estos hacia la entrada del poro, lo atraviesa y se dirige a su salida. El segundo paso requiere energía. Al acercarse a la salida del poro, la Ran-GTP se une a la subunidad β, desplaza la Imp α-proteína y, como resultado, se desliga la proteína de la Imp α y quedan libres en el núcleo la importina α y la proteína. En el tercer paso, la Imp β-Ran-GTP pasa de nuevo por el poro, retorna al citoplasma y allí se hidroliza el GTP a GDP, lo que provoca la liberación de la subunidad β. La subunidad α libre también vuelve al citoplasma. La Ran-GDP vuelve al núcleo, donde se convierte de nuevo en Ran-GTP (Fig. 23.11).

El paso hacia el núcleo de los factores de transcripción está regulado por fosforilaciones-desfosforilaciones de proteínas inhibidoras que se unen a estos y enmascaran las señales nucleares.

Algo semejante ocurre con el traspaso de proteínas del núcleo al citoplasma, pero ahora funcionan las exportinas. El complejo Ran-GTP-exportina-proteína es estable. Al llegar al citoplasma e hidrolizarse el GTP, el complejo se desestabiliza y se libera la proteína (Fig. 23.12).

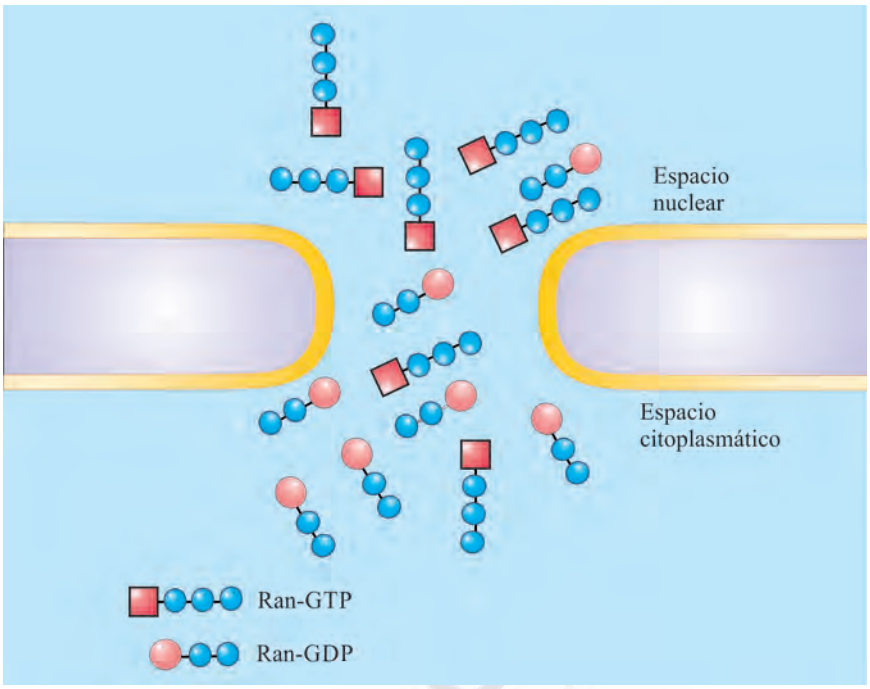


Fig. 23.10. Gradientes de concentraciones de la Ran-GDP y Ran-GTP a través del poro nuclear: la Ran-GTP tiene una mayor concentración del lado nuclear y la Ran-GDP del lado citoplasmático.

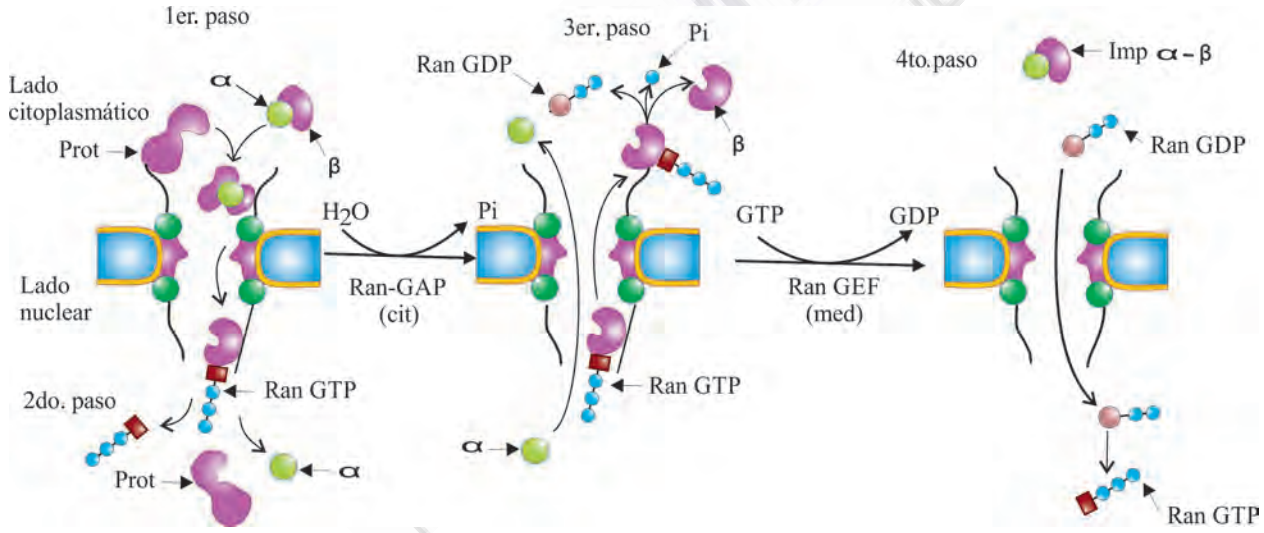


Fig. 23.11. Importe de una proteína. 1er. paso: se une la importina αβ con la proteína y se desliza a través del poro, donde se une a la Ran GTP. 2do. paso: en el lado nuclear se liberan la proteína, la subunidad α y la Ran GTP. 3er. paso: vuelven al lado citoplasmático la subunidad α y β-Ran GTP. Esta última se desdobla en subunidad β, Ran GDP y Pi. 4to. paso: se unen de nuevo la subunidad α con la β y la Ran GDP pasa al espacio nuclear y se transforman en Ran GTP, utilizando el Pi y la energía del ATP.

Los ARNs (ARNm, preARNm, snARN y subunidades ribosomales) requieren energía para pasar del núcleo al citoplasma y también utilizan la proteína Ran. Todos los ARN se transportan como ribonucleoproteínas y es al nivel de las proteínas donde se encuentran las señales para transitar al citoplasma. No se conocen las proteínas que transportan a los ARNt.

El paso de las histonas se realizaría por el mismo mecanismo de las importinas β, aunque para liberarse en el núcleo, la H2A y la H2B requieren, además de la Ran-GTP, al ADN, a diferencia de la H3 y H4 que no lo necesitan. Durante la síntesis de ADN por cada poro entran 10^6 moléculas de histonas en 1 min.

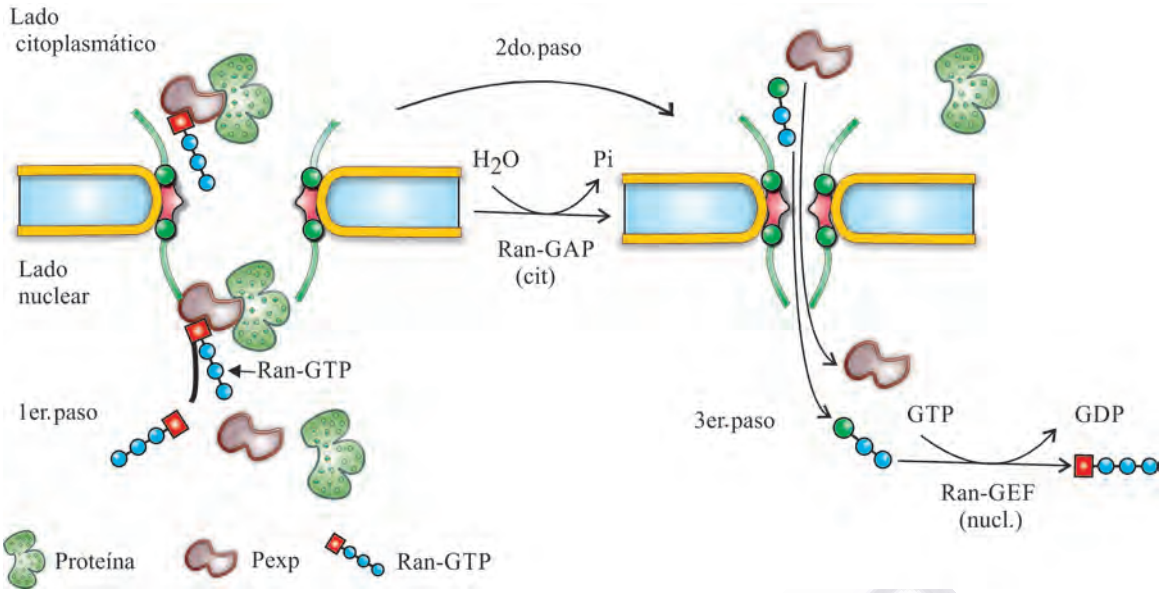


Fig. 23.12. Exporte de una proteína. Se observan el complejo del poro nuclear, las dos membranas y el espacio perinuclear. 1er. paso: se une la exportina con la proteína y la Ran-GTP, y se deslizan hacia el citoplasma por los filamentos. 2do. paso: se liberan la proteína, y la Ran GDP y la exportina. Estas dos vuelven al núcleo y la Ran-GDP, con gasto de energía, vuelve a ser Ran-GTP.

En cuanto a cómo se trasladan las carioferinas con sus cargas por el canal, existen teorías de que estas "caminan" y se "deslizan" a lo largo de las secuencias repetidas FG, que se encuentran tanto a lo largo de los filamentos como a lo largo de las Nups del canal. Las carioferinas con su estructura en forma de bote y con su cargamento se "deslizarían" sobre estos motivos FG uniéndose, desuniéndose y uniéndose de nuevo, moviéndose al azar bidireccionalmente, paso a paso, hasta salir del canal. Algunos autores niegan que los motivos FG sean necesarios para este traslado.

Nucléolo

El nucléolo es una estructura que se encuentra en el núcleo; se localiza en las zonas del ADN, denominadas organizadores nucleolares, donde se sintetizan los ARN ribosomales y se ensamblan las subunidades ribosomales.

En el nucléolo eucarionte ocurre la síntesis y el procesamiento del ARNr de 45 S (el preARNr) que va a dar origen a los ARNr definitivos de 5,8 S, 18 S y 28 S. En los nucléolos ocurre, además, el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas al unírseles a estos ARNr las proteínas ribosomales.

En el genoma humano, en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, existen 200 copias, organizadas en *tándems*, de estos organizadores nucleolares, y 2 000 copias, en el cromosoma 1, del gen que contiene la información para la síntesis del ARNr de 5 S. En los núcleos diploides existe el doble de organizadores nucleares que en las células haploides.

Cuando la célula está en interfase, las porciones del genoma de los organizadores nucleolares se encuentran desenrolladas y estos se transcriben de forma ininterrumpida. En estas regiones es donde se produce la organización de los nucléolos.

Si se realiza un corte que atraviese al nucléolo por el centro, se pueden observar porciones o capas: una central, fibrilar; una medial, la fibrilar densa, y la externa que es la granular (Fig. 23.13). La porción fibrilar se corresponde con los sitios desenrollados del genoma; la transcripción ocurre entre la capa fibrilar y la densa fibrilar. El procesamiento del ARNr de 45 S ocurre en la densa fibrilar y en el comienzo de la granular es donde se funden los pequeños cuerpos prenucleolares que contienen, entre otros, los factores

de procesamiento. Aun antes de terminar el procesamiento (formación de los ARNr definitivos) comienza el ensamblaje de 50 % de las proteínas ribosomales, que de acuerdo con un determinado orden y debido al reconocimiento molecular, se van agregando en partículas cada vez mayores y más complejas (capítulo 81). Estas proteínas se han sintetizado en el citoplasma, entran por los poros nucleares y llegan a los nucléolos. Por último, en la capa granular del nucléolo terminan de ensamblarse el resto de las proteínas ribosomales de la partícula mayor con los complejos ARNr-proteínas ribosomales. Ya en esta etapa se han separado y procesado los tres ARNr de esta subunidad mayor.

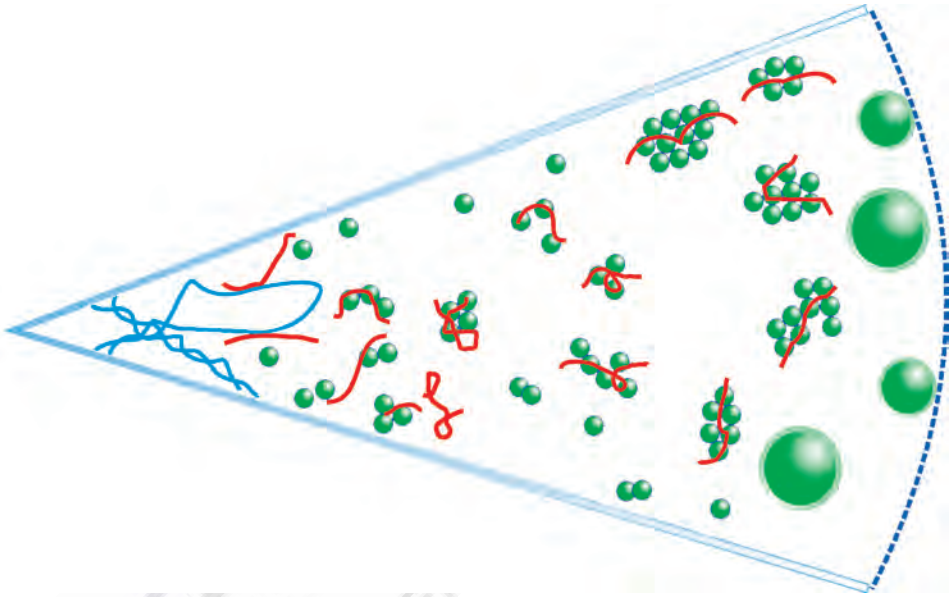


Fig. 23.13. Sección del nucléolo. En la porción central (vértice) se observa la transcripción de los transcriptos primarios de los ARN ribosomales (en rojo) y los ADN (en azul). En la medida que se avanza al exterior, se produce la maduración de aquellos y su unión con las proteínas ribosomales (en verde). En el borde se observan algunas partículas ribosomales mayores y menores.

El ARNr de 5 S también concurre en el nucléolo con las proteínas ribosomales de la subunidad menor del ribosoma. Esta partícula terminará de ensamblarse primero que la mayor. Finalmente las subunidades ribosomales de eucariontes de 40 S y 60 S se alejan del nucléolo y se exportan a través de los poros nucleares al citoplasma.

Nucleoplasma y matriz

El nucleoplasma es una continuación del citoplasma y contiene, como este último, un citoesqueleto semejante al del citoplasma. Los filamentos del carioesqueleto se unirían a los lazos de la cromatina en secuencias específicas del ADN, las denominadas SARs o MARs (*scaffold associated or matrix associated regions*, es decir, regiones asociadas al andamiaje o a la matriz). Esto anclaría a los lazos de la cromatina a regiones específicas de la membrana nuclear. En los espacios de la trama se encuentran solubilizados todos los componentes requeridos para la síntesis y el procesamiento de los ADN, los de los ARN y para las demás reacciones que ocurren en el núcleo. Sin embargo, algunos investigadores piensan que este carioesqueleto pudiera ser un artefacto de los experimentos.

Par cromatina-cromosoma

La cromatina es un complejo de proteínas y ADN que forma una estructura laxa y se encuentra en el núcleo celular durante la interfase.

El cromosoma es un complejo de proteína y ADN que forma una estructura muy condensada, se puede observar en el microscopio óptico y se encuentra en el núcleo celular durante la mitosis.

El par cromatina-cromosoma representa las dos formas de organización del material genético, ambas se caracterizan por la disposición estructural diferente de la desoxirribonucleoproteína en distintas etapas del ciclo celular. El cromosoma es su forma de organización compacta durante la mitosis; en esta forma de organización el material genético no se transcribe. La cromatina es la forma de organización un tanto desenrollada de esta desoxirribonucleoproteína, se encuentra en el núcleo en interfase y se transcribe continuamente. Se describirá primero la estructura de la cromatina, que es la menos compacta.

Cromatina

Cuando el núcleo está en interfase, parte de la cromatina permanece condensada –la heterocromatina– y el resto, descondensada, la eucromatina. Existen dos tipos de heterocromatina: la constitutiva y la facultativa. La primera nunca se transcribe y se corresponde con las secuencias satélites presentes en los centrómeros; contiene pocos genes y es responsable del funcionamiento adecuado de centrómeros y telómeros. La heterocromatina facultativa se transcribe o no en dependencia de la especialización celular. La heterocromatina se localiza en la periferia nuclear y unida posiblemente por varios sitios a las proteínas de la lámina nuclear. Uno de los cromosomas X de la hembra se encuentra inactivado en forma de heterocromatina.

La eucromatina se encuentra desenrollada, organizada en dominios, y se halla en forma de lazos de 50 a 100 kb, donde se transcriben las diferentes unidades funcionales de los genes. Cada ADN ocupa una región del núcleo y no se entremezcla con los demás ADNs. Entre estos se encuentran espacios en forma de canales y hacia ellos es que ocurre la síntesis de los ARN y su procesamiento. En estos canales parece que existen aislantes que no permiten que los procesos de ADNs vecinos se entremezclen.

La estructura de la eucromatina se estudió en el capítulo 11, donde se describió la estructura de los ácidos nucleicos y se conoció la estructura secundaria del ADN, específicamente la del modelo de Watson y Crick. En el núcleo en interfase dicha estructura está organizada de modo que de trecho en trecho forman nucleosomas, complejos supramacromoleculares del ADN con proteínas básicas –las histonas. Al observarla al microscopio electrónico parece conformada como un collar, cuyas cuentas se encuentran algo separadas entre sí (Fig. 23.14). Las cuentas están formadas por los nucleosomas, estructuras que se describen a continuación, y las porciones entre las cuentas están formadas por la estructura del ADN de doble banda.



Fig. 23.14. Estructura de la cromatina. Se observan los nucleosomas como cuentas de un collar (octámero de histonas, enrolladas por el ADN) y separadas por el ADN espaciador.

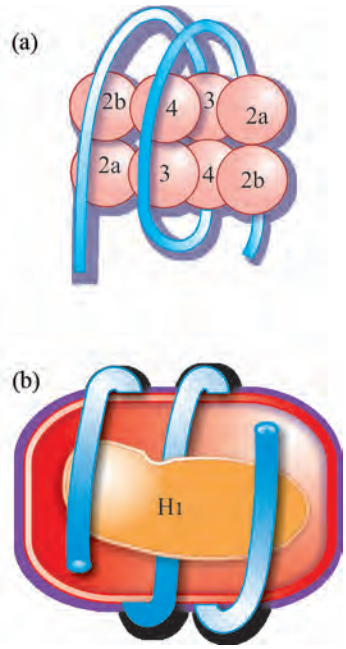


Fig. 23.15. Estructura del nucleosoma: (a) en el esquema que representa la estructura del nucleosoma, se observan las ocho histonas: se aprecian separadas para mostrar la relación entre estas y con el ADN que las rodea; (b) se observa la relación que mantiene la histona 1 con el nucleosoma.

El nucleosoma está formado por el ADN de doble banda, enrollado sobre un octámero de proteínas básicas –las histonas. Estas proteínas están muy conservadas (apenas existen diferencias entre las del frijol y las de la vaca), y se presentan cinco tipos diferentes. Se diferencian en su secuencia de aminoácidos por su peso molecular y su contenido en aminoácidos básicos. Además, dichas proteínas están muy modificadas, ya que presentan metilaciones, fosforilaciones y adenilaciones.

Tipo de histona	H_1	H_{2a}	H_{2b}	H_3	H_4
Peso molecular (kD)	21	14,5	13,7	15,3	11,3
Relación lis/arg	20	1,2	2,5	0,7	0,8

El octámero está formado por $(H_{2a})_2(H_{2b})_2(H_3)_2(H_4)_2$; tiene 110 nm de largo por 55 nm de ancho. En el centro del octámero se encuentra el tetrámero $(H_3)_2(H_4)_2$ y a cada lado de este se hallan los dímeros $(H_{2a})(H_{2b})$. El ADN se enrolla 1 ⅔ veces sobre el octámero; esta porción enrollada se corresponde con 146 pb. La porción de ADN que queda entre dos nucleosomas adyacentes varía en longitud, pudiendo ser entre 8 y 114 pb (promedio 55 pb); a esta porción del ADN se le denomina espaciador. La H_1 parece quedar unida a los dos extremos del ADN, el que comienza a enrollarse en el nucleosoma, donde termina el enrollamiento, y en el espacio que queda entre ellos. La H_1 contribuye al empaquetamiento posterior de la cromatina al formarse el solenoide (Fig. 23.15).

La organización de los nucleosomas en la cromatina no es siempre la misma, varía en los genes activos, donde se produce el corrimiento del nucleosoma y queda entonces desenrollada otra porción distinta del ADN.

Durante la replicación se deben formar nucleosomas nuevos al irse duplicando el ADN. Parece que los nucleosomas viejos, en ocasiones, quedan en una banda, y otras veces en la otra. En la formación de los nuevos nucleosomas, además de las histonas y el ADN, intervienen la nucleoplasmina y la topoisomerasa I (capítulo 25). La primera es una proteína "chaperona" que pone en contacto al ADN con las histonas e impide asociaciones erróneas. La topoisomerasa I es necesaria para proporcionar el nivel necesario de superenrollado del ADN sobre el octámero.

Formación de los cromosomas

Luego de la replicación, las dos cromátidas hermanas quedan unidas por las cohesinas y por el centrómero. Las cromátidas formadas por la cadena de nucleosomas se enrollan y originan una estructura en solenoide. En la figura 23.16 se observa cómo se va compactando la cromatina hasta la formación del cromosoma.

Cada cromosoma está formado por una molécula de ADN. Como ejemplo de este empaquetamiento se hace referencia al primer par de cromosomas humanos (ver los pares humanos en el esquema de un cariotipo humano en la figura 23.19). Si se compara el ADN totalmente descompactado con el cromosoma, la relación es 7 000/1. Cuando se encuentra desenrollado tiene una longitud de 7,2 cm y compactado en el cromosoma su largo es de 10 μm.

Sin embargo, como parte de la cromatina está condensada en el núcleo en interfase, al pasar a la fase mitótica la condensación es solo 50 veces, aunque es notable el cambio que se observa. Los extremos de las moléculas de ADN –los telómeros– también se encuentran en forma de heterocromatina en el núcleo en interfase; esto los protege de ser reconocidos como cromosomas rotos por la maquinaria de reparación del ADN que pudieran alterar su longitud. En la heterocromatina de los telómeros se han reconocido muchas proteínas de este silenciamiento, proteínas SIR (*silence information regulator proteins*) que reconocen las histonas de las colas, que están poco acetiladas. La histona desacetilasa SIR 2 crea un patrón único para esta heterocromatina de las colas.

En la condensación de los cromosomas participan unas proteína, las condensinas, que requieren la energía del ATP. Las condensinas son grandes complejos proteicos. Una de esas proteínas es larga, dimérica y tiene algo semejante a una bisagra en la porción central, por donde la molécula se dobla. Hacia ambos extremos posee dominios globulares con afinidad por el ADN y que hidrolizan al ATP. En su acción forman grandes lazos derechos de 10 000 nucleótidos, utilizando la energía de hidrólisis del ATP (Fig. 23.17).

Los extremos de las moléculas de cada ADN también están compactados de manera especial. Las cromátidas se condensan cada vez más y quedan recubiertas con moléculas de ribonucleoproteínas y unidas por el centrómero (Fig. 23.18).

El centrómero es una región constreñida del cromosoma mitótico que une las cromátidas hermanas, donde se unen, además, los microtúbulos del huso mitótico.

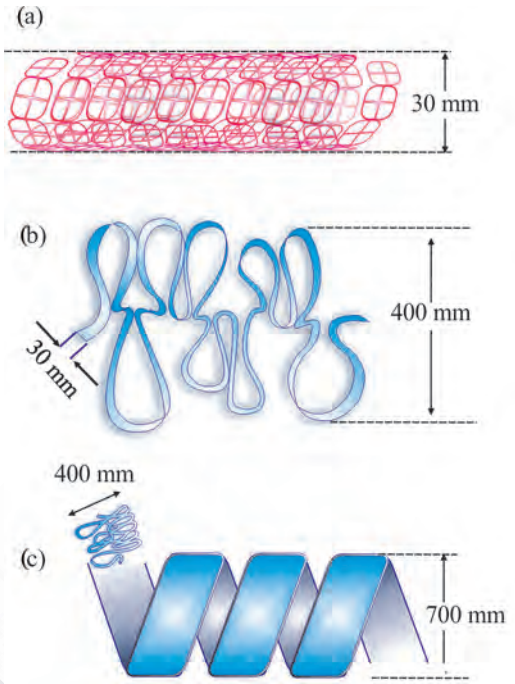


Fig. 23.16. Compactación de la cromatina hasta la formación del cromosoma: (a) la cromatina se compacta en una figura que recuerda un solenoide; (b) el solenoide se compacta aún más en lazos muy unidos y (c) un enrollamiento mayor pudiera formar el cromosoma.

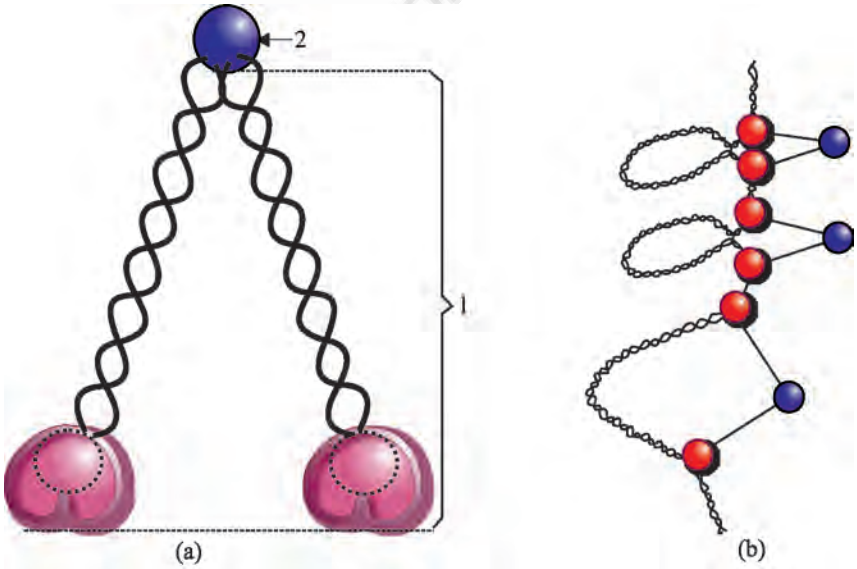


Fig. 23.17. Acción de la condensina. En (a) se observan: 1) sus dos brazos largos que terminan con su sitio de reconocimiento para el ADN y 2) su zona en bisagra. En (b) se observa cómo al cerrarse la bisagra, se forman los lazos en el ADN.

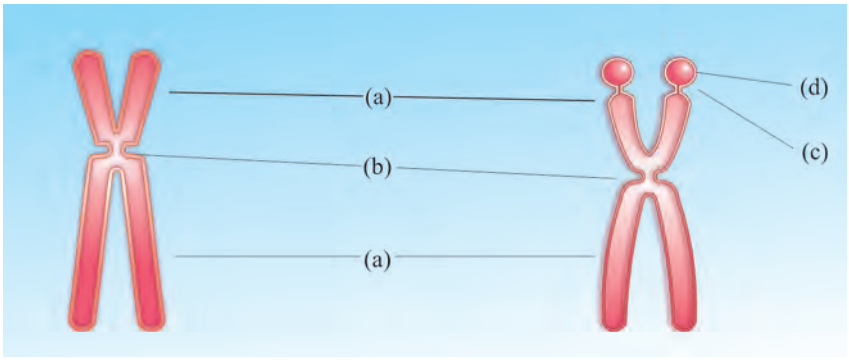


Fig. 23.18. Partes de un cromosoma. Se representan dos cromosomas, en estos se observan: (a) brazos; (b) centrómero (constricción primaria); (c) constricción secundaria y (d) satélite.

El centrómero, denominado también heterocromatina céntrica, no contiene genes y los que allí se incluyen, quedan silenciados. Presenta secuencias de nucleótidos del ADN que dirigen el movimiento de los cromosomas durante la división mitótica. En los centrómeros humanos se encuentran secuencias repetidas cortas que se denominan satélites α del ADN; posee, además de las histonas, otras proteínas que compactan a los nucleosomas en arreglos más densos. Al centrómero se unen las proteínas de los microtúbulos, y sus señales hacen que estos se unan temprano en la mitosis.

Cromosomas: forma y tamaño

En cada cromosoma se pueden distinguir estructuras características. En la figura 23.18 se muestran dos cromosomas tipo. Se observa que están formados por cuatro brazos (que pueden ser largos o cortos) y el centrómero, que une los cuatro brazos. A veces los brazos presentan constricciones y, como a la constricción que se forma al nivel del centrómero se le denomina primaria, a estas que se forman en los brazos se les denomina secundarias. Al pequeño fragmento de brazo que queda terminal a la constricción secundaria se le denomina satélite (ver Fig. 23.18).

Existen métodos que permiten de forma experimental –en el laboratorio– fotografiar todos los cromosomas que pertenecen a una misma célula. Como todas las células de un mismo organismo (en la misma especie animal o vegetal) tienen igual dotación genética, se puede tomar para este estudio una célula de cualquier tejido. Generalmente este estudio se lleva a cabo en los leucocitos. Una fotografía ampliada de los cromosomas en mitosis muestra que todos los cromosomas no son iguales y que difieren en su tamaño y forma. Si de la fotografía ampliada se recorta cada cromosoma y luego se le da un orden, según su tamaño, de mayor a menor sobre un papel, se observa que siempre se obtiene la misma distribución de los cromosomas para cada especie; esta distribución característica se denomina cariotipo.

Cariotipo humano normal

El cariotipo es el conjunto de las imágenes de todos los cromosomas que posee una especie determinada, separadas por su tamaño y la posición de su centrómero.

Cada especie animal posee un número constante de cromosomas: el hombre, 46 (23 pares, incluso el sexual); el gato, 38; el maíz, 20 y la *Escherichia coli*, 1. Para el hombre, el cariotipo normal se compone por siete tipos de cromosomas que difieren en su tamaño y la posición del centrómero, como características más relevantes (Fig. 23.19).

Al estudiar el cariotipo, para ver si existen alteraciones, se tienen en cuenta el tipo de cromosoma, su tamaño relativo y la posición del centrómero. De la observación del cariotipo de un individuo se pueden determinar el sexo y las alteraciones que existen en el número y la estructura de estos.

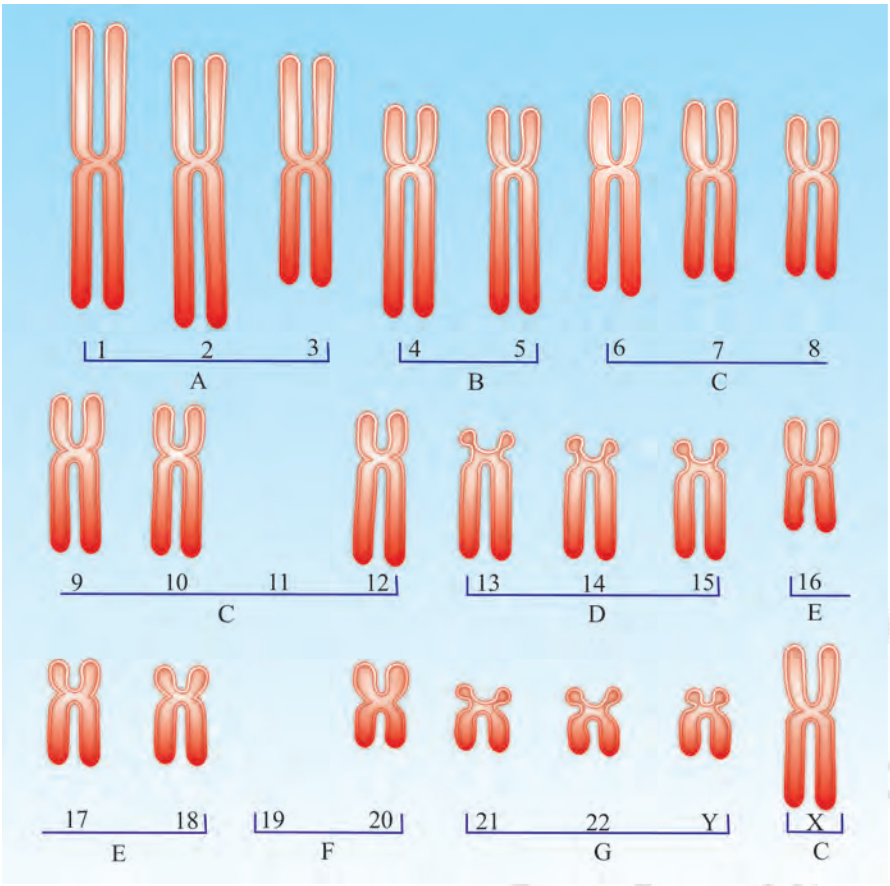


Fig. 23.19. Cariotipo humano normal. Grupo A: metacéntricos (tienen los brazos del mismo largo). Grupo B: submetacéntricos (los brazos tienen tamaños diferentes); grupo C: submetacéntricos (los brazos son iguales a los del grupo anterior, pero tienen menor tamaño); grupo D: acocéntricos con satélite (uno de sus pares de brazos es más corto); grupo E: metacéntricos y submetacéntricos (de menor tamaño que los del grupo C); grupo F: metacéntricos y grupo G: acocéntricos con satélite y sin este.

Alteraciones del cariotipo

Los cambios en el número o en la estructura de los cromosomas provocan graves enfermedades. Cuando falta una copia de los cromosomas no sexuales (autosomas) la consecuencia es letal. Si se tienen tres copias de un cromosoma, la supervivencia es escasa, pero la trisomía del cromosoma 21 es viable. Esta anormalidad se conoce como síndrome de Down (antiguamente la denominaban mongolismo). Es el más frecuente de los trastornos cromosómicos del hombre y depende mucho de la edad en que la mujer se embaraza. En mujeres con menos de 29 años, la posibilidad de que un hijo suyo tenga esta anormalidad cromosómica es 1/2 000, pero en mujeres mayores de 45 años la frecuencia de tener un hijo con síndrome de Down es 1/50.

En los individuos afectos por esta alteración, la simple observación los descubre; entre otros signos se observan baja estatura, perfil facial plano, fisuras palpebrales oblicuas, lengua voluminosa, manos anchas y cortas. El retraso mental generalmente es intenso, pero tienen un carácter tímido y apacible.

Existen muchas otras enfermedades con alteraciones de los cromosomas. En el síndrome de Klinefelter, el trastorno se presenta en los cromosomas sexuales y el cariotipo anormal es 47XXY, pero también puede ser 47XXXY o 47XXXXY. Estos enfermos presentan esterilidad y ligera disminución de la inteligencia.

Mitosis

La mitosis es el proceso mediante el cual ocurre la duplicación de las células eucarióticas e implica la duplicación del ADN nuclear. Este proceso ocurre en la fase M del ciclo celular (capítulo 29).

El paso de una fase a la otra del ciclo celular depende de proteínas reguladoras: proteínas quinasas, ciclinas y fosfatasas, entre otras. Las quinasas y fosfatasas se encuentran presentes durante todo el ciclo celular, pero generalmente se hallan inactivas. Las quinasas comienzan a activarse cuando las ciclinas se unen a estas. Estas diferentes ciclinas aparecen al ir transcurriendo las diversas fases del ciclo celular (capítulo 25).

El comienzo de la fase M del ciclo celular depende de varias fosforilaciones, provocadas por la M-Cdk activa. La M-Cdk inactiva se forma al unirse la ciclina M con una quinasa –la Cdk (*cyclin dependent kinase*). Durante fases anteriores, la ciclina M se había estado transcribiendo y ya al completarse la fase S, se encuentra unida a la Cdk, que es cuando puede activarse.

Activación de la M-Cdk. La M-Cdk puede ser entonces fosforilada por dos quinasas: la CAK (*Cdk activator kinase*) y la llamada Wee-1. El fosfato aportado por la CAK es activador, pero las desfosforilaciones de la Wee-1 son inhibidoras. Al final de la fase G_2 los fosfatos inhibidores son hidrolizados, lo cual la activa totalmente. La M-Cdk interviene en su propia activación, pues activa a su activador e inhibe a su propio inhibidor.

Una poloquinasa puede fosforilar una subpoblación de la M-Cdk inactiva con un fosfato en el sitio activador. Esta subpoblación activa fosforila la quinasa Wee-1 (quinasa inhibidora) y la inactiva, pero también al fosforilar la fosfatasa Cdc-25, esta se activa y precisamente su función es la de activar la M-Cdk trifosfatada, al hidrolizar sus dos fosfatos inhibidores. Cuando se activa totalmente, se producen fosforilaciones en proteínas específicas, lo que provoca cambios en diversos niveles:

- La fosforilación de proteínas asociadas con los microtúbulos causa la formación del huso mitótico. El huso mitótico es la disposición de los microtúbulos que ocurre durante la mitosis, en la cual estos se colocan entre los dos polos de la célula en forma de áster y cuya función es la de separar las cromátidas hermanas hacia las dos nuevas células.
- Las lamininas fosforiladas llevan a la desintegración de la envoltura nuclear.
- Varias subunidades de las condensinas fosforiladas causan la condensación de los cromosomas y el nucléolo desaparece.
- Cambia la organización del retículo endoplásmático (RE) y del aparato de Golgi, la célula pierde su adhesión a otras células y a la matriz extracelular, y el citoesqueleto se reorganiza. Los filamentos intermedios no experimentan cambios, pero los microtúbulos sí, y los filamentos de actina y miosina que estaban en forma de fibras, denominadas de estrés, se desensamblan.

Todos estos cambios iniciales implican otros procesos con los que continúa la mitosis, hasta que ocurre la separación de las células hermanas.

Por su complejidad y para facilitar su descripción, la mitosis suele dividirse en etapas:

- Profase.
- Prometafase.
- Metafase.
- Anafase.
- Telofase.
- Citocinesis.

Preparación para la mitosis. La primera fase de la mitosis es la profase, pero antes, en las fases anteriores han ocurrido procesos que prepararon la célula para su división en las dos células hermanas:

- El ADN ya se encuentra replicado (fase S), pero las cromátidas hermanas permanecen pegadas a todo lo largo por las cohesinas y el centrómero.

– También ha ocurrido la duplicación de los centríolos durante la interfase; estos se encuentran perpendiculares (a ambos lados del núcleo), rodeados por una nube amorfa (el material pericentriolar) y por microtúbulos que parten hacia todas las direcciones, por ello se denominan microtúbulos astrales (deriva de la palabra estrella). Cada microtúbulo tiene su extremo (-) dirigido hacia los centríolos y su extremo libre es el (+).
– Durante la interfase los microtúbulos se encuentran en una estabilidad dinámica: se acortan y desaparecen (esto se conoce como catástrofe de los microtúbulos) o se alargan y se forman (rescate de los microtúbulos).

Profase. Formación del huso mitótico, condensación de los cromosomas y desintegración de la envoltura nuclear.

En la profase, la M-Cdk activa fosforila a dos proteínas que controlan la dinámica de los microtúbulos:

– Las MAPs (*microtubule associated proteins*) que los estabilizan y aumentan los rescates.
– Las proteínas motoras de los microtúbulos, que disminuyen su estabilidad y aumentan las catástrofes. En general, la vida media de los microtúbulos se acorta.

Al separarse los centríolos, sus microtúbulos astrales han ido creciendo y acaban por rodear al núcleo. Se ha formado el huso mitótico. En esta posición se observa que el núcleo está rodeado por los filamentos que quedan tendidos entre los centriolos, como rayos que unen a dos soles; en el centro sus extremos positivos se interdigitan (Fig. 23.20).

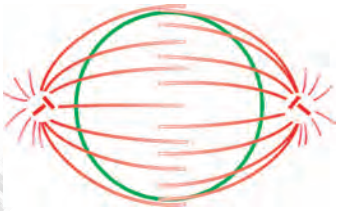


Fig. 23.20. El huso rodea al núcleo.

Los extremos (-) de los microtúbulos quedan hacia el centrosoma y allí se encuentra una proteína motora que mediante la formación de oligómeros une a los microtúbulos adyacentes del mismo polo, y los mueve uno respecto de los otros (los rota). El extremo (+) es el más alejado del centrosoma. Estos extremos pueden quedar libres o a veces se unen por detrás del centríolo al interior de la membrana plasmática; estos son los que fijan la posición del huso. Los (+) que quedan hacia el centro del huso mitótico se interdigitan con los que vienen del polo opuesto y así forman los microtúbulos ecuatoriales, cuya función es darle la simetría al huso. Otra proteína motora puede deslizar los extremos de estos microtúbulos ecuatoriales y así se acorta o se alarga la separación entre los dos centrosomas polares.

Todas estas proteínas motoras gastan ATP durante su función. En resumen, el huso mitótico durante la profase tiene dos tipos de microtúbulos: los astrales y los ecuatoriales o de sobrelapamiento. Luego, en la prometafase aparece un tercer tipo, los de unión al cinetocoro. Los tres tipos de microtúbulos son distintos, pues a cada uno se asocian proteínas diferentes.

El segundo proceso de la profase es la condensación de los cromosomas. Estos se acortan unas 50 veces. La M-Cdk fosforila una de las subunidades del complejo de las condensinas con gasto de ATP y poco a poco ocurre la condensación de los cromosomas. Las condensinas actúan de forma secuencial y dependen del buen funcionamiento que han tenido las cohesinas que unen a las cromátidas. Cohesinas y condensinas tienen estructuras semejantes. Menos las que están a nivel de los centrómeros, las cohesinas se van liberando y las condensinas van actuando. Las condensinas quedan en los ejes de los brazos del cromosoma (ver Fig. 23.17).

La cromatina que se ha ido condensando, se aproxima a la envoltura nuclear y en el centro del núcleo aparece un vacío. La condensación de la cromatina es cada vez mayor, hasta que llegan a formarse los cromosomas.

El tercer proceso es el desensamblaje de la envoltura nuclear, al ser fosforiladas las lamininas por la M-Cdk. Algunas lamininas quedan unidas a los cromosomas y otras a partículas de las membranas.

La desintegración de la membrana marca el final de la profase y el paso a la prometafase.

Prometafase: busca y captura de los cromosomas por los microtúbulos. Toda vez desensamblada la envoltura nuclear, los microtúbulos polares se introducen en la zona que ocupaba el núcleo y quedan entre ambos polos e invaden esta zona con sus extremos positivos interdigitados, es la fase denominada por algunos autores como de busca y captura. En cada centrómero, a nivel del cinetocoro, hasta 40 microtúbulos pueden unirse en los vertebrados por cada lado del cromosoma. Los microtúbulos que se unen, se estabilizan y ya no sufren catástrofes. La unión ocurre primero por un costado del microtúbulo, pero enseguida se produce un deslizamiento hasta que el extremo contacta con el cinetocoro y se realiza la unión terminal. Esto ocurre por ambos lados del cromosoma y provoca que ellos se coloquen de forma vertical al huso.

Metafase: la orientación direccional de los cromosomas en el plano ecuatorial. Los cromosomas se mueven durante la metafase como en un vaivén entre ambos polos, hasta que ocupan un plano que queda perpendicular entre los dos polos, a este plano se le denomina placa ecuatorial. En este movimiento parece intervenir el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos. Los microtúbulos unidos por ambos lados al cinetocoro, halan a los cromosomas hacia los polos, pero también los brazos de los cromosomas se encuentran unidos a los microtúbulos astrales que los halan al plano ecuatorial. En ambos casos intervienen proteínas motoras. Llegan a ocupar la placa ecuatorial cuando se alcanza el equilibrio entre el ensamblaje y el desensamblaje por ambos lados del cromosoma. El desensamblaje atrae los cromosomas hacia los ásteres, siendo la atracción de mayor intensidad mientras más alejados se encuentran de los polos; en cambio, es menor cuando están más cercanos (Fig. 23.21a).

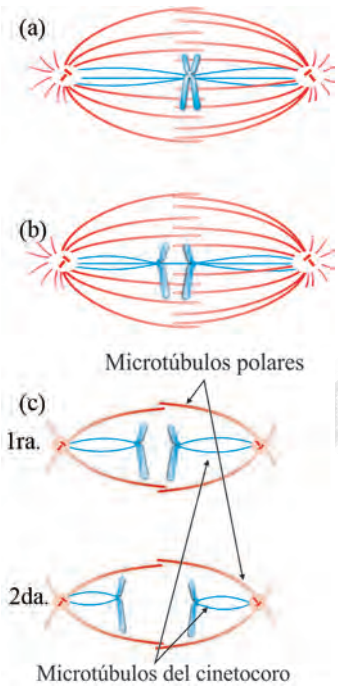


Fig. 23.21. Etapas de la mitosis: (a) solo se representa uno de los cromosomas. La orientación se logra al contactar los microtúbulos de cada cinetocoro, hacia ambos lados del cromosoma, con la zona que rodea los centríolos; (b) separación de las cromátidas; (c) fuerzas que al parecer provocan la separación de las cromátidas: en la 1ra. una de estas parece ser la separación de los centríolos y se observa menor interdigitación de los microtúbulos polares; en la 2da. la otra pudiera ser el acortamiento de los microtúbulos del cinetocoro.

Los microtúbulos astrales crecen lentamente por su extremo (+), pero se encogen rápido (los del cinetocoro no sufren estas transformaciones). En general se adiciona tubulina por el (+) y la pierden por el (-). En los vertebrados, los cromosomas no son pasajeros pasivos, ya que crean a su alrededor un ambiente favorable a la nucleación y la estabilización de los microtúbulos; esto depende de una proteína GEF (*guanin enucleotide exchange factor*) que se encuentra unida a la cromatina y estimula a la Ran –una GTPasa pequeña– que al activarse libera a las proteínas estabilizadoras de los microtúbulos que se hallan en complejos proteicos en el citosol, lo cual estimula la nucleación de los microtúbulos alrededor de los cromosomas. El equilibrio puede durar algún tiempo y la mitosis, por ello, otro tiempo durante el cual queda detenida en esta fase. La metafase ocupa la mitad del tiempo que dura la mitosis. La señal para la separación de las cromátidas solo llega cuando todos los cromosomas han sido atados por ambos lados.

La mitosis no avanza hacia la anafase si algún cromosoma no está unido por ambos lados. Los cinetocoros no unidos o los que no estén en tensión por ambos lados emiten una señal que impide el paso hacia la anafase. Primer punto de control de la mitosis.

Anafase: la separación de las cromátidas. El APC (*anaphase promoting complex*), complejo promotor de la anafase, permite el paso de la metafase a la anafase. Durante la mitosis ha ido aumentando la concentración de este complejo proteico. Este complejo es una ubiquitina ligasa. La APC se activa al ser fosforilada por una quinasa (desconocida), y esto ocurre cuando se le une Cdc20. La APC, ubiquitinas y enzimas específicas marcan la ciclina M y la segurina (proteína inhibidora de la separasa), que entonces son degradadas por el proteosoma.

La separasa, ahora activa, hidroliza una de las proteínas del complejo de la cohesina que se inactiva; las cromátidas pueden separarse y formar los cromosomas hermanos, por lo que comienzan su movimiento hacia los polos (Fig. 23.21b).

Las fuerzas que separan los cromosomas son diferentes en los dos estados de la anafase. En la anafase-A las fuerzas que separan las cromátidas hermanas son las catástrofes de los microtúbulos:

– Al nivel del cinetocoro y que dependen de sus proteínas motoras.
– Al nivel de los polos: en la anafase-B las fuerzas que separan cada vez más los polos son:
  • El deslizamiento de los microtúbulos de sobrelapamiento ecuatoriales que alargan la distancia entre los polos.
  • El acercamiento de los polos a la superficie celular por proteínas motoras de los microtúbulos astrales.

Los procesos que ocurren al nivel del cinetocoro no se entienden bien, pues a pesar de que los microtúbulos se desensamblan a este nivel, permanecen unidos al cinetocoro. La migración de cada cromosoma hermano a su polo se realiza a una velocidad aproximada de 1 μm/min, movimiento en el cual los centrómeros parecen arrastrarlos tras sí. Los filamentos de los cinetocoros se acortan hasta un quinto de su longitud original (Fig. 23.21c).

Telofase: reaparición del núcleo. Al inactivarse la M-Cdk, las fosfatasas que siempre han estado presentes comienzan a desfosforilar proteínas: los cromosomas se descondensan, el huso se desensambla y el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi se reorganizan. Las proteínas de membrana desfosforiladas se reasocian y rodean los cromosomas, primero en grupos, luego se funden todas las vesículas en una sola y reforman la envoltura nuclear que vuelve a tener continuidad con el retículo endoplasmático. Durante esta fusión se va incorporando también el complejo del poro nuclear. Las lamininas desfosforiladas se organizan en su entramado original. Por los poros comienzan a entrar las proteínas y se resume la transcripción, así como la formación de nucléolos.

Citocinesis. La citocinesis se extiende desde la anafase hasta el comienzo de la interfase; consta de cuatro estadios: iniciación, contracción, inserción de membranas y terminación (Fig. 23.22).

Durante la anafase comienza a formarse un pliegue por fuera de la célula mitótica que se extiende y profundiza, y llega a rodear toda la célula. Su posición externa coincide con el plano ecuatorial del huso mitótico que se encuentra en el interior de la célula. También en esta posición se forma, por la cara interna de la membrana plasmática, un anillo contráctil cuyas proteínas más importantes son la miosina II y la actina. Una GTPasa pequeña, que estimula la polimerización de la actina, denominada proteína Rho A, se requiere para la citocinesis.

La posición de este anillo parece depender en algunas células de las proteínas motoras de los microtúbulos de sobrelapamiento de huso y en otras células de los microtúbulos astrales. Si se cambia la posición del huso con una aguja fina, el surco desaparece y reaparece, y coincide con el ecuador de la nueva posición del huso.

El mecanismo de la contracción del anillo no es el mismo que ocurre en el músculo estriado, más bien es el de la musculatura lisa y requiere Ca^{2+}-calmodulina. Debajo de la membrana plasmática y durante toda la anafase y la telofase se va constriñendo el anillo; su grosor y volumen no varían, a pesar de ser cada vez menor su circunferencia, por lo que se presume que de alguna forma se van perdiendo filamentos. Vesículas membranosas se van fundiendo en sitios cercanos a la contracción y de esta manera va aumentando el área de la membrana plasmática, al irse separando ambas células.

Al finalizar la telofase y comenzar la interfase, el anillo contráctil desaparece, pero queda entre ambas células, durante un tiempo, una tetilla que contiene restos del huso ecuatorial. En algunas células ocurre, sin que se tenga una explicación para ello, que el centríolo madre de uno o ambos lados de la célula se traslada a esta tetilla,

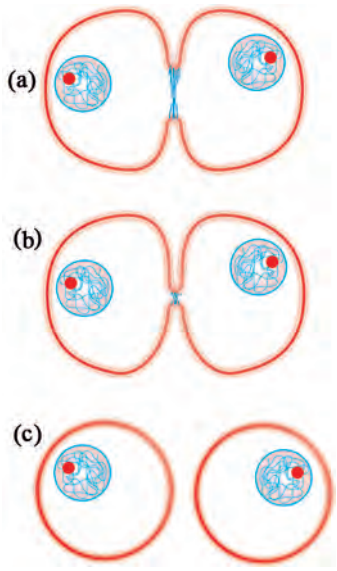


Fig. 23.22. Citocinesis. En el ecuador de la célula en división se forma un anillo de actina que se va constriñendo: (a) poco a poco; (b) con posterioridad y (c) finalmente se separan ambas células.

permanece allí unos minutos y se retira, entonces ambas células se separan y concluye la citocinesis.

El resto de los organelos celulares (mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático) que se han venido duplicando durante el ciclo celular, quedan repartidos entre ambas células hermanas.

En algunas células la división es asimétrica y en estos casos quedan en una de ellas componentes diferentes, denominados determinantes del destino, que marcan caminos diferentes para cada célula.

Resumen

El núcleo, organelo propio de los organismos eucariontes, está formado por una membrana o envoltura nuclear –la cromatina–, al menos un nucléolo y el jugo nuclear o nucleoplasma.

La envoltura nuclear está constituida por dos membranas, con un espacio intermembranoso entre estas, y la atraviesan poros, a través de los cuales se ponen en comunicación el nucleoplasma con el citoplasma, pero mediante estos solo pasan algunas sustancias (paso selectivo). La membrana externa de la envoltura nuclear se parece mucho al retículo endoplasmático rugoso y es, de hecho, una continuación de este. Por el contrario, la membrana interna no contiene ribosomas en su superficie, posee proteínas y funciones específicas. Dentro de la membrana interna se encuentra la lámina nuclear, formada por cuatro proteínas en los mamíferos, que se denominan lamininas. La estructura de estas es semejante a la de los filamentos intermedios. Esta estructura es importante, pues, además de fijar la cromatina, interviene en el mecanismo de la desagregación y la agregación de la envoltura nuclear durante la mitosis.

Formando parte de la envoltura nuclear se encuentran los complejos del poro nuclear. Estos tienen paso selectivo y, obviando los iones y las moléculas de bajo peso molecular, todos los demás componentes que pasan por este lo realizan con gasto de energía. El paso a través del CPN requiere señales en las sustancias que deben ser transportadas y que son reconocidas por proteínas denominadas importinas y exportinas. A través del poro nuclear salen los diferentes ARN y las subunidades ribosomales, y entran las enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, cofactores, sustratos, histonas y otros.

El nucléolo es el sitio de formación de los ARN ribosomales, que se localiza en las porciones del genoma, denominadas organizadores nucleolares. Allí se "ensamblan" los ARN ribosomales con las proteínas ribosomales, sintetizadas en el citoplasma, y se forman las dos subunidades del ribosoma que luego salen por los poros hacia dicho espacio celular.

La matriz nuclear o nucleoplasma es una continuación de citoplasma y contiene, como este último, un citoesqueleto. Entre otras funciones fijan los lazos de la cromatina a la membrana nuclear.

La cromatina es la forma de organización del material genético durante la interfase. En esta fase del ciclo celular ocurre de forma intensa la síntesis de ARNm y del propio ADN en las células que están en división. Estos procesos se facilitan, ya que la cromatina está descondensada en algunos sectores. A esta cromatina descondensada se le conoce como eucromatina y la que permanece condensada es la heterocromatina. Cada ADN ocupa una región del núcleo y no se entremezcla con los demás ADN.

Al comenzar la mitosis, la cromatina se condensa alrededor de 50 veces y se forman los cromosomas que ya contienen el material genético duplicado. En esta condensación intervienen proteínas motoras denominadas condensinas.

Cada especie animal contiene un número de cromosomas determinado. Se le denomina cariotipo humano normal a la distribución característica (en forma y tamaño) del conjunto de los 23 pares de cromosomas (se incluye el par sexual) que este posee. Cada par tiene una forma y tamaño determinados. Los cambios en el número o en la estructura de los cromosomas provocan graves enfermedades.

La mitosis se ha dividido en seis etapas para su estudio. En ella ocurren la formación del huso mitótico, condensación de la cromatina hasta la formación de los cromosomas, desaparición de la envoltura nuclear, migración de las cromátidas hacia el ecuador del huso, separación de las cromátidas hacia los polos del huso, reaparición de la envoltura nuclear con la formación de los dos nuevos núcleos, y finalmente, la citocinesis, que es la división del citoplasma celular entre las dos células hijas. Todas estas etapas garantizan que las nuevas células posean el mismo material genético, así como el resto de los componentes celulares.

El paso por las diferentes fases de la mitosis se encuentra muy regulado y controlado. Mecanismos de fosforilaciones y desfosforilaciones llevados a cabo por quinasas y fosfatasas específicas lo garantizan y evitan que las células hermanas que se forman sean diferentes.

Ejercicios

1. Haga un esquema del núcleo en el que aparezca el máximo de detalles posibles, representativos de su estructura.
2. Confeccione dos listas de compuestos. En una de ellas mencione aquellos que deben atravesar los poros de la envoltura nuclear del núcleo al citoplasma y en la otra lista, los que los atraviesan en el sentido contrario.
3. Haga un esquema de lo que ocurre:
   a) En el centro del nucléolo y descríbalo.
   b) En un lugar intermedio entre el centro del nucléolo y las capas más externas.
   c) En la superficie.
4. Compare el proceso de la profase con el de la anafase.
5. Busque en algún libro de Medicina Interna dos enfermedades relacionadas con alteraciones del cariotipo. Diga cuál es la alteración cromosómica existente y cuáles son sus consecuencias.

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Resumen de la sección

Terminado el estudio de esta sección, el lector habrá podido percatarse de la complejidad de la organización celular. Este tema se completará cuando, en capítulos posteriores, se consideren la estructura y la función de otros organelos, los cuales se tratan en forma muy vinculada a las funciones metabólicas y de otra índole que estos realizan, tal es el caso de las mitocondrias y los ribosomas.

Durante toda la sección se puso de manifiesto la importancia general de las membranas en la organización del sistema celular. En tres capítulos de esta sección se estudian diferentes membranas, de modo exclusivo, o vinculadas con otras estructuras: "Membranas biológicas", "Organelos membranosos intracelulares" y "El núcleo celular".

Resulta de gran interés que el lector haya comprendido la función de las diferentes biomoléculas y las interacciones que establecen unas con otras en la organización y la función de los componentes celulares. Sin embargo, también debe resultar claro que las propiedades de los diferentes organelos no son una simple suma de las de sus constituyentes moleculares, sino que estos integran sistemas que manifiestan propiedades y funciones que les son características y cualitativamente nuevas.

La membrana plasmática se estudió como prototipo de membrana biológica y a esta se refirió, en primer lugar, el modelo de mosaico fluido, aceptado universalmente en la actualidad para explicar las estructuras y funciones, no solo de la membrana plasmática, sino de las membranas biológicas en general.

La membrana plasmática, como se expresó, no es una simple barrera que limita la célula de su entorno, sino que se trata de un organelo muy activo y dinámico que participa en el paso selectivo de sustancias a través de ella y en ambas direcciones, sobre todo en virtud de las proteínas transportadoras específicas que se localizan en esta.

Los organelos membranosos intracelulares cumplen importantes funciones generales, relacionadas con la compartimentación del espacio intracelular, el establecimiento de gradientes de concentración, la disponibilidad de áreas de superficie, el incremento de las velocidades de los procesos metabólicos y la propia generación de nuevas membranas.

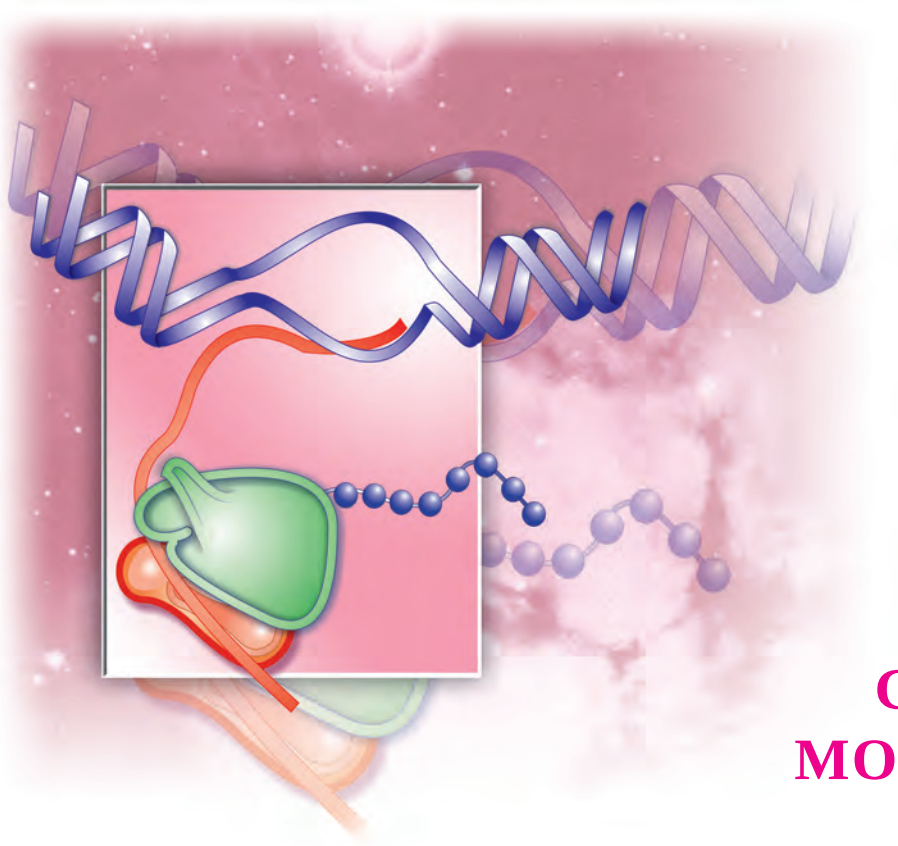
En particular, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi se vinculan con la síntesis y el procesamiento de biomoléculas, especialmente proteínas y lípidos. El último de los organelos citados participa en la orientación del material sintetizado hacia distintos lugares de la célula o incluso hacia su exterior.

Los lisosomas intervienen en la degradación de biomoléculas que pueden provenir del exterior o ser material de la propia célula. Por último, los peroxisomas intervienen en reacciones de descomposición del H_2O_2 y de detoxificación.

El citoesqueleto constituye un elemento fundamental de la arquitectura celular, ya que posee una dinámica notable, dada, sobre todo, por la continua formación y desintegración de los diferentes filamentos y túbulos que lo constituyen. En estos procesos participan, además, diferentes enzimas y otros tipos de proteínas reguladoras.

El núcleo celular es un organelo de elevada complejidad y sus constituyentes fundamentales son las moléculas de ADN, donde se conserva la información genética de las células. Este material adopta diversas formas organizativas durante el ciclo de reproducción de la célula y la más organizada son los cromosomas, que intervienen en el proceso de la mitosis.

Para concluir, se señala que si bien la organización didáctica del contenido obliga a estudiar los diferentes organelos de manera separada, estos no se deben considerar como entes totalmente independientes, sino que funcionan como un sistema muy coordinado, lo cual se ha puesto en evidencia en esta misma sección y será reiterado a lo largo de todo el texto.



SECCIÓN V

GENÉTICA MOLECULAR

Introducción a la sección

En esta sección se tratará el estudio de la genética molecular, lo que equivale a decir que se estudiarán los fenómenos relacionados con la herencia de las características propias de los seres vivos, desde el punto de vista de los análisis de las estructuras, propiedades y funciones de las moléculas que intervienen en estos procesos.

Todos los procesos que se estudian en esta sección están relacionados con los mecanismos de transferencia de información, por eso todas las macromoléculas que participan en estos procesos se caracterizan por presentar propiedades informativas. Prácticamente toda la sección está encaminada al estudio de las tres grandes vertientes que tienen que ver con la información genética, o sea, su trasmisión, conservación y expresión.

La sección comienza con el estudio de conceptos fundamentales de la genética, en general, y de la genética molecular, en particular. Se trata de un estudio de las características físicas del material genético y sus diferentes formas de organización en los organismos procariontes y eucariontes, pero especialmente es estos últimos.

El siguiente capítulo se dedica al estudio del ciclo celular de las células eucariontes, pues la transferencia de información genética se realiza durante la vida de la célula. Se estudian las fases del ciclo y se destacan los procesos más sobresalientes de cada una, así como los complejos mecanismos moleculares que hacen progresar el ciclo de una etapa a la siguiente y, por último, los principales mecanismos de control.

El fenómeno de la trasmisión de la información genética se refiere al hecho comprobado de que los seres vivos pueden trasmitir sus características a sus descendientes, lo que hace que estos sean esencialmente iguales a aquellos, pero dentro de un amplio margen de variabilidad. El fundamento molecular de estos dos aspectos se discute en el capítulo 26, dedicado a la replicación del ADN, que garantiza la estabilidad de la información que se trasmite, en tanto en el capítulo 31, dedicado a la recombinación genética y el 32 a las mutaciones, se analizan las diferentes fuentes de diversificación.

La conservación de la información genética implica varias facetas: en primer lugar, la organización en cada organismo de las moléculas que la portan, que es contenido del capítulo 24 "Organización del genoma eucarionte"; en segundo lugar, los mecanismos que mantienen y reparan las moléculas que han sufrido algún daño, esto se trata en el capítulo 33 "Conservación de la información genética".

Cada organismo, para ser cual es, debe expresar la información que contiene en su material genético; este aspecto es uno de los más complejos, ya que esa información debe ser copiada, primero, en una molécula específica de ARNm, como se verá en el capítulo 27 "Transcripción del ADN", y posteriormente en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, como se estudia en el capítulo 30 "Traducción". Para ello es necesaria la existencia de una relación entre estos dos tipos de moléculas y por eso se dedica el capítulo 28 al estudio del código genético, en tanto en el 29 se trata el estudio de los ribosomas, que son los organitos donde ocurre la síntesis de proteínas. Una eficiente expresión de la información genética requiere de mecanismos de control, que serán estudiados en el capítulo 34 "Regulación de la expresión genética".

En todos los capítulos se trata primero cada proceso en procariontes, como punto de referencia y por razones históricas, sin embargo, en cada uno la mayor parte se dedica a los eucariontes, teniendo en cuenta que el ser humano, que es el centro de atención de este texto, es un organismo eucarionte.

Para terminar la sección se ha considerado conveniente incluir en el capítulo 35 "Tecnología del ADN recombinante" algunas aplicaciones de los conocimientos de la genética molecular, sobre todo aquellos relacionados con la práctica médica.

El campo de conocimientos de la genética molecular se ha desarrollado extraordinariamente en los últimos 30 años y en esta sección no se pretende hacer un análisis de todos los procesos relacionados con este tema, ni siquiera hacer un estudio pormenorizado de los mecanismos que aquí se exponen. Ha sido necesario hacer una selección cuidadosa del contenido, teniendo en cuenta que este texto está dedicado principalmente a los estudiantes de ciencias médicas, y de ahí la constante referencia a aquellos aspectos que más o menos de forma directa pueden estar vinculados con esa esfera de conocimientos.

Organización del genoma humano

En todos los organismos celulares el material genético está constituido por ADN de doble hebra; aun cuando su estructura general es muy similar y está compuesto por las mismas bases nitrogenadas (A, T, C, G) existen diferencias notables entre las organizaciones particulares de los genomas en procariontes y eucariontes.

La primera diferencia radica en el contenido de ADN de los diferentes organismos. Una bacteria típica como la *E. coli* posee un material genético equivalente a 4×10^6 pares de bases; en un insecto como la *Drosophila melanogaster* es de $1{,}6 \times 10^7$ y en los mamíferos de $4{,}8 \times 10^9$ pares.

En segundo lugar, en los procariontes el ADN ocupa una posición central en la célula, sin que exista separación física entre este y el resto del organismo. En las células eucariontes el material genético (ADN) se encuentra separado físicamente del resto de la célula por la envoltura nuclear, constituida por doble membrana (capítulo 23).

Pero tal vez la diferencia más sobresaliente radica en la forma característica que está organizado el material genético en los eucariontes. Como muchas de esas particularidades influyen notablemente en los mecanismos de expresión de la información genética y su regulación, se estudiarán primero las particularidades fundamentales de la organización del genoma en los organismos eucariontes.

Genes eucariontes

La categoría esencial de la genética es el gen, por lo tanto, la genética molecular es la parte de la genética general que estudia la estructura molecular del gen, sus propiedades y funciones, así como las consecuencias de sus modificaciones por la acción de agentes internos o externos.

El concepto de gen, como componente de los seres vivos, aparece por primera vez en 1866, en los trabajos de Gregor J. Mendel acerca de la herencia, solo que él le llamó factores que determinan un carácter. Mendel estableció que esos factores se encontraban por pares en los organismos, con lo cual enunció su primera característica. Fue Wilhelm Ludwig Johannsen quien en 1909 propuso denominar gen a los factores mendelianos, pues en 1906 William Bateson había propuesto denominar *genética* a la ciencia que se ocupa del estudio de la herencia en los seres vivos. En 1941, George Wells Beadle y

Edward Lawrie Tatum descubrieron la relación entre genes y proteínas, lo que quedó plasmado en su clásico apotegma "un gen → una proteína". Los trabajos de Oswald Theodore Avery, Colin McLeod y Maclyn McCarty, en 1944, y los de Alfred Hersey y Martha Chase, en 1952, apuntaban hacia el ADN como el portador material de los genes. El obstáculo principal para reconocer el ADN como portador de la información genética era el número reducido de sus componentes elementales, pues solo está formado por cuatro desoxinucleótidos distintos, mientras las proteínas pueden contener hasta 20 aminoácidos diferentes. Todas las dudas se despejaron en 1953 con el descubrimiento de la estructura del ADN por James D. Watson y Francis Crick. Desde entonces hasta la fecha se ha avanzado mucho en el conocimiento del gen, sus propiedades, sus funciones, su localización en los cromosomas, así como sus mecanismos de conservación, transmisión y expresión.

Hoy día se puede definir el gen como uno o varios segmentos de una molécula de ADN que en su secuencia de bases nitrogenadas contiene la información necesaria para dirigir la síntesis de una o varias moléculas de ARN. Entonces, el genoma será el conjunto de todos los genes que caracterizan a una especie determinada. En particular, el genoma humano es el total de genes que poseen los seres humanos.

Por su parte, la información genética se entiende como la propiedad del ADN que le permite dirigir la formación de un organismo vivo y dotarlo de mecanismos de supervivencia en un ambiente determinado.

Nomenclatura de los genes

Diferentes han sido las razones por las cuales se ha dado nombre a los genes, pues no existe una nomenclatura sistemática para ellos. Es bueno recordar que durante mucho tiempo se desconocía cuál era la función real del gen, ni su relación con las proteínas. De esta forma los investigadores emplearon diferentes criterios a la hora de nombrarlos.

Un primer criterio fue establecido por Thomas Hunt Morgan, quien en sus estudios con *Drosophila melanogaster* descubrió un mutante con ojos blancos, en vez del color rojo característico del tipo silvestre. Morgan llamó a este mutante *white*. Por lo tanto, el primer criterio para nombrar un gen era derivarlo del fenotipo del mutante. Así, el mutante carente de alas fue nombrado *wingless*; el que tenía el dorso encorvado fue llamado *hunchback*; el que presentaba duplicada la región caudal fue denominado *bicaudal* y así sucesivamente.

Otro criterio contemplaba la función que el mutante presentaba alterada. En levaduras se hizo un estudio para determinar los genes cuyos productos estaban implicados en el ciclo de división celular. A todos los mutantes se les agrupó con la designación CDC (*cell division cycle*) y se numeraron en orden de aparición. Hasta el momento se han identificado 45 genes implicados en este proceso y nombrados de *CDC1* a *CDC45*.

Cuando se han identificado homólogos de estos genes en organismos superiores, incluyendo al ser humano, en la mayoría de los casos se ha conservado la nomenclatura original.

En los seres humanos la mayoría de las mutaciones son causantes de enfermedades, es decir, hay un cambio del fenotipo, por ello muchos genes humanos derivan su nombre del de la enfermedad que se origina cuando están mutados. Este es el caso del gen cuyas mutaciones da lugar al retinoblastoma (RB), el que ocasiona el síndrome de Bloom (BLM) o el síndrome de Werner (WRN).

Al descubrirse la relación entre el gen y las proteínas, los genes comenzaron a nombrarse por la proteína codificada. Así, los genes que codifican las cadenas de la hemoglo-

bina se nombran HB, los del colágeno COL, etc. En el caso de las enzimas, el gen y la proteína suelen tener el mismo nombre, de esta manera, el gen DNMT1 codifica la ADN metil-transferasa 1 y el RPB1, la subunidad 1 de la ARN polimerasa II (antes polimerasa B). Otras veces reflejan una propiedad de la proteína, como la masa molecular (TP53), su interacción con otras proteínas (GRB2, del inglés *growth factor receptor binding proteín*, esto es, proteína de unión a receptores de factores de crecimiento), etcétera.

Sin embargo, a veces la denominación del gen no se relaciona directamente con el fenotipo del mutante, por ejemplo, el gen Artemisa. El producto de este gen participa en los procesos que dan lugar a la formación de las inmunoglobulinas y sus mutaciones originan la inmunodeficiencia severa combinada. La enfermedad es congénita y por lo tanto se presenta en los niños, y como Artemisa es la diosa de la mitología griega, protectora de los niños, el gen fue bautizado con ese nombre.

En eucariontes, las siglas que representan el nombre del gen se escriben todas con mayúsculas y en itálicas. No se utilizan letras griegas, sino su equivalente en el alfabeto latino. Por último, en general las siglas se refieren al nombre en idioma inglés, por ser la lengua más difundida en el mundo y la que prima en la literatura científica.

Genes y cromosomas

En las células de eucariontes el ADN total se divide en un número variable de moléculas, característico de cada especie, y forma con proteínas, estructuras muy complejas denominadas cromosomas; el número y la forma de los cromosomas son típicos de cada especie.

En un organismo existen dos tipos fundamentales de células, en cuanto al número de cromosomas que contienen: las somáticas y las sexuales. Las primeras contienen el doble de cromosomas que las segundas, por eso se afirma que aquellas son diploides y estas, haploides. En las células somáticas los cromosomas se presentan por pares homólogos, los dos miembros de la pareja son equivalentes, por lo que contienen una dotación genética doble respecto a las sexuales. En los seres humanos las células diploides contienen 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales, para un total de 46 cromosomas.

El ADN que forma parte de los cromosomas es una sola molécula en forma lineal y no circular. Se asocia, a todo su largo, con proteínas que son fundamentalmente histonas, aunque existen otras no muy bien caracterizadas que junto con las histonas determinan las formas organizativas peculiares de los cromosomas. Como se vio en el capítulo 23, el grado de condensación del complejo de ADN con proteínas varía durante el ciclo celular, y las estructuras más compactas –los cromosomas propiamente dichos– existen solo durante el periodo de división celular. Durante la interfase esta estructura se hace mucho menos compacta y se presenta en forma de cromatina. Como en la mayoría de los estudios relacionados con la organización del genoma se han tomado como punto de referencia los cromosomas, en este texto se utilizará dicho término para hacer referencia a estos complejos de ADN con proteínas, sin tener en cuenta su grado de condensación. Cada cromosoma contiene un número característico de genes, ordenados de forma lineal a lo largo de su estructura. Por procedimientos múltiples se ha podido conocer la localización de numerosos genes en los cromosomas humanos (Fig. 24.1). Durante la maduración de las células sexuales (gametogénesis) se produce la reducción del número de cromosomas, y cada gameto maduro (óvulo y espermatozoide) contiene solo una copia de cada par de cromosoma, por tanto en las células sexuales cada gen está representado solo una vez, a diferencia de las células somáticas que por ser diploides tienen una representación doble de cada gen.

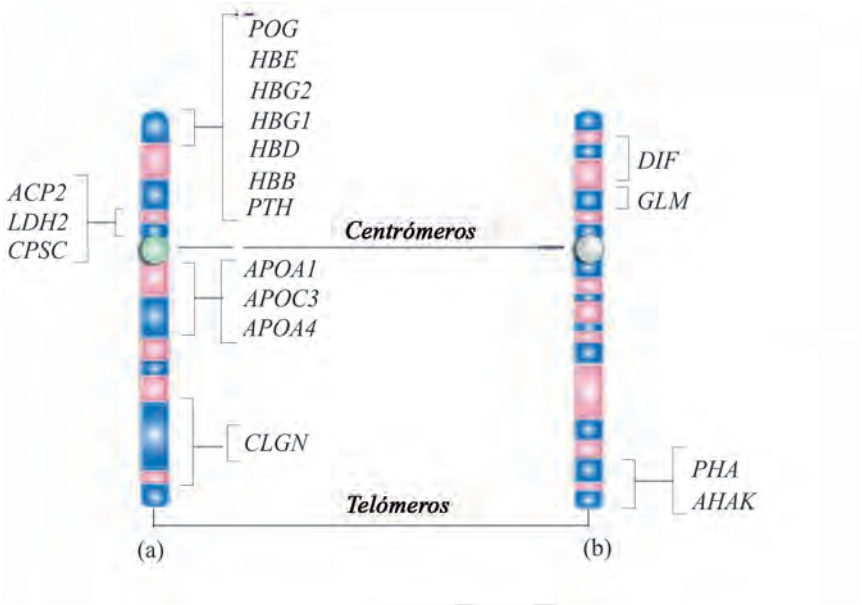


Fig. 24.1. Localización de algunos genes en cromosomas humanos. En (a) se representa la localización de algunos genes del cromosoma 11, como son algunos protooncogenes (POG), las cadenas de las globinas ε (HBE), γ (HBG2 y HBG1), δ (HBD) y β (HBB); paratohormona (PTH), fosfatasa ácida 2 (ACP2), lactato deshidrogenasa A (LDHA), genes de las catepsinas (CPSC), de las apolipoproteínas A1 (APOA1), C3 (APOC3) y A4 (APOA4), así como de la colagenasa (CLGN); (b) localización de algunos genes, cuyas alteraciones provocan enfermedades como la deficiencia de interferón (DIF), galactosemia (GLM), porfiria hepática aguda (PHA) y anemias hemolíticas por deficiencia de la adenilato quinasa (AHAK), todos localizados en el cromosoma 9.

Aun cuando existen numerosos puntos de vista para tratar este problema, y de cada uno de estos puede derivar una concepción distinta de gen, de acuerdo con las características que más se pretendan destacar y como consecuencia de la profundización de los conocimientos sobre la naturaleza del gen, para los objetivos de este capítulo se utilizará la definición de gen dada anteriormente.

Este ADN puede codificar la síntesis de todos los tipos de ARN, especialmente los ribosomales, los de transferencia y el mensajero. En este último caso, la secuencia de bases se traduce en secuencia de aminoácidos durante la traducción.

Las secuencias, que pueden ser exactamente iguales en ambos cromosomas o diferir en algo, siguen originando, en esencia, el mismo producto, aunque con pequeñas diferencias, esto hace que en una población puedan existir numerosas formas del mismo gen. Uno de los ejemplos más sobresalientes en seres humanos es el gen que codifica la cadena β de la hemoglobina, este gen se localiza en el cromosoma 11 y de él se han reportado más de 200 formas que difieren, por lo general, en el cambio de alguna base nitrogenada que, aunque en muchos casos determina cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína, sigue siendo esencialmente la β-globina (Tabla 24.1).

El conjunto de formas alternativas del mismo gen, que pueden ocupar el mismo sitio en el cromosoma (*locus*), se denomina alelos.

Tabla 24.1. *Diferentes tipos de alelos en la cadena β de la hemoglobina*

Tipo	Defecto molecular	Fenotipo
Hb S	Cambia en β6 glu-val	Sicklemia
Hb C	Cambia en β6 glu-lis	
Hb E	Cambia en β26 glu-lis	
Hb M $_{\text{Boston}}$	Cambia en β53 his-tir	Meta Hb
Hb M $_{\text{Saskatoon}}$	Cambia en β63 his-tir	Meta Hb

Pueden existir numerosas formas alélicas del mismo gen, pero una célula diploide solo puede contener dos como máximo: una en cada cromosoma homólogo. Si el par está representado por genes idénticos y, por tanto, sus productos son indistinguibles, el organismo es homocigótico para esa pareja, pero si se trata de formas alélicas, entonces es heterocigótico. Es muy difícil encontrar algunas células u organismos pluricelulares que no sean heterocigóticos para uno u otro par de genes; esta diferencia en la estructura de los genes se refleja en su producto, o sea, en la proteína y su función. Se utiliza el término de genes de tipo silvestre para referirse al gen que supuestamente conserva su forma original; a sus formas alternativas se les denomina mutantes, por cuanto la mutación es el mecanismo fundamental en la formación de los alelos. En ocasiones algunos de los alelos mutantes codifican un producto que no es funcional. Suponga que existe un gen "A" que es de tipo silvestre y su mutante "a" que da un producto anormal, incapaz de realizar cualquier función. Existen tres combinaciones posibles para esta pareja de genes (Fig. 24.2):

- Los dos genes son de tipo silvestre, por lo que el organismo es homocigótico (AA) y todo el producto génico es normal.
- Un gen es de tipo silvestre y el otro es mutante (Aa), el organismo es heterocigótico y solo contiene aproximadamente la mitad del producto génico normal.
- Los dos genes son mutantes (aa), el organismo es homocigótico, por lo que todo el producto génico es anormal. Si ese producto realiza una función importante para la vida, la célula en esas condiciones no sobrevivirá o lo hará en condiciones precarias.

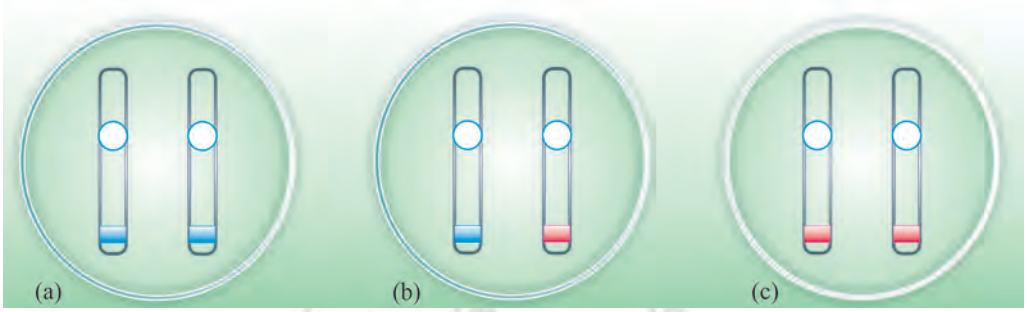


Fig. 24.2. Posibles combinaciones de alelos. Pueden existir numerosos alelos de un mismo gen, pero en un organismo dado solo puede haber dos: uno por cada cromosoma. Si se representa en azul el gen de tipo silvestre, que es dominante, y en rojo el mutante recesivo, se pueden encontrar tres combinaciones: (a) los dos genes son de tipo silvestre y el organismo es homocigótico dominante; (b) un gen es de tipo silvestre y el otro mutado, así como el organismo es heterocigótico y (c) los dos genes son mutantes y el organismo es homocigótico recesivo. Dependiendo de las características del producto génico, el heterocigótico puede o no manifestar un fenotipo anormal.

Cuando los alelos presentes son diferentes, pero ninguno es del tipo silvestre, se afirma que se trata de un heterocigótico compuesto.

El conjunto de genes presente en una célula constituye el genoma, pero el par que determina un carácter particular, se denomina genotipo. La manifestación externa del genotipo recibe el nombre de fenotipo.

El fenotipo se puede definir de varias maneras: desde la posibilidad de metabolizar una sustancia o reconocer una señal química, hasta los rasgos más externos del organismo, como el color de los ojos, la forma de las extremidades, etc. Se acostumbra a clasificar los caracteres en dominantes o recesivos, de acuerdo con los patrones de trasmisión génica. En ocasiones se comete el error de hablar de genes dominantes y recesivos, pero en realidad estos términos solo se refieren al carácter determinado por el genotipo.

Estos conceptos son relativos y contrarios, o sea, la existencia de uno determina la existencia del otro. En un inicio se afirmaba que el carácter era dominante cuando se expresaba siempre en el fenotipo, mientras que el recesivo solo lo hacía si estaba en

estado homocigótico; aquí se concebía el fenotipo como las características más externas del organismo. En la medida que se ha ido perfeccionando el conocimiento sobre la expresión de los genes y los procedimientos que permiten localizar y cuantificar el producto génico, la concepción del fenotipo y con ella la del carácter recesivo, se han modificado; es de esperar que con las nuevas técnicas introducidas, que permiten detallar la estructura del gen, la diferencia esencial e inicial entre estos dos conceptos tienda a desaparecer. La distinción entre caracteres dominantes y recesivos es muy importante en la práctica médica, pues existen enfermedades que se trasmiten como un carácter dominante y otras, como recesivo, todo lo cual el médico debe tener muy presente para hacer los asesoramientos genéticos del paciente y de la familia.

Tres ejemplos permitirán esclarecer los conceptos definidos hasta el momento. La fenilcetonuria es una enfermedad que se produce debido a la ausencia de actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa que cataliza la transformación de la fenilalanina en tirosina. Si un individuo es homocigótico para el gen de tipo silvestre, no padece la enfermedad, pero si es homocigótico para el gen defectuoso, es un enfermo. Sin embargo, si es heterocigótico (un gen silvestre y otro defectuoso) no padece la enfermedad porque la enzima producida a partir del gen silvestre puede realizar la transformación de fenilalanina en tirosina, sin dificultades. Por lo tanto la fenilcetonuria se trasmite como un rasgo mendeliano recesivo, pues es necesaria la presencia de los dos genes mutados para que aparezca el carácter, es decir, la enfermedad. Por eso, en el lenguaje médico generalmente se usa el término de homocigótico para referirse al par de genes mutados y de portador para el heterocigótico. El portador tiene importancia médica, pues al no padecer la enfermedad, no acude al médico, pero al portar el gen mutado lo puede trasmitir a su descendencia.

La osteogénesis imperfecta es una enfermedad que se origina por mutaciones en el gen que codifica una de las formas del colágeno, la proteína estructural más importante de la matriz extracelular. Si los dos genes son de tipo silvestre, la persona no padece la enfermedad. Sin embargo, si hay un gen mutante, no se produce la cantidad de colágeno suficiente para la formación de la matriz extracelular y la persona es enferma. Por lo tanto, basta con la mutación de uno de los genes para que aparezca la enfermedad y por eso esta se trasmite como un carácter dominante. La situación se agrava cuando los dos genes están mutados.

Para los grupos sanguíneos ABO existen básicamente tres alelos. El grupo sanguíneo A es dominante y está determinado por el alelo A. Se nota que aquí el fenotipo no es algo externo, ya que por la sola observación del sujeto no es posible determinar su grupo sanguíneo. El grupo sanguíneo B también es dominante y lo determina el alelo B. El grupo O tiene carácter recesivo y se origina por el alelo O. Una persona con la combinación génica AA será del grupo sanguíneo A, en tanto la del genotipo BB será del B. Las combinaciones genotípicas AO y BO originan fenotipos A y B, respectivamente. El genotipo OO corresponde con el grupo sanguíneo O. Ahora bien, como A y B son dominantes, la persona que tenga un genotipo AB expresará ambos genes por igual y será del grupo sanguíneo AB. Cuando dos genes que determinan el mismo carácter se expresan de igual forma en el fenotipo, se afirma que los caracteres son codominantes.

Esto tiene su explicación molecular. Las sustancias que determinan el grupo sanguíneo ABO son heteropolisacáridos que forman parte de la membrana de los eritrocitos. Como se muestra en la figura 24.3, los sujetos del grupo sanguíneo O tienen en sus eritrocitos el polisacárido mostrado en (a). El gen A codifica una enzima que añade la N-acetil-galactosamina al extremo del polisacárido y cambia su especificidad de reacción; en tanto el gen B codifica la enzima que añade galactosa, lo que le otorga una especificidad diferente. En los sujetos AA o AO la estructura resultante será como se muestra en (b); en los BB o BO es como en (c). En los OO es como en (a), mientras que en los AB se encontrarán como en (b) y (c) aproximadamente a partes iguales.

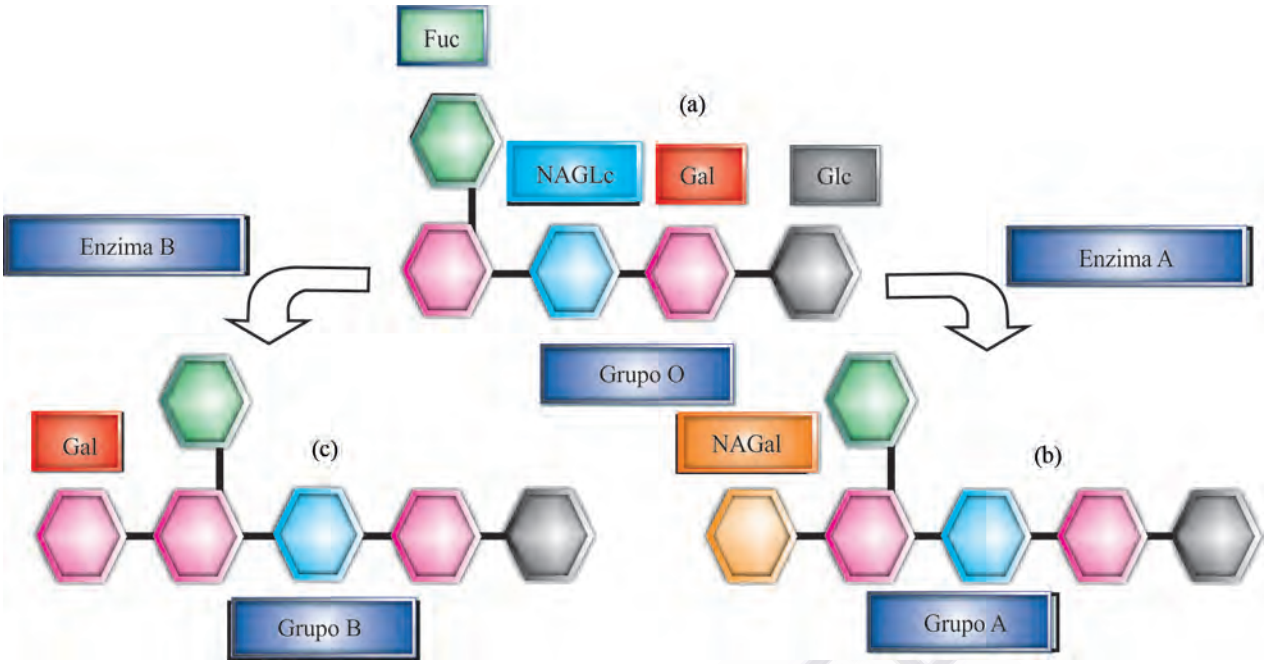


Fig. 24.3. Determinación genética de los grupos sanguíneos ABO. Los eritrocitos poseen un polisacárido unido a lípidos o proteínas de sus membranas, este posee carácter antigénico y está formado, como se muestra en la figura, por glucosa (Glu); galactosa (Gal); fucosa (Fuc) y N-acetilglucosamina (NAGlu), y es denominado antígeno O. El gen A codifica la enzima A que añade al polisacárido un resto de N-acetilgalactosamina (NAGal) y lo convierte en el antígeno A. Por su parte, el gen B codifica la enzima B que añade al antígeno O un resto de galactosa y lo convierte en el antígeno B. Si una persona posee los dos genes, poseerá también las dos enzimas y aproximadamente la mitad de sus antígenos serán A y la otra mitad será B, por tanto será del grupo AB. De no poseer ninguno de estos genes, entonces será del grupo O.

Genes y ADN

De acuerdo con numerosos estudios, el ADN contenido en una célula diploide humana es aproximadamente de $7{,}3 \times 10^{12}$ g. Si el peso molecular promedio de un par de nucleótidos es $1{,}025 \times 10^{21}$ g, se deduce que la célula diploide humana contiene alrededor de $(7{,}3 \times 10^{12}/1{,}025 \times 10^{21})$ $7{,}1 \times 10^{9}$ pares de bases por genoma diploide, o $3{,}5 \times 10^{9}$ por genoma haploide.

Si todo este ADN codificara proteínas aproximadamente de 500 aminoácidos cada una, se podría producir más de un millón de ellas. Como para cada aminoácido se requieren tres bases, harán falta (500 × 3) 1 500 pares de bases. A partir del genoma total serían $(3{,}5 \times 10^{9}/1{,}5 \times 10^{3})$ $2{,}3 \times 10^{6}$ proteínas. Sin embargo, el número de genes que codifican proteínas se ha calculado en unos 23 000. De aquí se deduce que la mayor parte del ADN se implica en los mecanismos de regulación de la expresión genética o en otras funciones aún desconocidas.

Si se aísla el ADN de una bacteria y se corta mediante enzimas en unos 500 a 1 000 fragmentos, y se centrifugan en un gradiente de densidad de CsCl, se observa que se reúnen en una zona única y estrecha (Fig. 24.4).

Esto se debe a que la densidad del ADN es proporcional a su contenido en G + C y la composición promedio de cada fragmento, que contiene varios cientos de bases, no varía mucho de uno a otro. Si se aplica el mismo procedimiento al ADN de un mamífero, se obtienen dos zonas, la mayor con una composición aproximada de A + T, de 60 %, pero la menor con más de 90 % de A + T, lo cual constituye un hecho inusual. Al ADN contenido en esta zona se le denomina ADN satélite, este se ha observado en muchos organismos y en el ser humano constituye de 0,5 % a 1 % (10^{5} pares de bases) del genoma.

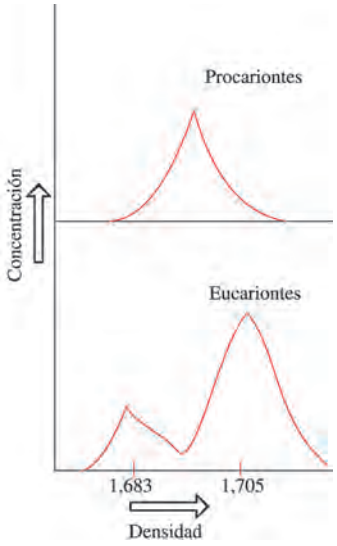


Fig. 24.4. Detección del ADN satélite. Si el ADN de los procariontes se corta con nucleasas específicas en un grupo reducido de fragmentos de gran tamaño y después se centrifugan en gradiente de densidad, estos fragmentos se agrupan en una zona estrecha del tubo de centrifugación, donde la densidad de ellos sea igual a la del medio. El ADN de eucariontes, al ser sometido al mismo procedimiento, se concentra en dos zonas de densidad diferente. La de menor densidad corresponde al ADN satélite.

Una característica importante del ADN satélite es la de estar formado por secuencias repetidas, organizadas en tándem, una a continuación de la otra. Por lo general estas secuencias son cortas (de 5 a 10 bases), pero pueden llegar a tener de 100 a 200 bases.

Se ha podido determinar la localización de este ADN satélite, para ello se procedió de la forma siguiente: se tomaron muestras de ADN satélite y a partir de este se formó el ARN marcado con [^{3}H]-uridina. Se fijaron células cultivadas sobre un portaobjetos y se trataron con álcalis para desnaturalizar el ADN. Con este tratamiento el cromosoma queda prácticamente intacto. Se añadió el [^{3}H]-ARN y se dio tiempo suficiente para permitir la hibridación. Se lavó la preparación para eliminar el exceso de reactivo y se sometió a un proceso de autorradiografía. Al revelar la placa, se encontró que el ADN satélite se localizaba fundamentalmente en los centrómeros y con menor frecuencia en los telómeros; se ha pensado que su función esté relacionada con la fijación del huso durante la división celular, pero esto no ha sido comprobado. No se debe confundir el ADN satélite con los satélites descritos en la estructura de algunos cromosomas, pues aunque la palabra puede tener en ambos casos la misma connotación (una estructura asociada con otra) se refiere en cada caso a conceptos diferentes.

Estos hallazgos impulsaron a realizar un estudio más profundo acerca de las características de los ADN de eucariontes. Un procedimiento que ha dado muchos resultados es el estudio de la cinética del proceso de renaturalización. Para ello se extrae el ADN de un organismo y, sin fraccionarlo, se desnaturaliza; luego se coloca en condiciones que permitan la renaturalización, siguiendo el proceso en función de la concentración inicial de ADN (Co) y el tiempo (t). Cuando esto se hace con el ADN de *E. coli*, se obtiene una curva típica que se muestra en la figura 24.5; se interpreta como si el proceso ocurriera por la presencia de una sola especie molecular. Cuando se hace con ADN de mamíferos, se obtiene una curva que presenta varias mesetas, como si en el proceso interviniera más de una especie molecular, una de renaturalización rápida, otras intermedias y otra lenta; esto se debe a la existencia de secuencias con mayor o menor grado de repetitividad.

El análisis detallado de estas curvas y el empleo de otros métodos complementarios permiten distinguir cuatro tipos de secuencias en el ADN de eucariontes: las altamente repetidas, que aparecen por varios cientos o millones de copias y se corresponden con las de renaturalización rápida; las medianamente repetidas, que se presentan en un número de copias que abarca de 10 a varios cientos; las moderadamente repetidas, con un número de copias de 2 a 10 y junto con las anteriores representan la fracción de ve-

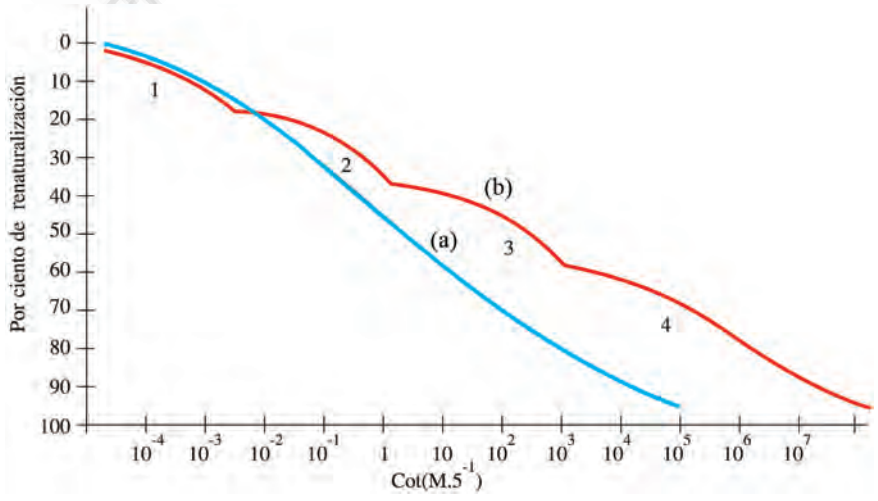


Fig. 24.5. Curva Cot. Si se desnaturaliza el ADN de *E. coli* (a) y se sigue el proceso de renaturalización, se obtiene una línea continua como corresponde a una sola especie molecular. El ADN de mamíferos (b) presenta varias curvaturas, lo cual indica que este se comporta de forma heterogénea. Una fracción (1) presenta una reasociación rápida y otra (4) es lenta, a la vez que se observan otras dos (2 y 3) que presentan velocidad de reasociación intermedia; esto significa que el ADN de mamíferos se comporta como si estuviera formado por cuatro especies moleculares.

locidad intermedia de renaturalización; y por último, las secuencias de copia única, que son las de menor velocidad de renaturalización. En forma de copia única se encuentra la mayoría de los genes de la célula. Esta es la menor fracción del ADN celular, lo cual se corresponde con la porción de ADN que constituye los genes, (expuesto en páginas anteriores). Ejemplos de secuencias moderadamente repetidas son los genes de las histonas y de los ARNt. En algunos casos estas secuencias no son exactamente repetidas y los productos génicos presentan pequeñas diferencias en su composición. Las secuencias medianamente repetidas en general no codifican proteínas, pero pueden estar relacionadas con ARN no codificantes, como los microARN, los ARN cortos de interferencia y otros que tienen funciones reguladoras importantes. Las altamente repetidas incluyen al ADN satélite y algunos genes, como los que codifican los precursores de los ARNr, para los que se han calculado que existen 24 000 copias para el de 5 S y 500 copias para el precursor de los otros tres tipos.

Estructura del gen

Una vez analizadas las características generales de los ADN de eucariontes, es conveniente examinar la estructura interna del gen. Como ya se señaló, un gen está constituido por uno o más segmentos específicos del ADN, cuya secuencia de bases contiene la información necesaria para dirigir la síntesis de moléculas específicas de ARN.

En las células eucariontes se distinguen tres tipos de genes: los genes de tipo I son aquellos que codifican para los ácidos ribonucleicos ribosomales (ARNr) de 5,8 S, 18 S y 28 S, estos genes son transcriptos por la ARN polimerasa I. Los genes de tipo II codifican varios tipos de ARN, entre ellos el ARN mensajero (ARNm), ARN nucleares cortos (ARNnc), el ARN telomérico (TERRA), microARN, ARN de interferencia y ARN largos no codificantes. Estos genes son transcritos por la ARN polimerasa II. Los genes de tipo III codifican para los ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt), el ARNr de 5 S y para varios ARNnc. Estos genes son transcriptos por la ARN polimerasa III.

En todos los tipos de genes se distinguen dos regiones fundamentales: la zona de regulación y la zona de codificación. La primera contiene los elementos que determinan cuándo, dónde y con cuál intensidad se debe expresar un gen. A este grupo de elementos pertenecen: promotores, potenciadores y silenciadores. La zona de codificación es la que contiene la información para dirigir la síntesis de los diferentes tipos de ARN y es la zona transcrita por las ARN polimerasas.

Los promotores son las regiones de ADN adyacentes a la zona de codificación donde se arma la maquinaria molecular de la transcripción. En la mayoría de los genes se encuentra hacia el extremo 5´ del gen muy cerca del sitio de inicio de la síntesis del ARN. Sin embargo, algunos genes de tipo III presentan el promotor dentro de la zona de codificación. En algunos genes eucariontes existe más de un promotor para el mismo gen y a partir de cada uno se produce una proteína con alguna diferencia. En ocasiones cada tejido utiliza un promotor específico pero a veces el mismo tejido puede cambiar de promotor en respuesta a estímulos internos o externos.

Los potenciadores son secuencias de ADN que sirven como sitios de unión a proteínas específicas y esa unión determina un incremento en la velocidad de la transcripción. Pueden encontrarse tanto hacia el lado 5´como 3´del gen y por lo general se localizan a grandes distancias.

Los silenciadores tienen un efecto contrario a los potenciadores. Su estructura no es totalmente conocida aunque se supone que ejercen su efecto silenciador al provocar la formación de heterocromatina, que al ser más consensada hace que el ADN en esa zona sea inaccesible a las proteínas que intervienen en la transcripción.

Genes que codifican proteínas

Un comentario especial requieren los genes de tipo II que codifican ARNm, pues este al ser transportado al citoplasma dirige la síntesis de proteínas. Si se compara la longitud de algunos genes de eucariontes con la de sus productos, se observa que estos son generalmente más cortos que aquel. Así, de acuerdo con la longitud de su gen, la cadena β de la hemoglobina debía poseer 500 aminoácidos, cuando en realidad solo contiene 146.

Hechos como este comenzaron a ponerse de manifiesto a mediados de la década de los años 60 y despertaron un vivo interés. Después de múltiples esfuerzos se ha podido comprobar que los genes eucariontes no son continuos, sino que se encuentran interrumpidos por secuencias de nucleótidos. Estas secuencias de nucleótidos no aparecen después en el producto final del proceso, sean ácidos ribonucleicos o proteínas. Por tanto, la característica general del genoma de poseer zonas codificadoras y no codificadoras se repite a pequeña escala en la estructura misma del gen. Así, cada gen está constituido por un número de secuencias codificadoras que alternan con secuencias no codificadoras. Cuando se refiere a los genes de tipo II, las codificadoras reciben el nombre de exones (del inglés *exit*, salida, alude al hecho de que estas secuencias, una vez transcritas, abandonan el núcleo) y las no codificadoras el de intrones (de *inside*, dentro, pues una vez transcritas quedan dentro del núcleo). El número de exones es variable para los diferentes genes; el de las globinas presenta tres exones; las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, cinco; la ovoalbúmina, ocho; la conalbúmina, 18, y la cadena α del colágeno, 53 (Tabla 24.2).

Tabla 24.2. *Características estructurales de algunos genes humanos*

Proteína	Residuos	Cromosomas	Gen(pb)	Exones
α-globina	141	16	850	3
β-globina	146	11	1 600	3
Colágeno Iα	11 000	17	18 000	51
Colágeno Iα	21 000	7	38 000	52
Insulina	51	11	1 430	3
Factor IX	415	X	34 000	8
Factor VIII	2 332	X	186 000	26
Receptor de LDL	839	19	45 000	18
αl-antitripsina	394	14	10 000	5

La estructura de los intrones se ha estudiado de manera detallada y algunas características se han podido conocer especialmente mediante el análisis de los mecanismos que la célula utiliza para su eliminación. En primer lugar, la longitud de los intrones en número de nucleótidos es muy variable, sin embargo, suelen ser mayores que los exones. Típicamente contienen tres secuencias modulares características. El exón anterior contiene en su extremo 3´ la secuencia GT(A/G)AG. La notación A/G significa que las dos bases mencionadas se encuentran en esa posición en proporciones similares. El extremo 5´ del intrón presenta la secuencia GT(A/G)AGT. Esta secuencia se conoce como el sitio donador y se halla separada por un espaciador cuya longitud está en el rango de 100 a poco más de 1 000 nucleótidos del sitio de ramificación que típicamente contiene la secuencia (T/C)N(CTA/TCG)A(C/T), donde N representa cualquiera de las cuatro bases. Separado de esta secuencia por algo más de 20 nucleótidos, se encuentra el sitio aceptor que contiene la secuencia $(C/T)_{11}$N(C/T)AG y que determina el extremo 3´ del intrón, esta zona se conoce, además, como el sector de polipirimidinas. La función de cada una de estas secuencias, que justifica sus nombres, se verá en el capítulo 28 al estudiar el proceso de eliminación de los intrones durante la maduración de los ARNm. En la figura 24.6 se resumen las características de los intrones.

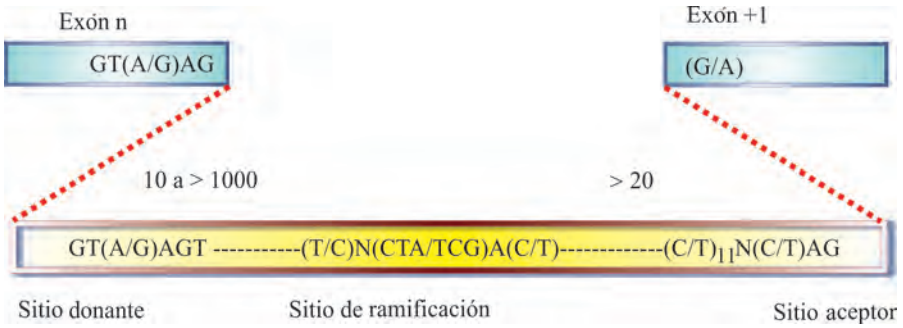


Fig. 24.6. Características de los intrones. La figura representa las secuencias más características de los intrones y de las uniones con los exones. Las distancias entre los elementos de los intrones, el sitio donante, el sitio de ramificación y el sitio aceptor son muy variables. Lo más sobresaliente del sitio de ramificación es la adenina (A) que está muy conservada entre los intrones de un organismo y entre diferentes especies.

Todo parece indicar que la fragmentación de los genes no es al azar. Son muchos los ejemplos que demuestran que cada exón codifica para una zona específica de la proteína, con características estructurales y funcionales muy definidas, o sea, un dominio. Esto ha hecho pensar que los intrones pudieran haber tenido una función importante en la evolución, que favorece el intercambio de segmentos génicos, al formar nuevos arreglos que darían lugar a proteínas diferentes, a partir de bloques de otras proteínas. La presencia de los intrones hace más flexible al genoma de los eucariontes, lo cual aceleraría el proceso evolutivo. Por otra parte, estos exones pueden arreglarse de forma diferente, al ser transcritos en su ARNm o durante el procesamiento de estos últimos, dando lugar a la formación de proteínas diferentes a partir del mismo segmento de ADN. Un ejemplo es el del gen *WT1* cuyas mutaciones originan el tumor de Wilms y que por procesamiento alternativo del ARN puede dar lugar a 24 proteínas diferentes.

Una vez más se trata de conceptos relativos, pues en muchos casos los intrones de un gen representan otros genes. Así, en el gen *NF1*, cuya alteración provoca una enfermedad denominada neurofibromatosis tipo 1, presenta un intrón de gran tamaño en el cual están ubicados otros tres genes.

Por último, es bueno señalar que no toda la secuencia de bases que aparece en los exones se traduce en secuencias específicas de aminoácidos. Hacia el extremo 5' aparece una secuencia de bases, cuya función está relacionada con la iniciación de la traducción y facilita la incorporación del ARNm al ribosoma. Otra secuencia aparece hacia el extremo 3' y está relacionada con el mecanismo de terminación. En esta zona existe una señal que indica el lugar donde se debe producir la modificación del extremo 3' del ARNm, conocida como sitio de poliadenilación, y que se estudiará con más detalles en el capítulo 28 (Fig. 24.7).

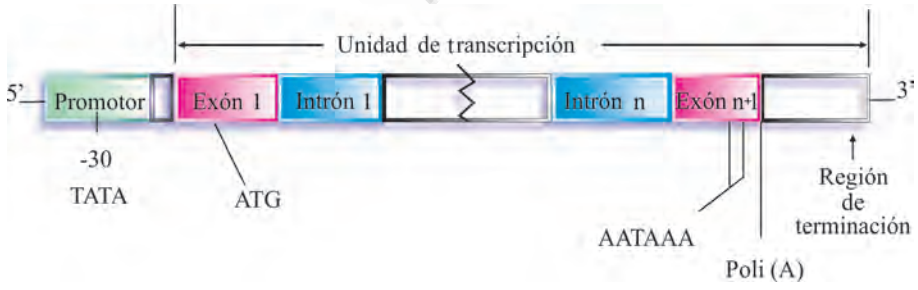


Fig. 24.7. Estructura generalizada de un gen eucarionte. Si se lee el gen de izquierda a derecha, lo primero que se encuentra es la región del promotor, con sus secuencias reguladoras, especialmente TATA en la zona de -30. El sitio para el Cap corresponde con el primer nucleótido que será transcrito y ocupará el extremo 5'-P del ARNm. El triplete ATG señala el sitio donde debe comenzar la traducción. Luego, exones e intrones se alternan de acuerdo con el gen específico de que se trate. Después del último exón aparece una zona que contiene la secuencia AATAAA, que indica que unas 20 bases más adelante se halla el sitio donde debe incorporarse la cola de poli A. El punto exacto de la terminación no ha sido totalmente esclarecido.

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Por su parte, los procariontes tienen generalmente su ADN formando una sola cadena, cuya asociación con proteínas no resulta tan regular como en los eucariontes. Casi siempre contienen sus genes en copia única y estos no presentan secuencias intercaladas. Cuando en algunos casos los genes pueden ser mayores que su producto, las adiciones se encuentran hacia los extremos, de manera que la secuencia codificadora es casi siempre continua.

Familias génicas

En procariontes, los genes cuyos productos están relacionados funcionalmente se organizan en operones y son transcritos en un ARNm policistrónico, que contiene información para más de una cadena polipeptídica. Todo el sistema se controla por medio de una secuencia específica de bases –el operador– y puede activarse o desactivarse regulando el funcionamiento de este. Esto no sucede en eucariontes.

Muchos genes eucariontes, funcionalmente relacionados, pueden formar grupos, denominados familias génicas.

La actividad de los miembros de la familia es casi siempre regulada de manera coordinada.

Las familias génicas se clasifican habitualmente en tres grupos:

- Familias multigénicas simples.
- Familias multigénicas complejas.
- Familias multigénicas complejas, controladas por el desarrollo.

Familias multigénicas simples. Uno o varios genes están repetidos en tándem. Los más notables son los genes de ARNr en el Xenopus. El ADNr de 5 S se organiza de manera que cada gen está separado del siguiente por una secuencia espaciadora (no codificante), con una longitud de 2 a 6 veces la del gen (Fig. 24.8a). En los seres humanos, los genes de los ARNr de 5,8 S; 18 S y 28 S, constituyen otra familia multigénica simple, en la cual la unidad de transcripción contiene los tres genes separados por secuencias espaciadoras, como se muestra en la figura 24.8b.

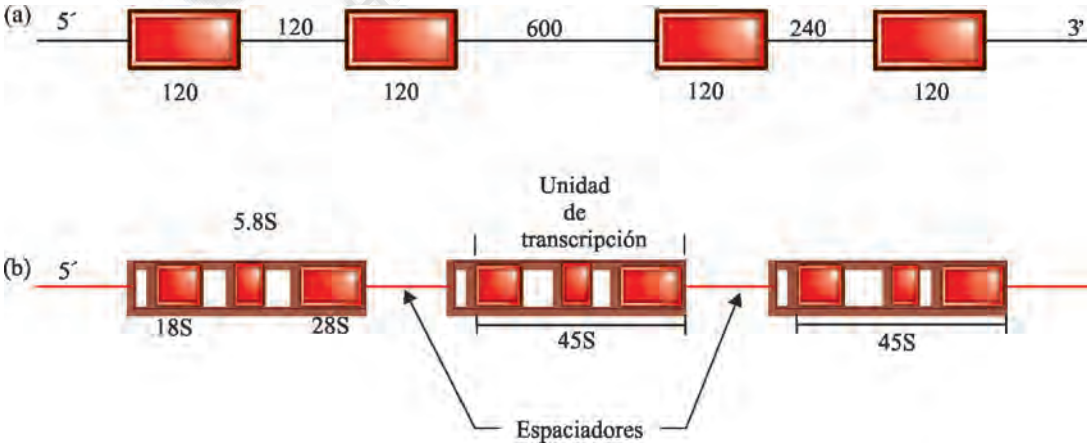


Fig. 24.8. Familias multigénicas simples. Uno o varios genes se hallan organizados en forma lineal y separados por secuencias espaciadoras. (a) Se muestra la organización de la familia de los genes para el ARNr de 5 S en *Xenopus laevis* y (b) la familia del gen para el precursor de 45 S de los ARNr de 18; 5,8 y 28 S en el ser humano.

Familias multigénicas complejas. Están formadas por grupos de genes relacionados, cada uno con transcripción independiente, y separados por secuencias espaciadoras. El ejemplo más sobresaliente es la familia de las histonas. En el ser humano existen varios grupos de genes codificantes de histonas, que se localizan en varios cromosomas. Uno de esos grupos se localiza en la banda 21.3 del brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y consta de seis genes para la histona H1; cuatro para la H2A; ocho para la H2B, siete para la H3 y nueve para la H4. Muy cerca, en la región 6p22, existe otro grupo con un gen para la H1; cinco para la H2A; cuatro para la H2B; tres para la H3 y tres para la H4. Cada gen es transcrito en forma independiente en un ARNm, incluso unos son transcritos en una dirección y otros en dirección contraria. Aunque se desconoce el mecanismo, existe un control estricto de la velocidad de transcripción y traducción de estos genes, de forma tal que las histonas se sintetizan en el momento necesario para la síntesis de la cromatina (periodo S) y en la relación molecular necesaria, o sea, por cada molécula de H1 se producen dos de cada una de las restantes (H2A, H2B, H3 y H4), que es la proporción en que entran a formar parte de la cromatina (capítulo 23). La existencia de múltiples genes permite disponer de gran cantidad de estas proteínas en el momento preciso. En otros organismos la organización de esta familia difiere ligeramente, como se puede observar en la figura 24.9.

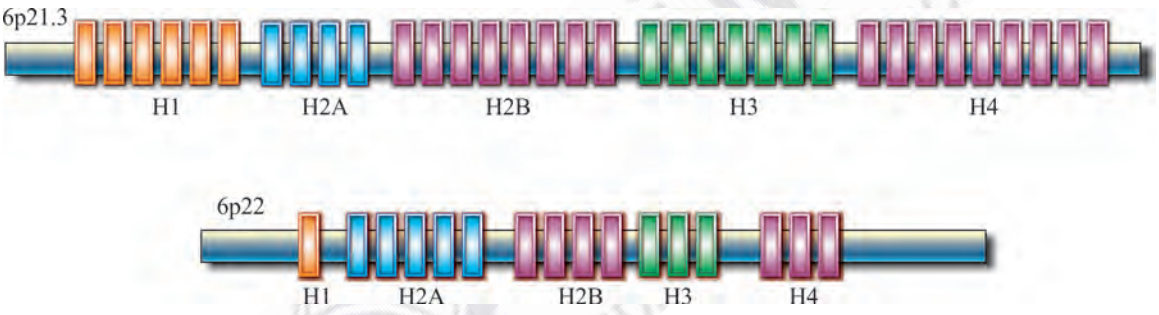


Fig. 24.9. Familias multigénicas complejas. El grupo está formado por genes que se transcriben de forma independiente. La figura representa la familia de los genes para las histonas en el ser humano, con los grupos génicos en las regiones cromosómicas 6p21.3 y 6p22.

Familias multigénicas complejas, controladas por el desarrollo. Se trata de grupos de genes que se activan e inactivan en diferentes etapas del desarrollo ontogenético del organismo. El ejemplo mejor conocido es el de los genes de la hemoglobina. Esta proteína es un tetrámero formado por dos subunidades de tipo α y dos de tipo β. Existen varias formas de estas subunidades que se diferencian en pocos aminoácidos y la forma presente depende de la etapa del desarrollo del organismo.

En el caso de las subunidades de tipo β, existen cuatro variantes (ε, γ, δ y β). Durante el periodo embrionario (menos de 8 semanas después de la fecundación) solo se produce la cadena ε; de la semana 8 a la 41 se sustituye por la γ, y a partir del nacimiento por la β y una pequeña fracción de la δ; igual sucede con las subunidades de tipo α. La familia α se localiza en el cromosoma 16 y la β en el 11. Curiosamente están organizadas en el mismo orden en que se activan (Fig. 24.10).

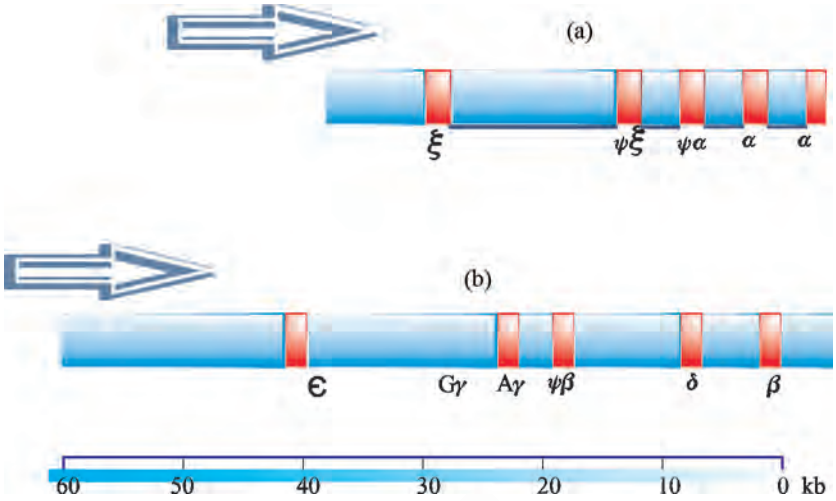


Fig. 24.10. Familias multigénicas complejas, controladas por el desarrollo. Este grupo está compuesto por genes que se activan e inactivan de acuerdo con el momento del desarrollo. (a) La familia génica de la α-globina en el cromosoma 16, ξ es una cadena embrionaria, la α1 y α2 se producen desde la vida fetal hasta la adultez. ψξ y ψα1 representan seudogenes y (b) la familia génica de la β-globina, localizada en el cromosoma 11; ε es una cadena embrionaria, Gγ y Aγ son fetales y las β y δ comienzan en la vida fetal y se mantienen hasta el estado adulto. ψ β1 representa un seudogen. Como se indica en las flechas, estos genes se organizan en el mismo orden en que son activados, lo cual no siempre sucede.

Genoma humano

El genoma humano está constituido por moléculas de ADN, organizadas en 22 pares de cromosomas autosómicos, el par de cromosomas sexuales (XY) y el mitocondrial (también denominado cromosoma M o 25). Sus dimensiones se pueden expresar en términos de número total de pares de bases o de genes. El genoma nuclear haploide humano contiene $3{,}3 \times 10^9$ pb y el mitocondrial, 16 569 pb.

El cromosoma mitocondrial presenta mayor densidad de genes (por ausencia de intrones y espaciadores mucho más cortos) y presenta 13 genes para proteínas, 22 para ARNt y dos para ARNr (12S y 16S).

Desde el año 1990 hasta 2003 se desarrolló una investigación internacional, con el objetivo de descifrar los misterios del genoma humano; se comenzó por determinar la secuencia de bases del ADN cromosómico. Los resultados del estudio inicial desencadenaron una plétora de estudios secundarios, que juntos han incrementado notablemente los conocimientos acerca de la arquitectura y las funciones del genoma, y han originado nuevas visiones acerca de:

- El número y la densidad de genes en los cromosomas.
- Los genes que no codifican proteínas, los llamados genes de ARN.
- La transcripción en su sentido más amplio.
- Las secuencias repetidas y las regiones, con un elevado número de copias.
- La conservación evolutiva.

Número y distribución de genes. El último estimado de los genes del genoma humano establece la existencia de 23 616 genes que codifican proteínas, 6 407 posibles genes codificantes de ARN y 12 346 seudogenes, esto es, secuencias semejantes a los genes codificadores de proteínas, pero que no son funcionales.

Sin embargo, estos números son aproximados, pues existen genes localizados dentro de los intrones; algunos se superponen unos con otros en la misma hebra o en hebras complementarias y comparten secuencias codificantes o reguladoras. Además, se sabe que la mayoría de los genes experimenta un empalme alternativo de su transcrito primario, lo que conduce a la producción de un número de proteínas bastante diferente al número de genes.

La distribución de los genes a lo largo del ADN no es uniforme. La densidad de genes, es decir, número de genes por megabases, varía en los cromosomas y dentro de estos la distribución de los genes es también desigual. El cromosoma con mayor densidad génica es el 19, con 1 443, y el menor es el Y, con solamente 80. Existen regiones carentes de genes, denominadas "desiertos génicos", que presentan, sin embargo, secuencias reguladoras. Algunas de estas características se amplían en la tabla 24.3.

Tabla 24.3. *Distribución de genes y densidad génica por cromosoma*

No.	Pb(a)	Genes	DG(b)	No.	Pb	Genes	DG
1	247,249,719	2,189	8,85	12	132,349,534	1080	8,16
2	242,951,149	1328	5,47	13	114,142,980	361	3,16
3	199,501,827	1112	5,57	14	106,368,585	669	6,29
4	191,273,063	797	4,17	15	100,338,915	641	6,39
5	180,857,866	903	4,99	16	88,827,254	925	10,41
6	170,899,992	1133	6,62	17	78,774,742	1236	15,69
7	158,821,424	1023	6,44	18	76,117,153	295	3,88
8	146,274,826	747	5,11	19	63,811,651	1443	22,61
9	140,273,252	929	6,62	20	62,435,964	617	9,88
10	135,374,737	834	6,16	21	46,944,323	284	6,05
11	134,452,384	1385	10,30	22	49,691,432	519	10,44
X	154,913,754	891	5,75	Y	57,772,954	80	1,38

(a): longitud en pares de bases y (b): densidad génica en número de genes por megabase.

Genes de ARN. Los genes de ARN no codificante (no son ARNm) están ampliamente distribuidos, tal vez como un reflejo de su diversidad. Pueden ser transcritos a partir de cualquiera de las dos hebras del ADN y su número puede ser mayor que el de los genes que codifican proteínas.

Entre los ARN no codificantes, de función conocida, se encuentran los ribosomales (ARNr), de transferencia (ARNt), cortos nucleares (ARNcn) y cortos nucleolares (ARNcno). También aquellos con una posible función reguladora, como los microARN, y los cortos de interferencia (ARNci). Se estima que entre todos deben existir alrededor de 5 000 en el genoma humano.

Se calcula que más del 90 % de estos genes son transcritos y solamente del 35 % al 50 % de ellos se han reconocido como genes en las diferentes bases de datos. El resto se ha agrupado bajo el nombre de "transcrito de función desconocida".

Amplitud de la transcripción. Antes de los estudios del genoma humano se tenía la convicción de que solamente una pequeña fracción del ADN (del 5 %, según algunos autores, y del 10 %, según otros) era utilizada para dirigir la síntesis de ARN, especialmente el ARNm, ARNt, ARNr y los cortos nucleares, nucleolares y citoplasmáticos. Los estudios realizados han puesto de manifiesto que la fracción de ADN que se transcribe es mucho mayor y que, incluso, algunos seudogenes son transcritos, aunque no traducidos, por lo que se piensa que deben tener una función reguladora.

Secuencias repetidas y variación en el número de copias. Otra característica es la existencia de secuencias repetidas que en su conjunto pueden representar el 50 % del genoma. Estas secuencias se encuentran principalmente en los centrómeros, los telómeros y los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Otras secuencias repetitivas están representadas por los elementos dispersos largos, LINE (del inglés, *long interspersed elements*); los elementos dispersos cortos, SINE (del inglés, *short interspersed elements*)

y las secuencias Alu, sitio de corte de la enzima de restricción del mismo nombre, que es un elemento exclusivo del genoma humano.

Por su parte, los seudogenes son tan abundantes como los genes y los conocidos representan aproximadamente el 20 % del genoma.

Conservación evolutiva. Por último, se ha evidenciado que existe un grado elevado de conservación evolutiva, tanto en la zona codificante como en la que no tiene esa función.

Variabilidad interindividual. Algo notable es la existencia del denominado polimorfismo de un solo nucleótido, SNP (en inglés, *single nucleotide polymorphism*). Se trata de la existencia de cambios de un nucleótido en determinadas secuencias y pueden encontrarse más de un millón en el genoma. Esta característica es, probablemente, una fuente importante de variaciones bioquímicas, metabólicas y fenotípicas entre los individuos de una población. Es la principal fuente de variación del genoma entre los individuos. Teniendo en cuenta las variaciones encontradas en los estudios realizados hasta el momento, la semejanza de genomas entre dos individuos es de 99,5 % y no 99,99 % como se creía anteriormente. Estas variaciones son el fundamento de las pruebas de identidad, tan utilizadas en la actualidad tanto en litigios civiles (pruebas de paternidad) como en la investigación criminal.

Distribución de los genes en los cromosomas

De todos los estudios realizados hasta el presente, se pueden derivar algunas características generales en cuanto a la organización de los genes humanos en los cromosomas, que se pueden resumir en las siguientes:

- Generalmente los genes cuyos productos están relacionados evolutiva o funcionalmente se presentan agrupados en los cromosomas, por ejemplo, los genes del complejo principal de histocompatibilidad se encuentran agrupados en el cromosoma 6. Sin embargo, no existen agrupaciones génicas para estructuras y funciones de órganos particulares, como oídos, corazón y pulmones, u organelos subcelulares como lisosomas, mitocondrias, etcétera.
- Los genes que codifican las enzimas que participan en una vía metabólica no se encuentran agrupados en el mismo cromosoma. Así, los genes para las enzimas galactoquinasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa y la galactosa-4-epimerasa, que propician la entrada de la galactosa a la vía glucolítica, se localizan en los cromosomas 17, 9 y 1, respectivamente. Igual sucede con las enzimas del ciclo de la urea, ya que la carbamilfosfato sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, argininosuccínico sintasa, argininosuccínico liasa y la arginasa, se encuentran codificadas en los cromosomas 2, X, 9, 7 y 6, respectivamente. Un hecho curioso es que la triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y lactato deshidrogenasa, relacionadas todas con la vía glucolítica, presentan sus genes agrupados en el cromosoma 12.
- Los genes que codifican para las subunidades de proteínas heteroméricas se encuentran usualmente en cromosomas diferentes. Así, mientras el gen para la subunidad α de la hemoglobina se encuentra en el cromosoma 16, la subunidad β está codificada en el 11. Lo mismo sucede con las formas isoenzimáticas de la lactato deshidrogenasa, cuya subunidad M se codifica en el cromosoma 11 y la H, en el 12. Una excepción notable es el fibrinógeno, cuyas tres subunidades se codifican por genes localizados en el cromosoma 4.
- En contraste con lo anterior, algunos genes codifican más de una cadena polipeptídica. En unos casos se debe al procesamiento del ARNm y en otros, al de la proteína. Un ejemplo del primer caso se evidencia en el gen *CDKN2A*, que posee dos exones que se emplean alternativamente durante el empalme. El uso de un exón origina la proteína INK4A, que es un inhibidor del ciclo celular. El uso del otro exón da lugar a

la formación de la proteína $p14^{ARF}$ relacionada con la respuesta al ADN dañado. Un ejemplo del segundo caso puede ser la insulina, cuyo gen se localiza en el cromosoma 11 y codifica una sola cadena polipeptídica que después de sintetizada experimenta la eliminación de un segmento interno y da lugar a las dos cadenas que aparecen en la molécula funcional. Es también el caso del gen de la proopiomelanocortina, localizado en el cromosoma 2, que por un procesamiento de la proteína codificada por el gen da origen a siete polipéptidos con funciones diferentes.

- Los genes que codifican las formas citosólica y mitocondrial de la misma enzima se encuentran en cromosomas diferentes, como sucede con la transaminasa glutámico--oxalacética, cuya forma citosólica se codifica en el cromosoma 10 y la otra en el 16, y la isocitrato deshidrogenasa en el 2 y el 15, respectivamente.
- Una característica sobresaliente es la existencia de los seudogenes, o sea, secuencias de bases similares a las de genes funcionales, pero que no se expresan, al parecer por haber perdido algún sector indispensable para su transcripción; estos seudogenes ocupan una porción considerable del genoma. Los más conocidos son los de las cadenas α y β de la hemoglobina, en los cromosomas 16 y 11, respectivamente.

El desarrollo que han alcanzado las diferentes técnicas para el estudio de los ácidos nucleicos, mantiene las esperanzas de que en los próximos años se conozcan muchos más elementos acerca de la estructura y la organización del genoma humano. A este objetivo debe contribuir de manera sobresaliente el proyecto del genoma humano, que en 2003 anunció la secuenciación total del genoma humano. A partir de este resultado se pueden realizar estudios comparativos con secuencias de otros organismos, para determinar la función de cada uno de los segmentos de ADN. Esta investigación es trascendental para la biología contemporánea.

Resumen

El material genético de todos los organismos celulares está constituido por el ADN, que puede existir en una sola molécula, como en los procariontes, o en varias, como en los eucariontes, en los cuales, además, está separado del resto de la célula por una doble membrana. El ADN de eucariontes se asocia con proteínas y forma el par cromatina--cromosoma. El número y la forma de los cromosomas son característicos de cada especie.

En los cromosomas se hallan secuencias de bases nitrogenadas que contienen la información necesaria para la síntesis de diferentes tipos de ARN, estos son los genes. El conjunto de todos los genes en un organismo define el genoma. Un gen puede tener muchas formas alélicas, pero una célula solo puede tener dos. Si son iguales, la célula es homocigótica, y si son desiguales, heterocigótica. La pareja de genes que determina un carácter, forma el genotipo, y su manifestación externa es el fenotipo. Un ejemplo característico de la relación genotipo-fenotipo en los seres humanos lo constituyen los grupos sanguíneos ABO.

En la célula eucarionte existen distintos tipos de secuencias nucleotídicas en el ADN: las altamente repetidas, mediana y moderadamente repetidas, y las secuencias únicas. Los genes casi siempre se encuentran en secuencias de copia única, aunque existen notables excepciones, como los de las histonas y los ARNr. Las secuencias altamente repetidas se localizan en los centrómeros y con menor frecuencia, en los telómeros; su función es desconocida. Los genes eucariontes son discontinuos, ya que presentan secuencias intercaladas no codificantes (intrones), separando las codificantes (exones). Los genes cuentan, además, con sus promotores y con sus secuencias funcionales –aunque no codificantes– tanto hacia el extremo 5'-P como hacia el 3'-OH.

Muchos genes relacionados funcionalmente se agrupan y forman familias génicas que pueden ser simples, complejas o reguladas por el desarrollo ontogenético del organismo.

El genoma humano constituye un caso especial dentro de los organismos eucariontes, por la importancia extraordinaria que tiene su conocimiento profundo. Se han localizado más de 1 000 genes en los cromosomas humanos y a partir de numerosos estudios se han podido precisar algunas de sus características más sobresalientes: los genes que codifican proteínas específicas de un órgano o tejido no están agrupados en el mismo cromosoma, así como tampoco los relacionados con una vía metabólica; las subunidades de proteínas heteroméricas se codifican por genes localizados en cromosomas diferentes; algunos genes codifican más de una cadena polipeptídica; también se encuentran separados los genes que codifican formas diferentes de la misma enzima; por último, la presencia de seudogenes en una proporción notable del genoma es un hecho apreciable en el genoma humano.

Estos conocimientos no solo tienen una importancia teórica, sino práctica, sobre todo en el campo de las ciencias médicas.

Ejercicios

1. Un gen A tiene un alelo A'. Si el genotipo femenino es AA y el masculino A'A' ¿cuáles serán los posibles genotipos de los descendientes?
2. ¿Cuál sería el resultado de la pregunta anterior, si los genotipos masculino y femenino hubieran sido AA'?
3. Se ha calculado que en el ADN de *E. coli* existen 1 500 genes. Si cada uno codifica una proteína de 500 aminoácidos y el ADN total es de 4×10^6 pb, ¿cuál será la proporción codificante de ese ADN?
4. ¿Cuáles son los tipos de secuencias de ADN que se encuentran en las células eucariontes y qué relación tienen con las funciones del ADN?
5. A un cultivo de células se le añade [^{3}H]-uridina durante 10 min. Las células se lavan para eliminar el exceso de reactivo. Se sigue entonces la marca radiactiva por los compartimentos celulares. En los primeros minutos después de la exposición, la radiactividad se localiza en el núcleo de todas las células. A medida que pasa el tiempo se observa que las células se comportan de manera diferente, mientras en algunas la radiactividad permanecía en el núcleo, en otras se localizaba en el citoplasma ¿Cómo se pueden explicar estos resultados?
6. Se sabe que la ARN polimerasa I tarda aproximadamente 5 min en sintetizar los ARNr de 28 S, 18 S y 5,8 S. Calcule cuántas moléculas se pueden formar en 8 h si:
   a) Existe un solo gen para los ARNr y se transcribe con una sola polimerasa cada vez.
   b) Existen 100 copias de los genes y cada una es transcrita por una sola molécula de la enzima.
   c) Existen 100 copias de los genes y cada una es transcrita por 100 polimerasas simultáneamente.
7. Un gen está formado por cinco exones y cuatro intrones. El sitio funcional de la proteínas está codificado por el exón tres. ¿Cuántos tipos funcionales de la proteína se pueden formar a partir de este gen?
8. Existe una proteína que se presenta en dos formas: una de ellas está unida a la membrana plasmática y la otra es un producto se secreción. Se ha determinado que las dos formas son codificadas por un gen único. ¿Cómo puede usted explicar este fenómeno?
9. Una proteína está formada por dos cadenas polipeptícas unidas mediante enlaces disulfuro. Estudios moleculares han demostrado que solamente existe un gen para codificar esa proteína. ¿Cómo puede usted explicar este hecho?

Ciclo celular

Una de las características más sobresalientes de los seres vivos es la de poseer, conservar y trasmitir a sus descendientes un elevado grado de organización, que constituye a su vez un requisito indispensable para su funcionamiento. El tipo, el número y la composición de sus moléculas, la forma de disponerse en las células, sus interrelaciones mutuas, la especialización y la diferenciación en la formación de órganos y sistemas, etc., están determinados desde el momento en que un ser comienza a existir. De la interrelación entre el organismo y el medio dependerá que esas características se manifiesten en toda su intensidad.

En este capítulo se presentan los eventos principales que ocurren durante la vida de una célula, así como su relación con los aspectos moleculares que los sustentan. Se hace énfasis especial en las características estructurales y funcionales de las biomoléculas implicadas y en algunos procedimientos para el estudio de estos fenómenos, por tanto, es una introducción al estudio de los procesos relacionados con el manejo, por parte de las células y los organismos, de la información genética.

Información genética

En el capítulo 9 se estudió que las biomoléculas, y especialmente las macromoléculas, podían ser portadoras de información. A ese tipo de información se le denomina información molecular.

Como se expresó en el capítulo anterior, la información genética es un tipo especial de información molecular y sus principales portadores son los ácidos nucleicos.

En los organismos superiores, como el hombre, el material genético se encuentra en las moléculas de ADN que componen la cromatina. Allí se encuentra en forma de la secuencia de bases nitrogenadas, cuyo orden y disposición contienen toda la información necesaria para determinar las características estructurales y funcionales del organismo desde el nivel molecular. Esta secuencia de bases determina la secuencia de aminoácidos de todas las proteínas y de los diferentes tipos de ácidos ribonucleicos. Como la secuencia de aminoácidos de las proteínas determina su conformación y esta, a su vez, su función, se puede afirmar que en el ADN se encuentra la información para la estructura y las funciones de todas las proteínas de un organismo determinado. Un tipo particular de proteínas –las enzimas– participan en la síntesis de los componentes no proteínicos de

las células, como los lípidos y los glúcidos, y de esta forma, indirectamente, también en el ADN se codifican la estructura de los lípidos y los glúcidos, y por extensión de todos los componentes moleculares de la célula y el organismo.

Pero el ADN no solo contiene esa información. Debido a la secuencia de bases y a los accidentes de la estructura, que fueron descritos en el capítulo 11, el ADN contiene, además, las instrucciones para su lectura. Secuencias específicas de bases nitrogenadas determinan, por ejemplo, dónde debe comenzar la lectura de un gen y dónde debe terminar. Algunas de esas secuencias son asiento de proteínas específicas que determinan cuándo, dónde y con cuánta intensidad se debe expresar un gen. Esto es muy importante en los organismos pluricelulares, donde cada órgano posee sus propias proteínas, lo cual le permite realizar funciones específicas.

La información genética fluye desde el ADN hacia los ARN y de estos a las proteínas. De las proteínas transita hacia otros tipos de biomoléculas, cada una de ellas con funciones específicas. Estas diferentes biomoléculas en sus múltiples interacciones van dando lugar a las estructuras de los organitos celulares, las células, y en última instancia del organismo. Y como a cada biomolécula está asociada una función, también la información genética determina las funciones que se realizan a diferentes niveles de organización del organismo. De esta forma, se evidencia la validez del principio de transferencia de información que reza: "No importa cuáles sean los mecanismos implicados ni las etapas por las que atraviese, la información molecular fluye desde una biomolécula con información secuencial hacia moléculas con información conformacional".

Formas de operar con la información genética

Para que una información sea útil, es necesario que se pueda realizar con ella un conjunto de operaciones fundamentales. La información genética no escapa a ese principio.

Las principales operaciones relacionadas con la información genética son: conservación, trasmisión, expresión, reordenamiento y reparación o restauración.

El primer aspecto fundamental que se debe tener en cuenta es la conservación de la información y consiste en mantener inalterable el contenido y orden de la información, pues alteraciones en cualquiera de esos aspectos pueden modificar sensiblemente las funciones de un organismo. Algunas enfermedades como el cáncer se deben, en gran parte, a fallos en los mecanismos para la conservación de la información genética. En el capítulo 32 se analizan detalladamente los mecanismos empleados por los seres vivos para la conservación de la información genética.

Otro aspecto sobresaliente es la trasmisión de la información. En el caso de la información genética esta se trasmite de generación en generación, de manera que cada organismo al reproducirse, da origen a otros organismos esencialmente iguales a él. No importa que los organismos sean unicelulares o pluricelulares; en todos los casos el fundamento de ese fenómeno es la replicación del ADN, a cuyo estudio se dedica el capítulo 26.

Para conocer su contenido la información debe ser expresada. La información genética se manifiesta en todas las células del organismo y su forma fundamental de expresión es mediante la dirección de la síntesis de diferentes tipos de ARN, uno de los cuales, el ARNm, dirigirá a su vez la síntesis de proteínas.

El proceso de expresión de la información genética puede constar de una o dos etapas fundamentales. En el caso de que la información conduzca a la formación únicamente de ARN, entonces basta solo con transferir la información del ADN al ARN y ese proceso recibe el nombre de transcripción. Cuando se trata de la formación de proteínas a la transcripción que forma el ARNm le sigue la traducción o síntesis de proteínas. Tanto en un caso como en el otro el proceso de expresión concluye cuando las moléculas

sintetizadas realizan su función específica dentro o fuera de la célula. La transcripción se estudiará en el capítulo 28 y la traducción, en el 31.

Todo sistema de almacenamiento de información necesita ser reordenado con alguna frecuencia, lo cual se logra en la información genética mediante los procesos de recombinación que serán estudiados en el capítulo 32.

Por último, es necesario tener en cuenta que la información puede ser dañada y, por lo tanto, producirse alteraciones en su contenido o hacerse totalmente ilegible. Como la molécula que contiene la información genética es el ADN, dañar la información significa afectarlo. El organismo dispone de mecanismos para reparar los daños al ADN, como se estudiará en el capítulo 33, pero cuando esto no es posible se presentan variaciones permanentes de la información genética que pueden ocasionar grandes trastornos a las células o al organismo. Este último aspecto se estudiará detalladamente en el capítulo 34.

El conocimiento de los mecanismos moleculares, relacionados con el procesamiento de la información genética, ha permitido en las últimas décadas grandes avances en su aplicación, en varias esferas de la actividad humana. La obtención de productos humanos, como el interferón, el factor de crecimiento epidérmico o la insulina, para el tratamiento de algunas enfermedades; la elaboración de procedimientos para el diagnóstico de algunas enfermedades, las pruebas de identificación tan útiles en procesos civiles y criminales, etc., son algunos de los aportes de la genética molecular contemporánea. En el capítulo 36 se brinda una introducción al estudio de algunos de estos procedimientos, cuyo uso se hace cada día más familiar al público general, debido a su aparición en películas y series televisivas y que, por tanto, deben ser de conocimiento para los profesionales de las ciencias médicas.

El ciclo celular en el tiempo

Todas las células, al pasar de una generación a la siguiente, experimentan una secuencia periódica de eventos, que se denomina ciclo celular.

En muchos microorganismos y en células cultivadas de organismos superiores tiene lugar, previo a cada división, la duplicación casi exacta del tamaño de la célula y del número de sus componentes moleculares. En muchos huevos fertilizados no se produce incremento de tamaño y, aparte del ADN, solo un número reducido de moléculas se duplica durante las primeras divisiones celulares, esto se conoce como clivaje. La mayoría de las células que forman parte de los animales y las plantas se ubica dentro de una categoría intermedia, en la que existe generalmente una duplicación del tamaño celular, pero sin una duplicación exacta de todas sus moléculas.

El periodo o etapa que presenta cambios fácilmente observables al microscopio es la división celular, que ya fue estudiada en el capítulo 23. Como el mecanismo básico general de la división celular es la mitosis, este periodo se designa como M. En un principio, se describía que el ciclo celular estaba formado solo por dos etapas: la mitosis (M) y el resto, denominado interfase, por encontrarse entre la telofase (última fase de una mitosis) y la profase (primera fase de la siguiente).

Otro evento de singular significación dentro del ciclo celular es el proceso de duplicación de la información genética, o sea, la síntesis del ADN, este se conoce como replicación o autoduplicación y es el que hace posible que durante la mitosis cada célula formada contenga la misma información genética, lo que permite que ambas sean de la misma estirpe celular.

Para determinar si la síntesis del ADN se producía de forma continua o discreta, se realizó un experimento sencillo, pero concluyente. Se cultivaron células en un medio adecuado hasta obtener una población celular grande. En un momento determinado se le añade al medio [^{14}C]-timidina (esto es timidina marcada con carbono 14, que es radiactivo);

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

a los pocos momentos el cultivo se lava para eliminar el exceso de reactivo, las células se fijan y la preparación se recubre con una película fotográfica –procedimiento conocido como autorradiografía. Las radiaciones emitidas por el carbono 14 velan la placa, que después de un tiempo prudencial se revela.

Este experimento se basa en una idea muy simple. Si la síntesis del ADN se produce de forma continua durante todo el ciclo celular, todas las células incorporarán [^{14}C]-timidina, pero si se realiza de forma discreta, solo incorporarán [^{14}C]-timidina las que en el momento de la exposición estén en el periodo de síntesis. En la figura 25.1 se exponen los resultados.

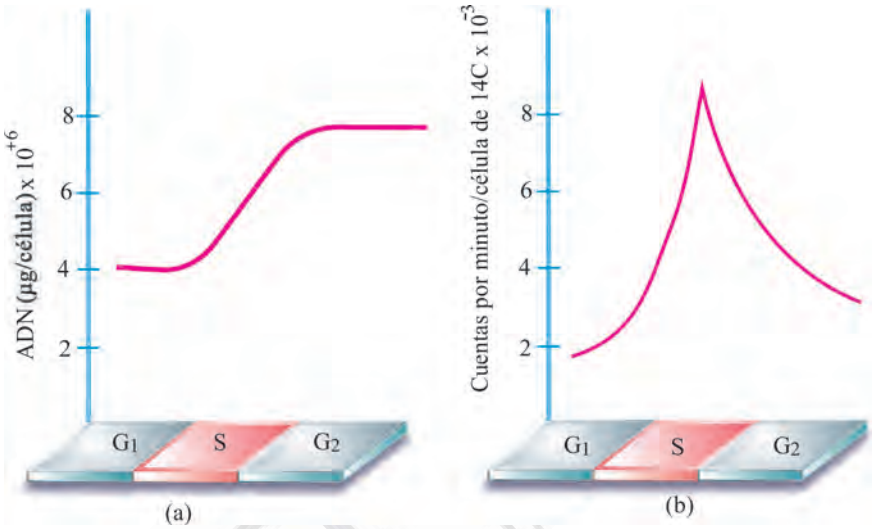


Fig. 25.1. Estudio de la replicación del ADN durante el ciclo celular. (a) El contenido celular de ADN aumenta de manera brusca en un momento determinado del ciclo celular y define el periodo S, y (b) la incorporación de [^{14}C]-timidina durante el ciclo celular presenta un incremento que se corresponde con el periodo S y después desciende. Ambas experiencias demuestran el carácter discreto de la síntesis del ADN.

La síntesis del ADN se realiza de forma discreta en un momento determinado del ciclo.

Este proceso define otra de las etapas que, debido a estar caracterizada por la actividad de síntesis del ADN, se le ha denominado periodo o etapa S. Este proceso ocurre en un periodo que está separado de la división por dos etapas conocidas como: G_1 (entre M y S) y G_2 (entre S y M). La denominación de estos periodos proviene de la inicial de la palabra inglesa *gap*, que significa brecha, hueco o hendidura.

Esta situación se ha comprobado en múltiples organismos eucariontes, por ello se considera que posee un carácter casi universal.

Para calcular la duración de las diferentes etapas del ciclo celular, se procedió de la forma siguiente: mediante control visual se estableció que la fase M (mitosis) duraba aproximadamente 1 h. El ciclo celular de M a M era de 26 h. A un cultivo de células HeLa se le añadió [^{3}H]-timidina durante un tiempo breve y se fueron obteniendo muestras del cultivo en intervalos regulares de tiempo, para analizar el número de células que aparecían marcadas durante el periodo de mitosis. Las primeras células mitóticas no estaban marcadas y lo mismo sucedía con las siguientes, hasta 6 o 7 h después de la exposición a la [^{3}H]-timidina; en ese momento el número de células marcadas crecía extraordinariamente. Era razonable pensar que estas primeras células marcadas se encontraban en la parte final del periodo S cuando se produjo la exposición; de esta manera, se pudo establecer que la duración del periodo G_2 era de 6 h. El mismo razonamiento implicó dilucidar la duración de las demás etapas del ciclo. Unas 17 h después de la exposición, el número de células mitóticas marcadas descendía abruptamente, de ahí que la duración del periodo S se estableciera en 17 - (6 + 1) = 10 h, y el periodo G_1 duraría 26 - 17 = 9 h (Fig. 25.2).

En las células de los organismos adultos, la duración de los periodos M y S es prácticamente constante, de ahí que las variaciones en la duración del ciclo dependen fundamentalmente de la duración de los periodos G_1 y G_2, en especial del primero.

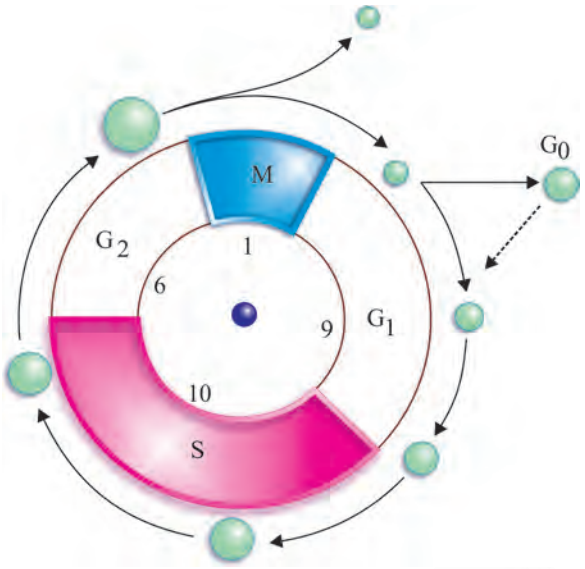


Fig. 25.2. Duración del ciclo celular en una célula animal típica. Los periodos de división celular (M) y de síntesis del ADN (S) están separados por dos fases de duración variable: G_1 y G_2. El periodo G_o se utiliza para tipificar la situación de células que no se dividen o lo hacen raras veces, como las células especializadas de los organismos superiores. Aunque ubicados en igual posición, en el esquema existen diferencias esenciales entre los periodos G_1 y G_o. Los números dentro del círculo representan la duración en horas de cada uno de los periodos en una célula animal típica.

En organismos superiores es frecuente encontrar células especializadas que no se dividen o lo hacen raras veces. En estos casos, después de la división celular (M), la célula pasa a un estado metabólico particular que se diferencia esencialmente del periodo G_1. Hace algunos años, para caracterizar este estado se introdujo el concepto de periodo G_o; para que una célula en este estado pueda llegar a dividirse, tiene que introducirse primero en el periodo G_1, en el cual se producen las condiciones necesarias para la replicación del ADN, primero, y la división celular, después. En las células embrionarias de los primeros estados G_1 y G_2 casi no existen y aún se produce un acortamiento del periodo S, lo que hace que el ciclo celular ocurra a gran velocidad.

Actividad biosintética durante el ciclo celular

La síntesis de los componentes moleculares de la célula durante el ciclo se puede realizar de forma continua o discreta. En este último caso, su periodo de síntesis puede ser largo o corto y pudiera ocurrir en cualquiera de las etapas del ciclo.

Para el estudio de la síntesis de los diferentes componentes celulares y sus variaciones durante el ciclo es necesario contar con células de crecimiento sincronizado y que todas se encuentren en el mismo periodo del ciclo celular.

Todos los métodos descritos para la obtención de cultivos de células de crecimiento sincrónico se pueden dividir en dos grupos: los de selección y los de inducción. Generalmente los primeros tienen un rendimiento mucho menor que los segundos.

Los métodos de selección consisten en aprovechar determinada propiedad especial de las células en algunas de las etapas del ciclo y, haciendo uso de ella, separarlas del resto. Por ejemplo, las células en G_2 son mucho más grandes que en G_1 y, por ello, es posible separarlas por centrifugación en gradiente de densidad (Fig. 25.3).

Los métodos de inducción química tienen un uso más generalizado y dependen de la acción selectiva de un inhibidor. Inhibidores de la síntesis del ADN, como la fluordesoxiuridina, la hidroxiurea o concentraciones elevadas de timidina (2 mM) bloquean el crecimiento celular en el periodo S, mientras que inhibidores de la mitosis, como la colchicina, lo hacen en metafase. Después de retirar el inhibidor, las células acumuladas en la fase anterior en la cual actuó el inhibidor empleado, continúan el ciclo sincronizadamente. Se puede aumentar el rendimiento si el procedimiento se repite más de una vez (Fig. 25.4).

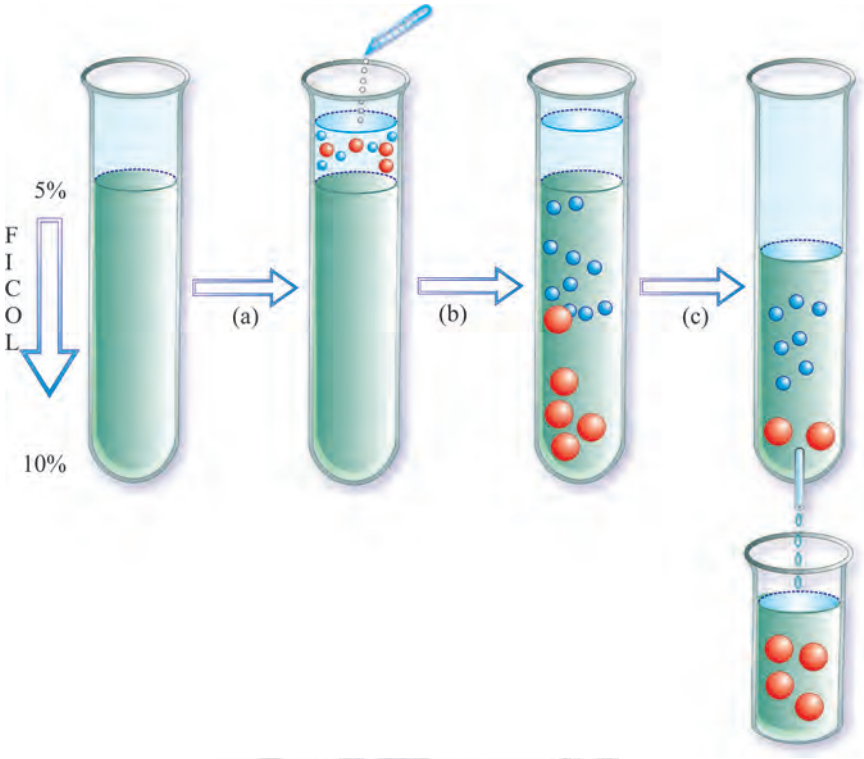


Fig. 25.3. Sincronización por selección. (a) Las células cultivadas se colocan en tubos de centrífuga que contienen ficol en una concentración que va desde 5 % en la boca hasta 10 % en el fondo, creando así un gradiente de densidad; (b) al ser centrifugadas las células, se desplazan hacia abajo y se acumulan en una zona donde su densidad se corresponde con la del medio de centrifugación y (c) como las células en G_2 son muy grandes, se desplazan mucho más hacia el fondo. El tubo se perfora por el fondo y se obtiene la fracción que contiene las células en periodo G_2, y se cultivan nuevamente.

Utilizando células de crecimiento sincronizado, se han podido estudiar los procesos de síntesis de los principales componentes moleculares de las células.

Para determinar el momento del ciclo, cuando se produce la síntesis de un componente específico, se pueden seguir dos procedimientos: medir durante todo el ciclo el contenido celular de ese componente o medir la actividad biosintética por la incorporación de precursores marcados de forma radiactiva.

En contraste con la replicación, la síntesis de los ARN estudiada por la incorporación de [^{3}H]-uridina, parece ser continua durante todo el ciclo, con excepción de la mitosis, tanto en animales y plantas como en microorganismos.

La intensidad de este proceso, conocido también como transcripción, va aumentando en la medida que avanza el ciclo y comienza a disminuir en G_2 para llegar prácticamente a cero durante la mitosis. Los estudios realizados indican que, al menos en la mayoría de las células, esta situación ocurre con los tres tipos principales de ARN (mensajero, ribosomal y de transferencia) (Fig. 25.5).

Las proteínas, en general, tienen una síntesis continua en el transcurso de todo el ciclo, con significativa disminución durante la mitosis, como se evidencia por la incorporación de [^{3}H]-prolina. Esto concuerda con lo expresado para los ARN mensajeros, como se verá más adelante. No obstante, existen grupos de proteínas específicas cuya síntesis es discreta, esto es solo en un periodo determinado del ciclo. Tal es el caso de las histonas, cuya síntesis se limita al periodo S simultáneo con la duplicación del ADN. El proceso de síntesis de proteínas se denomina traducción (Fig. 25.6).

El estudio de la síntesis de los lípidos de membrana se hace mucho más difícil por la heterogeneidad estructural de estos compuestos. Sin embargo, las experiencias midiendo la incorporación de [^{3}H]-colina o [^{3}H]-inositol permiten afirmar que estos componentes celulares también se sintetizan de forma continua durante el ciclo celular (Fig. 25.7).

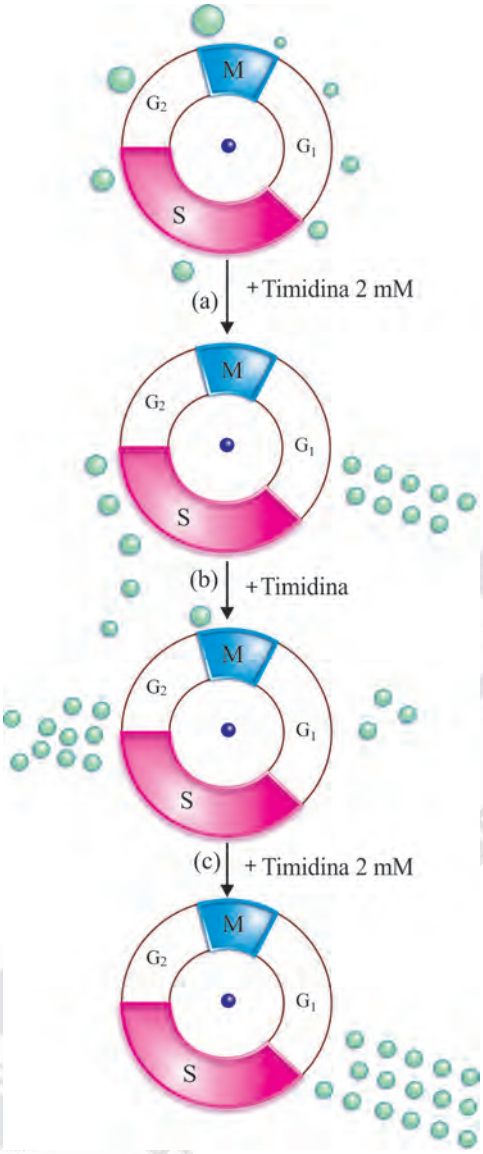


Fig. 25.4. Sincronización por inducción. Un cultivo de células se incorpora a un medio que contiene timidina suficiente para alcanzar una concentración final de 2 mM durante un tiempo igual a G_2 + M + G_1 (a). Como la timidina en esa concentración inhibe la síntesis del ADN, las células van acumulándose al final de G_1. El inhibidor se retira (b) y después de algunos ciclos de división celular el procedimiento se repite (c), con lo cual se logra un rendimiento considerablemente mayor.

Estudios similares demuestran que también es continua la síntesis de polisacáridos complejos y otros componentes celulares.

Si se estudia la velocidad de síntesis de muchos de estos componentes y se calcula el incremento de concentración que debía producirse en un periodo determinado, y se compara con el incremento que realmente se ha producido, determinado de forma experimental, se comprueba que el incremento observado es siempre menor que el esperado.

Esto significa que los componentes celulares están sometidos a un recambio constante, o sea, que se degradan constantemente. Los incrementos de concentración que se producen son entonces la resultante de la intensidad con que transcurren los dos procesos contrarios: la síntesis y la degradación. Estos resultados constituyen una evidencia más del principio del recambio continuo.

Los fenómenos de conservación, transmisión y expresión de la información genética se ubican de forma continua o discreta a lo largo del ciclo celular; su ubicación y los mecanismos moleculares de esos procesos se tratarán en los capítulos siguientes.

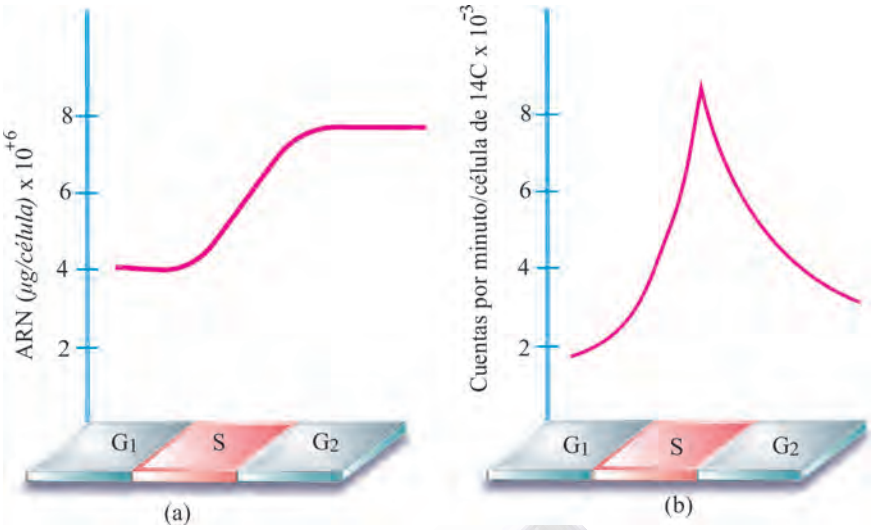


Fig. 25.5. Estudio de la transcripción durante el ciclo celular. (a) El contenido celular de ARN total aumenta de forma continua durante el ciclo celular y solo comienza a disminuir al final del periodo G_2 y (b) la incorporación de un precursor de los ARN, como la [^{3}H]-uridina durante el ciclo celular, se va incrementando hasta la parte final del periodo G_2, donde desciende lentamente. Estos dos experimentos evidencian que la síntesis de los ARN, la transcripción, se produce de manera ininterrumpida durante el ciclo de vida de la célula, con excepción de la mitosis.

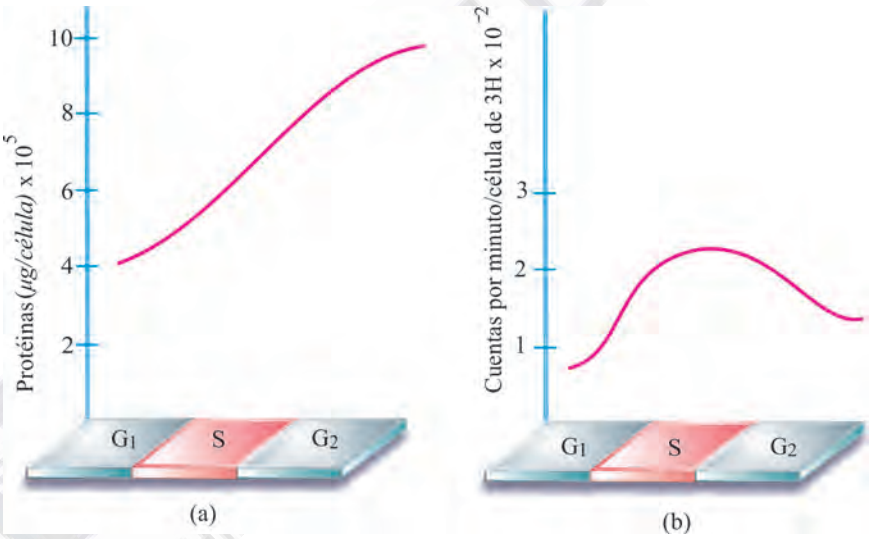


Fig. 25.6. Estudio de la traducción durante el ciclo celular. (a) El contenido total de proteínas celulares se incrementa de forma continua durante el ciclo celular y (b) la incorporación de aminoácidos a las proteínas, medida con [^{3}H]-prolina, se produce con intensidad variable durante todo el ciclo. Los resultados de estos experimentos confirman que la síntesis de proteínas sucede de forma continua.

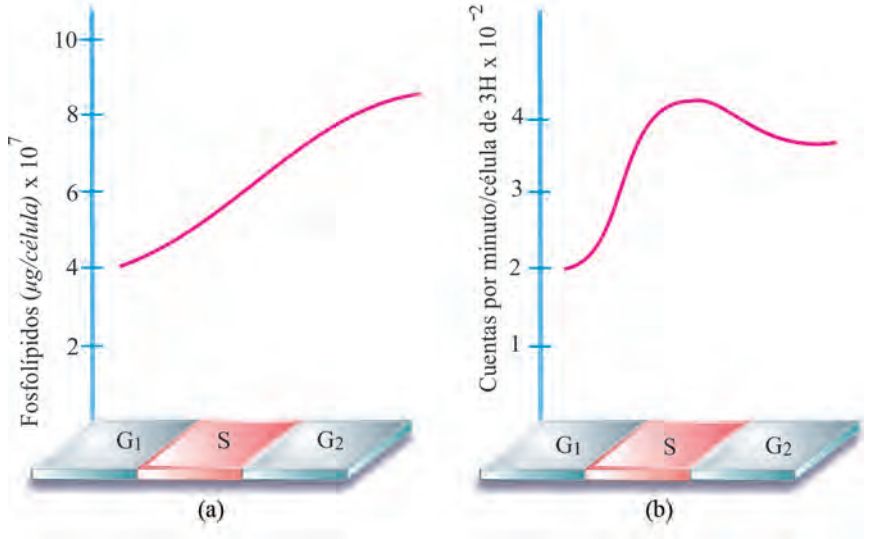


Fig. 25.7. Estudio de la síntesis de lípidos de membrana durante el ciclo celular. (a) La figura muestra que el contenido celular de fosfolípidos aumenta de forma continua durante el ciclo celular y (b) el resultado del estudio de incorporación de [^{3}H]-colina (precursor de la síntesis de fosfatidil-colina y esfingomielinas) muestra que esta es continua durante el ciclo. Los dos experimentos demuestran que al igual que otros componentes moleculares, la síntesis de los lípidos de las membranas es un proceso continuo.

Eventos de cada etapa del ciclo celular

El estudio detallado de los eventos que tienen lugar durante el ciclo celular comenzó a mediados de la década de los años 80. Utilizando técnicas de sincronización de crecimiento se pudieron precisar los eventos moleculares principales que ocurrían en cada una de las etapas. A pesar de lo mucho que se ha avanzado en este campo, dicho conocimiento todavía no es totalmente completo.

Así, se ha podido definir que si la célula está dentro del ciclo de crecimiento, no se encuentra en reposo (etapa G_0), aproximadamente a la mitad de la fase G_1 se produce un incremento notable del transporte de nutrientes hacia el interior de la célula, especialmente de glucosa y aminoácidos. También aumenta la intensidad de la oxidación de la glucosa con formación de grandes cantidades de ATP, así como un notable incremento de la síntesis de proteínas. Al final de esta etapa se puede comprobar un intenso transporte de proteínas desde el citoplasma hacia el núcleo. Se ha supuesto que estas proteínas son las que intervienen en la replicación del ADN, por eso se ha interpretado que la etapa G_1 prepara la célula para su reproducción.

En la etapa S se produce la replicación del ADN. En las células de organismos superiores este proceso se lleva a cabo simultáneamente en todas las moléculas de ADN y en cada una de estas se emplean numerosos sitios para la realización del proceso. Sin embargo, se ha comprobado que el proceso tiene un orden determinado. De esta manera existen zonas del ADN que se replican al inicio de la etapa S (replicación temprana), otras a mediados de esta etapa (replicación intermedia) y otras casi al final de la misma (replicación tardía). Como se estudiará en el capítulo 26, se trata de un proceso complejo en el cual intervienen numerosas proteínas. Simultáneamente, sistemas enzimáticos van rectificando los errores cometidos durante la replicación de manera que el ADN recién formado sea idéntico al que le dio origen. La replicación del ADN es el antecedente obligado de la división celular.

La etapa G_2 se puede dividir en dos momentos: en su primera mitad culmina la replicación de los telómeros, se produce la metilación del ADN en bases de secuencias específicas y continúa el proceso de crecimiento celular. En la segunda mitad comienza la condensación de la cromatina, que se va compactando hasta que se forman los cromosomas. Cuando los cromosomas se hacen visibles con el microscopio óptico, comienza la mitosis, proceso que fue estudiado en el capítulo 23. En la etapa G_2 se dan los "toques" finales para que la célula se divida.

En la etapa M se culmina el proceso de división celular con la formación de las células hijas. El proceso de la mitosis fue estudiado en el capítulo 23.

Progresión del ciclo celular

En última instancia la progresión de las células por las diferentes etapas del ciclo celular es el resultado de mecanismos moleculares que funcionan con elevada precisión.

Hasta la segunda mitad de la década de los años 80 estos mecanismos eran casi desconocidos. Debido a los progresos alcanzados en el estudio de la transformación cancerosa se ha logrado penetrar en las características moleculares de esos mecanismos. Aun cuando quedan aspectos por resolver, hoy día existe una visión bastante aproximada de los mecanismos moleculares básicos que hacen progresar el ciclo celular.

En este proceso existen tanto mecanismos positivos que estimulan la proliferación celular, como los negativos, que la inhiben.

En ambos casos, al menos en las células en cultivos y las de los individuos adultos, las señales estímulos que desencadenan las respuestas, provienen del exterior de la célula. El grupo mejor conocido de señales positivas está constituido por un grupo de

polipéptidos, denominados factores de crecimiento, los cuales son específicos para tipos particulares de células. Estos factores se unen con receptores específicos, localizados en la superficie celular; a partir de esa unión se produce la activación de un grupo de proteínas quinasas, que en forma de cascada enzimática van transfiriendo la información recibida del exterior hacia el núcleo celular, donde se activa la replicación del ADN, primero, y la división celular después.

Las señales negativas son menos conocidas, pero su existencia no se discute. Esta certeza nace del análisis de la inhibición del crecimiento por contacto, o sea, cuando se cultivan células estas crecen y van cubriendo la superficie del soporte donde fueron sembradas, hasta que entran en contacto unas con otras. En ese momento el crecimiento se detiene.

Las células poseen en su superficie moléculas que interactúan con proteínas de la matriz extracelular y esta interacción no solo las mantiene en su sitio, sino que generan señales que inhiben el crecimiento. Entre esas proteínas de superficie se destacan las integrinas, cuya interacción con proteínas de la matriz provoca la fosforilación y la activación de la quinasa de adhesión focal, FAK (del inglés, *focal adhesion kinase*) que a su vez fosforila a la paxilina. La paxilina provoca la reorganización del citoesqueleto y la formación de las placas de adhesión. Esta estructura inhibe, de alguna manera, la proliferación celular, lo que se evidencia en el hecho de que cuando las células se liberan de su unión con la matriz, experimentan un tipo de muerte celular programada, que se conoce como anoikis.

En condiciones normales los mecanismos positivos y negativos forman una intrincada red molecular cuyo funcionamiento armónico permite que el grado de proliferación celular se adapte perfectamente al momento del desarrollo del organismo y a las condiciones ambientales imperantes. La alteración de esa red reguladora es el origen de la transformación cancerosa.

Sin embargo, a pesar de las numerosas señales ambientales que influyen en la progresión del ciclo celular, las moléculas participantes en la última etapa del proceso de regulación se reducen a unas pocas familias de proteínas.

Los estudios más profundos se han realizado en levaduras, un eucarionte monocelular, en las cuales es mucho más fácil la obtención de mutantes que en células de organismos superiores. Los mutantes que exhiben alguna alteración del ciclo celular se denominan CDC (*cell division cycle*) y se han ido numerando de acuerdo con el orden de aparición. Se ha comprobado que cada uno de ellos presenta alteraciones en un gen único. Genes homólogos a los CDC de levaduras se han identificado en otras especies, incluso en el hombre, y casi siempre se refieren con la misma nomenclatura que los de levaduras.

Dos grandes sistemas multiproteínicos intervienen en hacer progresar el ciclo celular de una etapa a la siguiente, estos son el sistema de las ciclinas y sus quinasas acompañantes y el sistema de la ubiquitna y el proteasoma.

Otras proteínas intervienen en el proceso con diversas funciones, casi todas sustratos de estos sistemas. A estos grupos se deben agregar todas las especies moleculares que intervienen en la replicación del ADN y la mitosis.

Sistema de las ciclinas y sus quinasas

El sistema de las ciclinas y sus quinasas acompañantes está formado esencialmente por cuatro familias de proteínas: las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas, los inhibidores de las quinasas y las fosfoproteínas fosfatasas.

Las ciclinas son un grupo de proteínas con relativo bajo peso molecular, que pueden ser consideradas como el componente principal de estos mecanismos reguladores. Su nombre deriva de que su concentración varía en forma cíclica durante el ciclo celular.

En un momento determinado su síntesis es estimulada y su concentración aumenta de manera brusca en la célula, pero momentos después se degradan a gran velocidad y su concentración intracelular disminuye. Por ejemplo, la ciclina D comienza a sintetizarse a mediados de la fase G1 y su concentración se incrementa notablemente mientras el ciclo progresa por esta etapa, pero en la transición hacia la etapa S se degrada, de manera que al final de esta etapa su concentración intracelular es casi cero. Las ciclinas funcionan como las subunidades reguladoras de las proteínas quinasas, dependientes de ciclinas Cdk (del inglés, *cyclin-dependent kinases*) (Fig. 25.8). Cuatro son las ciclinas que intervienen en el ciclo celular: A, B, D y E.

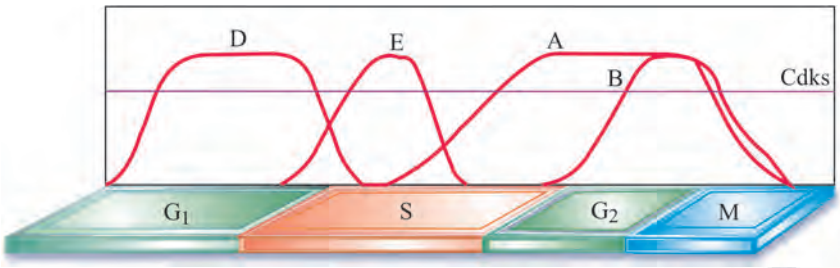


Fig. 25.8. Variación de la concentración de ciclinas durante el ciclo celular. Se muestra cómo la concentración de cada una de las principales ciclinas fluctúa durante el ciclo celular. En todos los casos la concentración aumenta rápidamente en un momento, debido al incremento de la síntesis. Se alcanza un nivel máximo cuya duración es diferente para cada una y después ocurre un rápido descenso, debido a la degradación de estas proteínas. Sin embargo, la concentración de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) se mantiene invariable durante todo el ciclo. Como las quinasas son inactivas en ausencia de ciclinas, en cada etapa del ciclo su especificidad será diferente, en dependencia de la ciclina a la cual está unida.

Las quinasas dependientes de ciclinas, Cdk son enzimas que transfieren un grupo fosfato del ATP hacia residuos de serina o treonina de proteínas sustratos. La unión con las ciclinas es imprescindible para su funcionamiento y de ahí su nombre, pues las ciclinas no solo provocan la activación de la enzima, sino que determinan su especificidad de sustrato.

Las Cdk resultan reguladas por varios mecanismos, en primer lugar la unión a las ciclinas, y también por ciclos de fosforilación y desfosforilación. La enzima mejor estudiada es la Cdk2 y las posiciones de los aminoácidos se refieren a ellas. Las Cdk presentan tres sitios de fosforilación: uno en la treonina 14 (T14), otro en la tirosina 15 (Y15) y el tercero en la treonina 161 (T161). La fosforilación de los dos primeros sitios tiene efecto inhibitorio, mientras que la del tercero es activante.

Las quinasas Wee y Myt1 fosforilan específicamente en T14 y Y15, mientras que estas posiciones son desfosforiladas para la fosfoproteína fosfatasa Cdc25. La fosforilación en T161 se realiza por la quinasa activadora de la Cdk2, CAK (del inglés, *Cdk activating kinase*), cuya subunidad catalítica es la Cdk7 y la reguladora es la ciclina H. La desfosforilación en este sitio es catalizada por la fosfatasa asociada con las quinasas, KAP (del inglés, *kinase associated phosphatase*) (Fig. 25.9).

A diferencia de las ciclinas, las Cdk se sintetizan de forma constitutiva durante todo el ciclo celular, pero son inactivas, a menos que se encuentren unidas a un tipo particular de ciclinas.

Entre las fosfoproteínas fosfatasas que participan en el ciclo, la más conocida es la Cdc25, que cataliza la hidrólisis de los enlaces ésteres fosfóricos de la Cdk2 en T14 y Y15. Otras fosfatasas menos específicas también intervienen.

Los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDI) son un grupo de proteínas cuyas masas moleculares se encuentran en el rango de 15 a 30 kD, y los hay con elevado grado de especificidad y otros menos específicos.

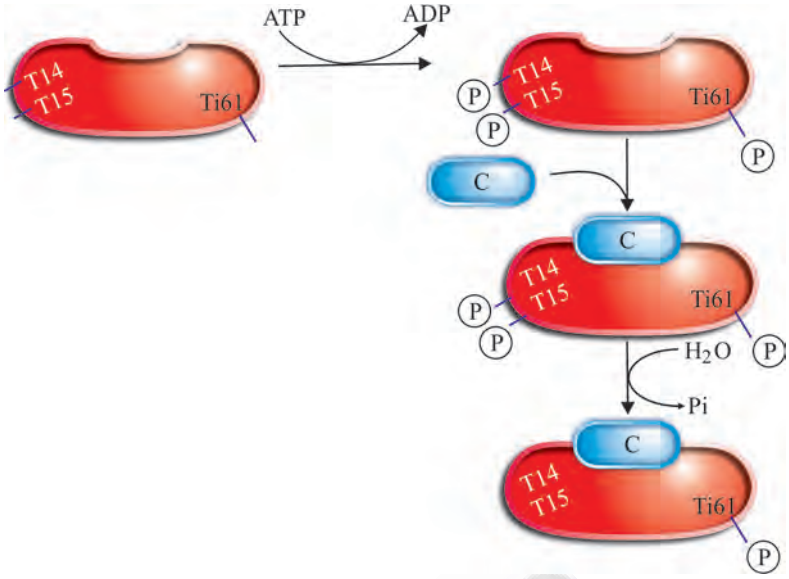


Fig. 25.9. Activación de las quinasas dependientes de ciclinas. La estructura de las Cdks contiene tres sitios de fosforilación y uno de unión a las ciclinas. En ausencia de las ciclinas y de la fosforilación son inactivas. La fosforilación de los tres sitios las mantiene inactivas, aun cuando estén unidas a las ciclinas. El estado totalmente activo se alcanza cuando la quinasa unida a la ciclina está fosforilada solo en la treonina 161.

En las células de mamíferos se pueden distinguir dos grupos de CDI: la familia Cip/ /Kip y la familia INK4. Los miembros de la familia Cip/Kip inhiben los complejos de las ciclinas con la Cdk2, Cdk4 y Cdk6, que son necesarios para la progresión de G_1 a S y de S a G_2. Por su parte, la familia INK4 es muy específica para los complejos que forman las ciclinas D con Cdk4 y Cdk6 que garantizan la progresión del ciclo por G_1.

Los distintos miembros de cada familia actúan en tejidos específicos y proporcionan un mecanismo mediante el cual se puede modificar la progresión del ciclo celular como respuesta a señales intracelulares y extracelulares.

Sistema de la ubiquitina y el proteasoma

Se trata de un sistema que interviene en numerosos procesos celulares mediante la proteólisis selectiva y específica. El sistema funciona en dos etapas: en la primera, la ubiquitina se une a un residuo de lisina de la proteína a degradar; en la segunda, la proteína marcada con la ubiquitina es degradada por el proteasoma.

La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos que se encuentra muy conservado desde las levaduras hasta el hombre. Por su parte, el proteasoma es un complejo multiproteínico gigantesco, de aproximadamente 25 MDa (26S) que posee actividad de endoproteasa (de ahí su nombre). Está compuesto por dos copias de al menos 32 subunidades diferentes, muy conservadas en los eucariontes. El complejo tiene la forma de un cilindro hueco y en él se distinguen dos componentes: la partícula reguladora de 19S, que ocupa los extremos del cilindro, y la partícula central o catalítica de 20S. Una imagen de los componentes del sistema se muestra en la figura 25.10.

La marca con la ubiquitina se produce en tres etapas. La primera es la unión de la ubiquitina al centro activo de la enzima activadora de ubiquitina (E1). Esta unión requiere de ATP y se forma un enlace tioéster entre el carboxilo de la glicina última de la ubiquitina y un grupo sulfihidrilo del centro activo de la enzima. Las enzimas de este tipo son escasas, de manera que en levaduras solamente existe una. En la segunda etapa, se transfiere la ubiquitina desde la E1 hacia la enzima conjugante de ubiquitna (E2), también mediante un enlace tioéster. Al contrario de las E1, estas enzimas son más numerosas. Por último la ubiquitina ligasa (E3) transfiere la ubiquitina desde E2 hacia la proteína sustrato y la une a un residuo de lisina. Posteriormente, la E4 transfiere otra molécula de ubiquitina hacia la lisina 48 de la primera ubiquitina, después otro hacia la segunda y así sucesivamente hasta formar una

cadena de poliubiquitina. Se ha demostrado que cuatro ubiquitinas son suficientes para que la proteína sea reconocida por el proteasoma. Es la ubiquitina ligasa (E3) la que determina la especificidad de sustrato y se encuentra en gran número en las células. El proceso de marca con ubiquitina se resume en la figura 25.11. En el año 2004, Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose recibieron el Premio Nobel de Química por el descubrimiento de la degradación de proteínas mediada por la ubiquitina.

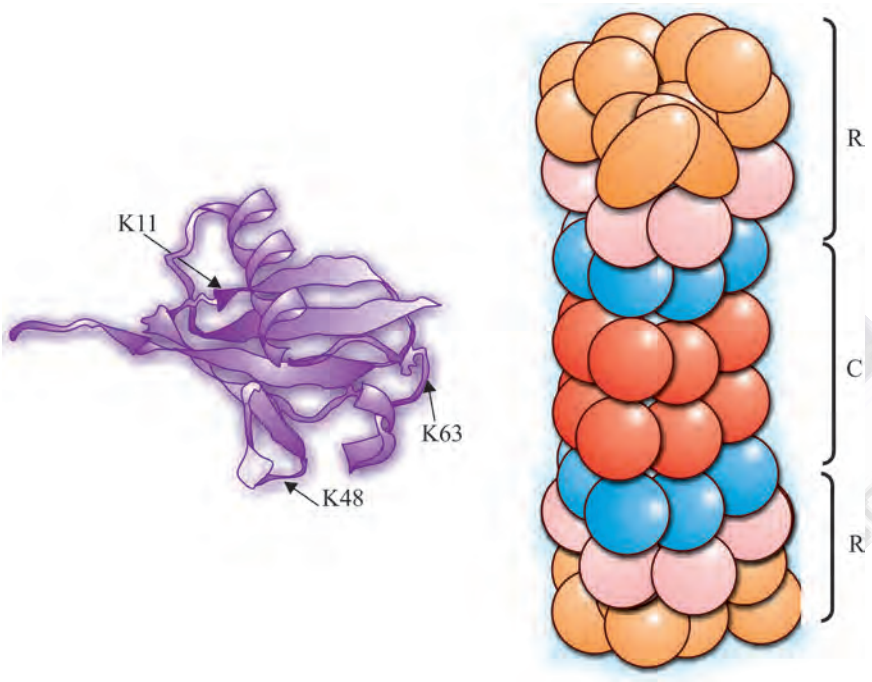


Fig. 25.10. Componentes de la vía ubiquitina proteasoma. A la izquierda se representa la estructura de la ubiquitina, se señala la ubicación de las tres lisinas principales: K11, K48 y K63. A la derecha, la estructura del proteasoma con sus dos subunidades reguladoras (R) en los extremos y las dos subunidades catalíticas (C) en el centro.

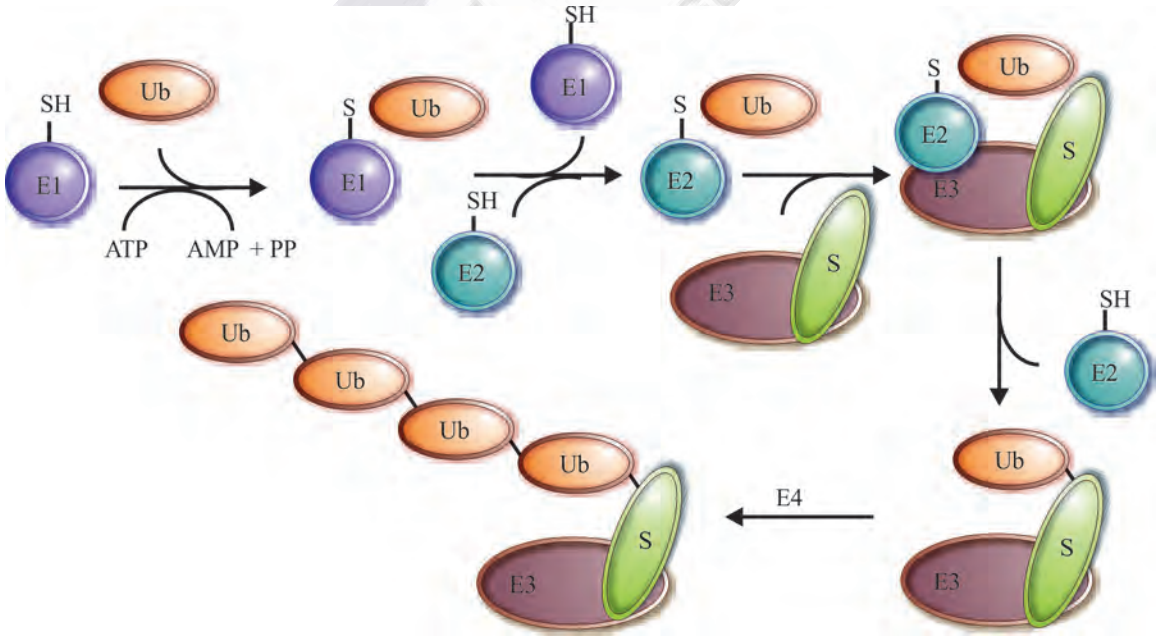


Fig. 25.11. Proceso de marca con ubiquitina. En el primer paso la ubiquitina se une a la E1 en una reacción que requiere de ATP. Desde la E1 se transfiere a la E2 y de esta a la E3. La enzima E4 añade ubiquitinas a la primera, hasta formar la poliubiquitina que es la marca reconocida por el proteasoma.

Dos complejos multiproteínicos con actividad de ubiquitina-ligasa (E3) intervienen en la regulación de la progresión del ciclo celular, estos son el complejo SCF y el complejo promotor de la anafase APC. La acción consecutiva e interrelacionada hacen progresar el ciclo celular por sus diferentes etapas.

El complejo SCF, así nombrado por tres de sus componentes, la proteína asociada a la quinasa de la fase S, Skp1 (del inglés, *S-phase kinase associated protein 1*), un miembro de la familia de la culina (culina-1, del inglés *cull*: seleccionar, separar) y otro de la familia de proteínas con motivo F. Un componente obligado es una proteína de la familia RING, que es la Rbx1 (del inglés, *ring box protein*). Las proteínas con motivo F son las que determinan la especificidad de sustrato y se acostumbra a destacarlas como superíndices, al escribir el nombre del complejo (por ejemplo, $SCF^{\beta TrCP}$).

En general, el complejo puede ser descrito como formado por una plataforma en forma de herradura (culina), con la subunidad catalítica (Rbx en un extremo), unida a la E2, y la proteína adaptadora en el otro (Skp1) unida a la proteína con motivo F, que es la que une el sustrato. Lo más importante es la rigidez de la zona central de la herradura, que permite que los extremos con sus proteínas unidas se mantengan a una distancia constante de 59 Å, que al parecer es la óptima para la catálisis.

El complejo promotor de la anafase APC (del inglés, *anaphase-promoting complex*), también conocido como ciclosoma, está compuesto por 15 a 17 subunidades, según la especie, y muchas de ellas están muy conservadas. Es tal vez la más compleja de las ubiquitina ligasas que se conocen, pues posee una masa molecular de aproximadamente 1 MDa. Para su actividad requiere de proteínas de la familia Cdc20 (Cdc20 y Cdh1 [del inglés, Cdc20 homologue 1]) que en gran medida determinan la especificidad de sustrato. Un esquema de la organización estructural de estos dos complejos se presenta en la figura 25.12.

A diferencia del complejo SCF, cuyos sustratos deben ser fosforilados previamente, el APC tiene la habilidad de reconocer diferentes sustratos no modificados en diferentes momentos del ciclo celular.

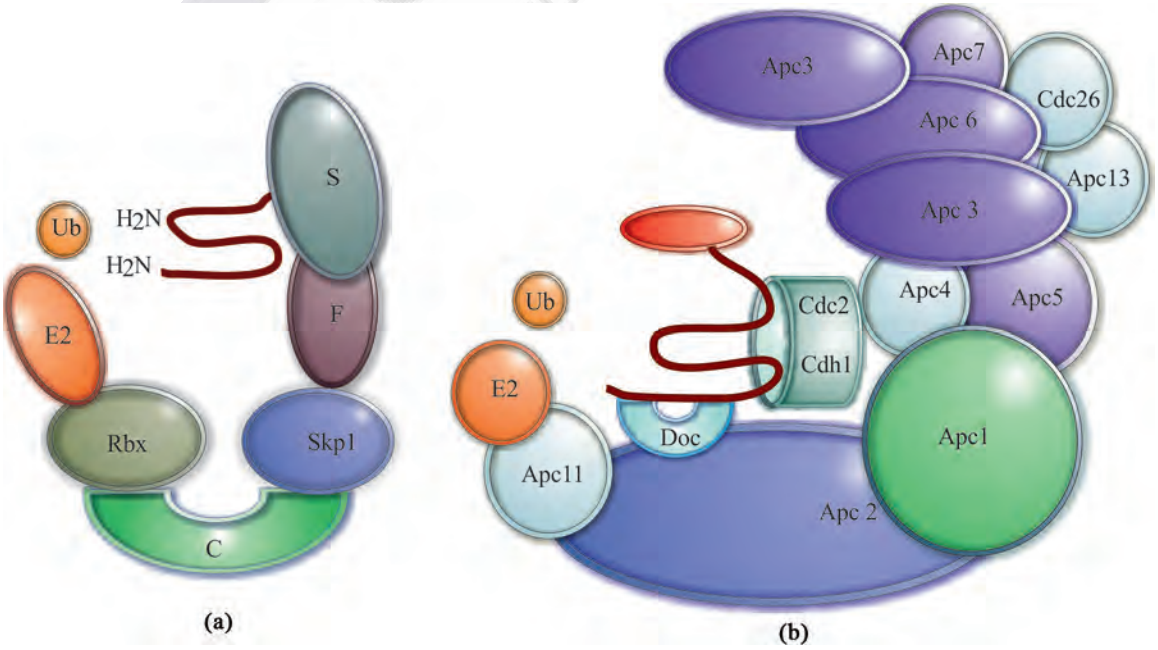


Fig. 25.12. Complejos E3 que regulan el ciclo celular. (a) Representa el complejo SCF, unido al sustrato por el componente F, que es el que confiere la especifidad de sustrato y (b) el complejo APC unido al cofactor Cdc20, que es el que participa en el reconocimiento del sustrato.

Una vez conocidos los componentes moleculares que intervienen en la regulación del ciclo, es conveniente dar al menos una idea de cómo transcurre el proceso, aunque es bueno recordar que todavía no se conocen todos sus aspectos.

El ciclo al nivel molecular

Al final de la mitosis comienza la descondensación de los cromosomas y el ADN se hace accesible a las proteínas. A los promotores de los genes que codifican las proteínas que intervienen en la replicación del ADN se une el factor de transcripción E2F que estimula la transcripción, pero a este se une la proteína del gen del retinoblastoma (Rb) que inhibe la acción de E2F, de manera que los genes cuyos productos intervienen en la replicación están silenciados.

A mediados de la etapa G_1 y como respuesta a la estimulación de la célula por factores de crecimiento, comienza a incrementarse la síntesis de la ciclina D, la cual se une a la Cdk4 (o la Cdk6) y cataliza la fosforilación de Rb. La proteína Rb, al ser fosforilada, se separa de E2F y este estimula la transcripción de los genes implicados en la replicación del ADN. En la transición entre G_1 y S, la ciclina D es degradada por el complejo SCF^{Skp2}. Ya al final de G_1 había comenzado la síntesis de la ciclina E, que alcanza su concentración máxima precisamente al comienzo de S. La ciclina E forma complejo con la Cdk2 que fosforila proteínas relacionadas con el comienzo de la replicación del ADN, como se estudiará con más detalle en el capítulo 26. Al comenzar la fase S, la ciclina E es degradada por el complejo SCF^{Cdc4}. Se incrementa entonces la síntesis de la ciclina A, que forma un complejo con la Cdk2 que cataliza la fosforilación de E2F, con lo cual se suprime la síntesis de las proteínas replicativas. Un resumen de estos eventos se muestra en la figura 25.13.

En el tránsito de S a G_2 comienza a incrementarse la concentración de la ciclina B. Los complejos formados por la Cdk1 con la ciclina B se conocen como factor promotor de la mitosis (MPF). Varias son las proteínas nucleares fosforiladas por los complejos ciclina A/Cdk2 y ciclina B/Cdk1 que hacen progresar la mitosis hasta la metafase.

Al llegar a la metafase, las ciclinas A y B son degradadas por el APC^{Cdc20} con lo cual la actividad de la quinasa disminuye considerablemente y se incrementa la actividad relativa de las fosfatasas. Esto permite el tránsito hacia la anafase y la terminación de la mitosis. La participación de los dos sistemas en la progresión del ciclo celular se resume en la figura 25.14.

Regulación del ciclo celular

Un proceso tan importante en la vida de la célula, como su progresión por las diferentes etapas del ciclo celular, debe estar controlado minuciosamente. Existen factores que estimulan el ciclo y otros que lo inhiben, se trata por lo general de factores externos; sin embargo, el control más importante se realiza internamente y garantiza que la célula no pase a una etapa sin haber realizado de forma correcta la etapa anterior. Esto ocurre debido a la existencia de mecanismos que detienen el ciclo celular en determinados momentos y no permiten que la célula transite hacia la etapa siguiente. Algunos de estos momentos ya han sido identificados y se les denomina puntos de control (*checkpoints*).

La señal fundamental que controla la progresión del ciclo celular es la integridad del ADN.

De esta forma, el estímulo más importante que desencadena la respuesta es el daño al ADN, especialmente las roturas de una o las dos hebras de la molécula; debido a esto se definen los puntos de control por daño al ADN, como "los mecanismos que hacen más lento o detienen la progresión del ciclo celular como respuesta de un daño al ADN".

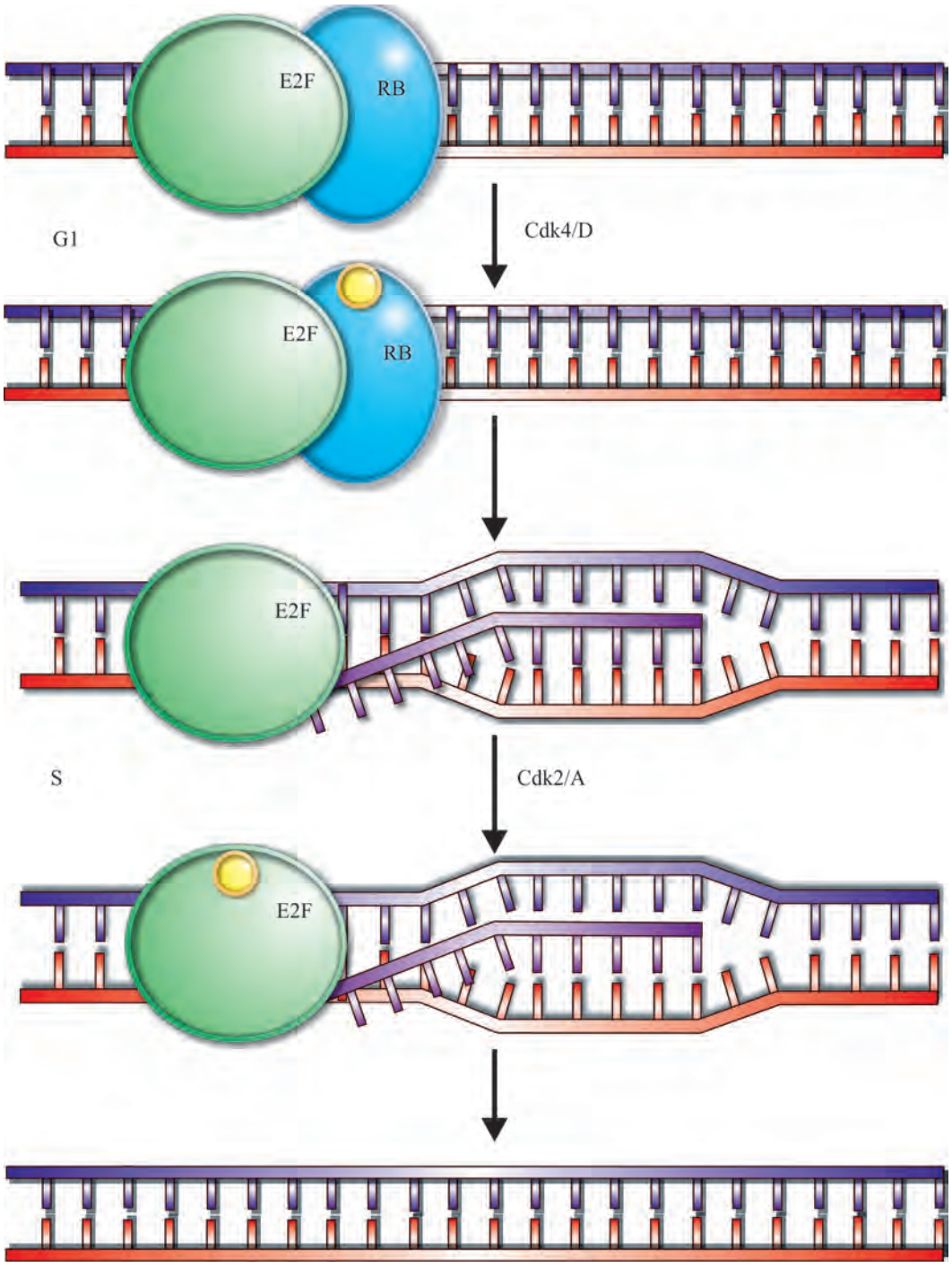


Fig. 25.13. Control de las primeras etapas del ciclo celular. Los genes cuyos productos intervienen en la replicación del ADN se encuentran silenciados por la proteína Rb. Durante la fase G1 el complejo Cdk4/ciclina D fosforila a Rb que se separa de E2F y permite la transcripción. Durante la fase S el complejo Cdk2/ciclina A fosforila a E2F y se interrumpe la transcripción.

Los puntos de control fundamentales se encuentran en las transiciones G_1/S y G_2/M, así como dentro de la fase S.

Las evidencias bioquímicas disponibles indican que las mismas proteínas, implicadas en la regulación de la progresión ordenada de la célula a lo largo del ciclo, también forman parte de las repuestas en los puntos de control.

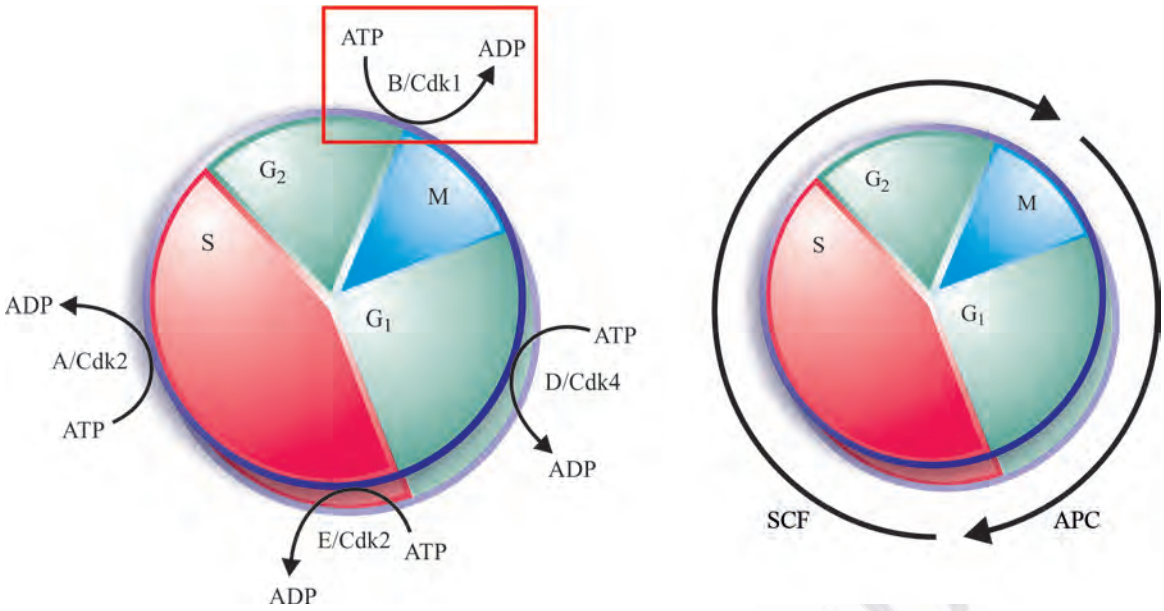


Fig. 25.14. Sistemas que controlan la progresión del ciclo celular. A la izquierda, la participación del sistema de las ciclinas y las Cdk. A la derecha, la participación de los complejos APC y SCF que poseen actividad de ubiquitina ligasa (E3). Cada una de las fases del ciclo progresa, debido a la existencia de un complejo específico ciclina/Cdk que se mantiene activo solamente durante el intervalo necesario, pues las ciclinas se destruyen rápidamente por la vía ubiquitina proteasoma.

Los puntos de control, como cualquier otro mecanismo de transducción de señales, tienen conceptualmente tres componentes fundamentales: los sensores, los transductores de la señal y los efectores. También se ha identificado un cuarto grupo de proteínas, denominadas mediadores.

Los sensores son aquellas proteínas que reconocen el daño al ADN y dan inicio a los eventos siguientes. En los seres humanos las proteínas que actúan como sensores son la ATM y la ATR. También se han identificado otras proteínas que son similares a las que intervienen en la replicación del ADN.

Los mediadores son proteínas que se asocian simultáneamente con los sensores y los transductores en algunas fases del ciclo celular y contribuyen a hacer la señal más específica; no son componentes obligados del sistema. En los seres humanos se han identificado tres proteínas mediadoras: la proteína de unión a p53 (53BP1), la proteína de unión a la topoisomerasa (TopBP1) y la proteína MDC1 (del inglés *mediator of DNA damage checkpoint* 1). Estas proteínas interactúan con sensores como ATM (del inglés, *ataxia telangiectasia mutated*), transductores como Chk1 (del inglés, *checkpoint kinase*) y reparadoras como BRCA1 (del inglés, *breast*, cáncer).

Los transductores transfieren información desde los sensores hacia los efectores. En los seres humanos los dos más importantes son la Chk1 y la Chk2; ambas son seril (treonil) proteína quinasas, con moderada especificidad de sustrato.

Los efectores son las proteínas que intervienen directamente en la detención del ciclo. En los seres humanos se trata de las ya mencionadas fosfoproteínas fosfatasas Cdc25A, Cdc25B y Cdc25D. Estas enzimas desfosforilan las Cdk en la treonina 14 y la tirosina 15, y con ello ganan su máxima actividad.

Como ejemplo del funcionamiento del mecanismo se estudiará lo que sucede en la transición G_1/S, cuando existe un daño al ADN. Si se detecta en el ADN una rotura de ambas hebras, provocada por radiaciones ionizantes o por agentes radiomiméticos, se activa ATM, que fosforila varias proteínas, entre ellas p53 y Chk2. Estas fosforilaciones provocan la activación de dos vías de transducción de señales, una para iniciar la reparación y la otra para mantener la detención del ciclo en la frontera G_1/S.

La acción que inicia la detención del ciclo es la fosforilación de Chk1, que a su vez fosforila a Cdc25A. La Cdc25A fosforilada se une a la proteína 14-3-3 que reconoce el residuo de serina fosforilado y mantiene a la fosfatasa "secuestrada". De esta forma se produce una acumulación de la Cdk2 con T14 y Y15 fosforiladas, de manera que el complejo Cdk2/ciclina E es inactivo y, por tanto, no puede ocurrir la transición G_1/S. Por otra parte, la fosforilación de p53 la torna activa y esta proteína estimula la síntesis de inhibidores de las Cdk. Esta respuesta demora más en aparecer, pero también se mantiene un tiempo mayor que las fosforilaciones que pueden ser revertidas por fosfoproteínas fosfatasas. Por otra parte si los daños no pueden ser reparados, p53 es capaz de inducir un tipo de muerte celular programada, denominada apoptosis. Los demás puntos de control o las respuestas a otros tipos de daños funcionan de forma similar, incluso algunos de ellos emplean las mismas proteínas descritas en este ejemplo. Los mecanismos moleculares de la reparación del ADN serán estudiados en el capítulo 33.

La importancia médica de este proceso se deduce porque alteraciones en varias proteínas implicadas en estos mecanismos pueden implicar la aparición de enfermedades.

Así, las alteraciones en ATM causan una enfermedad conocida como ataxia telangiectásica; modificaciones de BRCA se relacionan con la aparición de cáncer de mama y de ovario, y las formas anormales de p53 dan origen a varios tipos de cáncer, como el de mama, los sarcomas, etcétera.

Aún falta mucho por descubrir acerca de las moléculas y los mecanismos implicados en el control del ciclo celular, pero cada día el conocimiento científico refleja, con mayor grado de aproximación, la realidad de este proceso. Su conocimiento cabal no es solo un problema interesante desde el punto de vista biológico, también es importante para la práctica médica cotidiana. Se ha demostrado que algunos de los componentes de este sistema se relacionan con la génesis del cáncer. Las investigaciones sobre los mecanismos moleculares del cáncer dieron el impulso necesario a la investigación en este campo; es necesario tener presente que mientras mayor y más profundo sea el conocimiento sobre la génesis de esta enfermedad, mayores serán las posibilidades de encontrar un tratamiento eficiente para combatirla.

Resumen

El elevado grado de organización que caracteriza a los seres vivos se mantiene gracias a la información molecular. Esta puede ser de tipo secuencial, adecuada para la conservación y trasmisión, o conformacional, apropiada para la expresión. El principio de transferencia de información establece que la información molecular fluye desde la secuencial hacia la conformacional.

El ciclo celular comprende todas las transformaciones que las células experimentan durante su vida. En él se distinguen cuatro etapas: la M o de división celular, la S o de síntesis del ADN y las etapas G_1 y G_2 que separan las dos etapas anteriores. Los componentes principales macromoleculares de las células se sintetizan bien de forma discreta, como el ADN y las histonas, o bien de forma continua, como los ARNs, las proteínas y los lípidos componentes de las membranas. Para el estudio de estos aspectos se utilizan las técnicas de cultivos de células de crecimiento sincrónico y de captación de precursores radiactivos, entre otras.

Los mecanismos moleculares de progresión del ciclo celular no están totalmente conocidos. Se sabe que existen factores reguladores positivos y negativos y un grupo de familias proteínicas, implicados en el proceso. Dos sistemas multiproteínicos controlan la progresión del ciclo: el sistema de las ciclinas y las Cdk mediante la fosforilación de proteínas que modifican la actividad de las mismas, en etapas específicas del ciclo, y

el sistema ubiquitina proteasoma que cataliza la degradación selectiva y específica de proteínas, una vez que estas han cumplido su función en cada etapa del ciclo. La integridad de la molécula de ADN es la señal reguladora principal de la progresión del ciclo celular. El conocimiento del ciclo celular tiene importancia en la práctica médica por su vinculación con la génesis del cáncer.

Ejercicios

1. ¿Qué relación existe entre la desaparición del nucléolo durante la profase y los datos conocidos sobre las características de la síntesis de ARN durante el ciclo celular?
2. ¿Por qué la síntesis de proteínas disminuye considerablemente durante la mitosis?
3. Se dice que la existencia de las cromátidas es la expresión citogenética de la duplicación del ADN ¿Por qué?
4. ¿Cuál es la influencia de las ciclinas sobre la actividad enzimática de las Cdk?
5. ¿Por qué se afirma que el sistema ubiquitina proteasoma es el más eficiente en la regulación del ciclo celular?
6. Existen sustancias inhibidoras del proteasoma. ¿Cree usted que esas sustancias serían de gran utilidad en el estudio del ciclo celular, como sucede con inhibidores de otros procesos?
7. Un cultivo de células no sincronizado se expone a ^{14}C-inositol durante un breve periodo; luego se lavan las células para eliminar el exceso y se someten a un proceso de autorradiografía; al revelar la placa, se observa que todas las células incorporaron el ^{14}C-inositol con igual intensidad. ¿Cuáles serían las conclusiones del experimento? ¿Cuál de los componentes celulares se estaba estudiando?
8. Si el experimento de la pregunta anterior se hubiera realizado con células de crecimiento sincronizado, ¿sería igual la interpretación de los resultados?
9. Algunos autores sugieren que cuando se trata de células eucariontes, sería más correcto decir la duplicación de la cromatina que la duplicación del ADN. ¿En qué se fundamenta esta afirmación?
10. ¿Qué importancia concede usted al hecho de que las roturas del ADN sean una señal importante para detener el ciclo celular?
11. ¿Qué ocurre cuando grandes daños al ADN no pueden ser reparados de inmediato?

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Capítulo
26

Replicación del ADN

Una de las características más sobresalientes de los seres vivos es la reproducción, proceso mediante el cual se originan otros seres vivos esencialmente idénticos a sus progenitores. En los organismos monocelulares la reproducción se realiza directamente por medio de la división celular; en los pluricelulares el proceso es más complejo, pues depende de la existencia de células especializadas y de un sistema de órganos reproductivos. El hecho de que un organismo pertenezca a una especie u otra está determinado por el ADN contenido en sus células, por tanto, el fundamento molecular de la reproducción consiste en el proceso de replicación del ADN, de manera que los hijos posean la misma información genética que los padres.

La replicación del ADN es el proceso mediante el cual los organismos vivos duplican la información genética. Para ello, a partir de una molécula de ADN los seres vivos generan dos moléculas que son iguales entre sí y asimismo iguales a la que le dio origen. El mecanismo químico que sirve de base a este proceso es la polimerización de desoxinucleótidos, en un orden que está determinado por la molécula original. Se trata de una tarea colosal, si se tiene en cuenta que el ADN de una célula humana contiene aproximadamente siete mil millones de pares de bases en el ADN que forma parte de sus cromosomas.

La replicación del ADN es uno de los mecanismos moleculares más complejos de la naturaleza viva, pues no solo se trata de la síntesis de moléculas gigantes, sino que el proceso debe transcurrir con un alto grado de fidelidad, de manera que las moléculas nuevas sean idénticas a aquella que les dio origen. Varios son los mecanismos implicados en lograrlo.

Por otra parte, la replicación del ADN debe ocurrir solamente una vez durante la vida de la célula, pues de lo contrario se producirían fenómenos que pondrían en riesgo la supervivencia celular. De esto se infiere la existencia de mecanismos reguladores que aseguren que el proceso tenga lugar una y solo una vez durante el ciclo de vida celular.

Por todo lo anterior, no es de extrañar la participación en el proceso de un número considerable de proteínas, muchas veces en forma de complejos multimoleculares.

En este capítulo se hará una descripción lo más pormenorizada posible de los mecanismos moleculares de la replicación, teniendo en cuenta, además, que existen aspectos que no están totalmente aclarados.

Antecedentes

El comienzo del estudio experimental de la replicación del ADN se puede ubicar en 1953, cuando, después de publicar su célebre trabajo sobre el modelo molecular del ADN, James D. Watson y Francis H. Crick plantearon una hipótesis para el proceso de la replicación, al suponer que durante el proceso se producía la separación de las dos hebras y cada una de ellas servía como molde para la síntesis de la hebra complementaria, al aplicar el principio del apareamiento obligado de las bases nitrogenadas. Esta hipótesis brindaba dos posibilidades fundamentales: la conservativa, en la cual una vez sintetizadas las nuevas cadenas, estas se separaban del molde, se apareaban entre sí y daban lugar a una nueva molécula de doble banda, y la semiconservativa, en la que las nuevas moléculas estarían formadas por una cadena del molde y otra recién sintetizada.

En 1957, Mathew S. Meselson y Franklin W. Stahl diseñaron un elegante experimento para dilucidar cuál de las modalidades era la que realmente ocurría en la naturaleza. Ellos utilizaron cultivos de *Escherichia coli*, de los cuales extraían el ADN y lo centrifugaban en un gradiente de densidad de CsCl, y observaron que dicho ADN se concentraba en una estrecha banda en el tubo de la centrífuga, donde la densidad de la muestra coincidía con la del medio de centrifugación; cultivaron entonces las bacterias en un medio cuya única fuente de nitrógeno era NH_4Cl, marcado con ^{15}N; este último no es radiactivo, pero sí más pesado que el isótopo habitual ^{14}N.

Al extraer el ADN y centrifugarlo, se obtenía igualmente una banda, pero localizada más hacia el fondo del tubo. Si las células se hacían crecer en un medio ligero (con ^{14}N) durante un tiempo prolongado, se transferían con posterioridad a un medio pesado (con ^{15}N) y se dejaban el tiempo necesario para que ocurriera un solo ciclo replicativo; se extraía el ADN, se centrifugaba y se obtenía de nuevo una sola banda, pero su localización era intermedia entre las dos anteriores. Estos resultados se interpretan de la forma siguiente: si la replicación fuera conservativa al pasar al medio pesado, se encontrarían dos tipos de moléculas: las ligeras que sirvieron de molde y las pesadas, recién formadas. Al aparecer una sola banda, se comprueba que solo existe una especie molecular y, como su posición en el tubo de la centrífuga es intermedia entre la pesada y la ligera, se concluye que está formada por una cadena pesada y otra ligera, o sea, la replicación es semiconservativa (Fig. 26.1).

Los intentos por llevar a cabo la replicación *in vitro* comenzaron a tener sus primeros éxitos cuando, en 1955, Arthur Kornberg descubrió una enzima capaz de formar polidesoxinucleótidos, a la que denominó ADN polimerasa (hoy ADN polimerasa I o pol I). Luego de múltiples esfuerzos infructuosos por utilizar sistemas de células animales, se decidió utilizar extractos libres de células de *E. coli* y, como ADN a replicar, el del virus φX174; para ello se siguió el procedimiento siguiente: el ADN molde se obtuvo del φX174 y se marcó con tritio, el isótopo radiactivo del hidrógeno; el tritio serviría después, continuamente, como señal para identificar el molde. Se añadieron al molde junto con dATP, dTTP, dCTP y dGTP, la ADN-polimerasa, la ADN-ligasa (descubierta por aquel entonces) y la NAD+. Uno de los dNTP estaba marcado con fósforo radiactivo que serviría para identificar el material sintético, al igual que el tritio para el molde.

La interacción entre los reactivos tuvo lugar hasta que el número de unidades nucleotídicas polimerizadas fue exactamente igual al número de nucleótidos del molde, lo cual podía determinarse mas facil, comparando la radiactividad del tritio en el molde con la del fósforo en el material sintético. Varios medios físicos, incluidos el microscopio electrónico, demostraron que la replicación había ocurrido de forma completa. Por esos trabajos, Kornberg recibió el Premio Nobel de Química en 1959.

La década de los años 60 fue pródiga en descubrimientos y purificaciones de enzimas. En 1967, en los laboratorios de Gellert, Lehman, Richardson y Hurwitz, se descubrieron

la ADN ligasas. En 1968, Reiji Okasaki descubrió que durante la replicación se forman transitoriamente fragmentos de ADN que después se incorporan a moléculas mayores. Esto evidenció que el ADN se forma de manera discontinua. Hoy, esos fragmentos se denominan "fragmentos de Okasaki", en honor a su descubridor. De nuevo, Kornberg dio un paso trascendental, cuando en 1969 sintetizó *in vitro* un ADN viral que resultó ser infectivo cuando se añadió a cultivos de *E. coli*, con lo cual se demostraba que el ADN sintetizado era igual al ADN natural del virus en estructura y función.

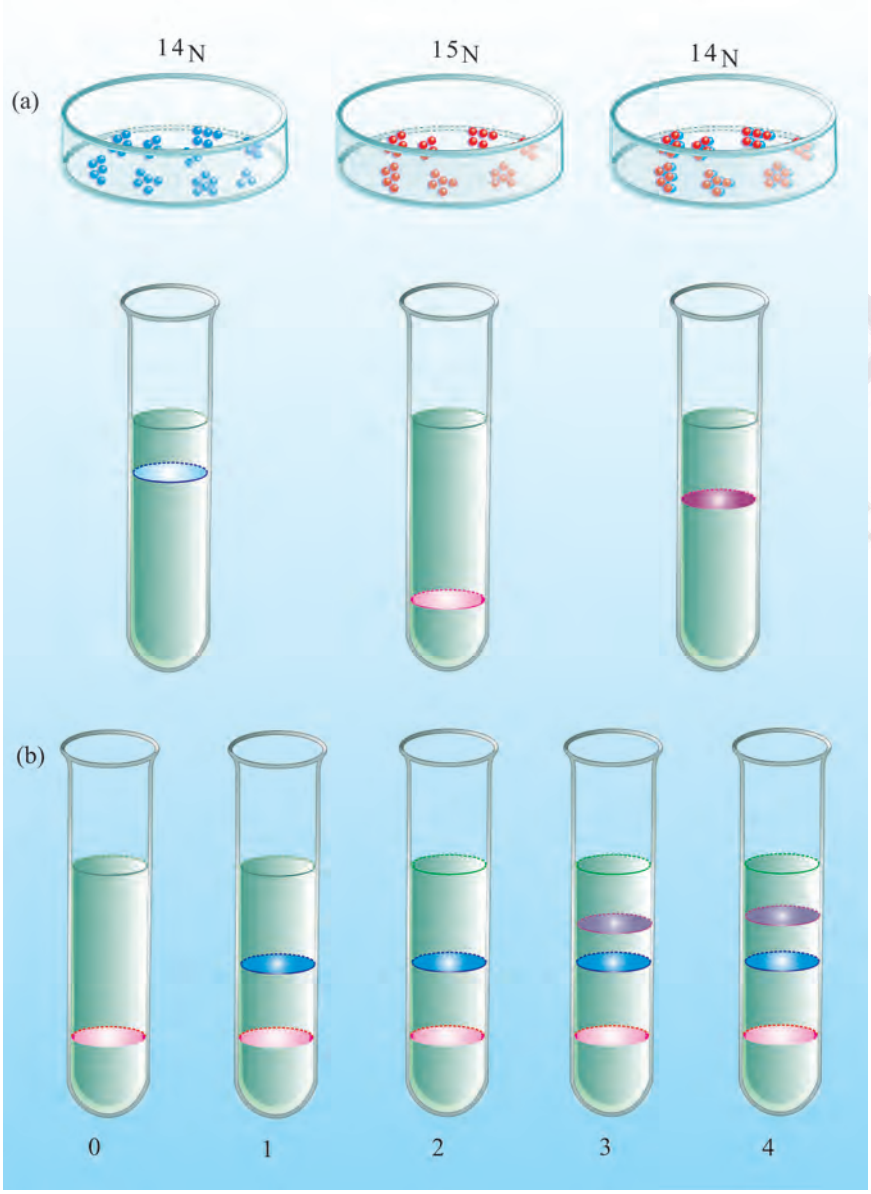


Fig. 26.1. Experiencia de Messelson y Stalh. Esta experiencia demostró que al menos en la *E. coli* la replicación tenía un carácter semiconservativo. (a) Se muestra cómo las bacterias al crecer en un medio con ^{14}N –su ADN– al ser centrifugado en gradiente de CsCl, se agrupa en una fina banda donde su densidad se corresponde con la del medio de centrifugación. Si crecen en ^{15}N forman también una banda, pero desplazada hacia el fondo del tubo, pues su densidad es mayor. Si se les hace crecer primero en ^{15}N y se pasan al medio con ^{14}N, solo se mantienen en ese medio el tiempo necesario para un ciclo replicativo, aparece una sola banda cuya densidad es intermedia entre las dos anteriores, lo cual significa que todas las moléculas tienen la misma densidad y esto solo es posible si cada una de ellas contiene una banda con ^{14}N y otra con ^{15}N, que la replicación es semiconservativa y (b) se observa que el ADN de bacterias que crecieron en ^{15}N y después fueron transferidas a un medio con nitrógeno ligero, forma una sola banda, pero que al dejarlas crecer después en un medio con nitrógeno ligero en cada ciclo replicativo, la banda que representa al ADN híbrido se hace cada vez más tenue, en tanto la del ADN con nitrógeno ligero se hace cada vez más intensa.

Años después se descubrieron nuevos participantes moleculares del proceso, hasta que a principio de los 80 se llegó a tener una visión más o menos aceptable del proceso en procariontes. Estos conocimientos permitieron ir identificando los participantes y los mecanismos implicados en la replicación del ADN en eucariontes hasta la actualidad, cuando la visión que existe acerca del problema es bastante completa en cuanto a sus aspectos generales y mecanismos particulares, aun cuando persisten lagunas sobre tópicos específicos.

A continuación se presenta una descripción del proceso de la replicación: primero, una breve visión en procariontes, y luego, algo más detallado en eucariontes superiores, sobre todo en los seres humanos, con énfasis en los mecanismos moleculares del proceso y su significación para las células y el organismo.

Aspectos generales

Aun cuando existen variaciones en los mecanismos moleculares empleados por las diferentes especies, en todas ellas se observan algunas regularidades que serán expuestas a continuación.

Toda la información genética contenida en el ADN reside en su secuencia de bases, por tanto, la función primordial de cualquier modo de replicación es duplicar la secuencia de bases de la molécula progenitora. La especificidad de los apareamientos de bases –adenina con timina y citosina con guanina– provee el mecanismo básico empleado por todos los sistemas replicativos.

Otro aspecto común es que los nucleótidos son añadidos uno a uno al extremo 3'-OH de una cadena en crecimiento por enzimas denominadas ADN-polimerasas. La secuencia de bases de cada una de las cadenas del ADN es copiada en forma complementaria, así, cuando en la hebra molde aparece una base, en la hebra nueva se coloca la complementaria.

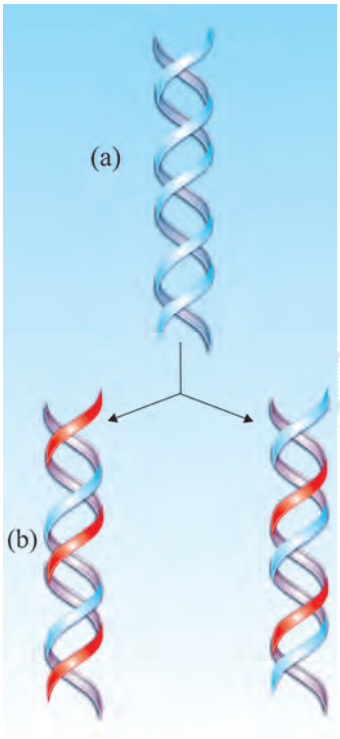


Fig. 26.2. Carácter semiconservativo. El modelo general de la replicación, de acuerdo con la experiencia de Messelson y Stahl, consiste en que una molécula duplohelicoidal de ADN (a) se separa en sus dos cadenas y cada una de estas sirve de molde para la síntesis de la cadena complementaria. Cada molécula nueva (b) está formada por una banda parental (en azul) y una neoformada (en rojo). Luego, todas estas son iguales entre sí.

En los ADN de doble hebra el proceso de replicación se produce cuando se copian ambas cadenas de manera simultánea, por lo que las moléculas formadas contendrán una banda que proviene del ADN que sirve de molde o patrón, y una de nueva formación, es decir, el proceso es semiconservativo. Como la molécula de ADN que se está copiando, está formada por dos bandas complementarias y cada una de ellas sirve de molde para la síntesis de una cadena nueva, resultará que gracias a este mecanismo las moléculas nuevas no solo serán iguales al molde en su secuencia de bases, sino que serán iguales entre sí (Fig. 26.2).

La reacción básica de la polimerización consiste en la adición de un desoxinucleósido monofosfatado, procedente de un desoxinucleótido trifosfatado, al extremo 3'-OH de un polidesoxinucleótido, con la liberación de pirofosfato, la cual conduce a la formación del enlace fosfodiéster; esto quiere decir que la cadena se va formando del extremo 5'-P al 3'-OH, luego el crecimiento de la cadena es unidireccional.

Esta reacción es muy reversible, pero el acoplamiento a la hidrólisis del pirofosfato favorece el crecimiento de la cadena, esto es, la reacción global de polimerización es irreversible (Fig. 26.3).

En el proceso de síntesis, la hebra nueva se forma en dirección 5'→3', pero toma como molde la hebra orientada 3'→5', lo que significa que el proceso presenta también un carácter antiparalelo; esto hace que la doble hebra que se va formando, tenga ya una estructura en doble hélice, como las moléculas originales, lo cual le confiere una elevada estabilidad (Fig. 26.4).

En resumen, la replicación se produce por complementariedad de bases, añadidas una a una en forma unidireccional y antiparalela, tiene carácter semiconservativo y está acoplada a la hidrólisis del pirofosfato.

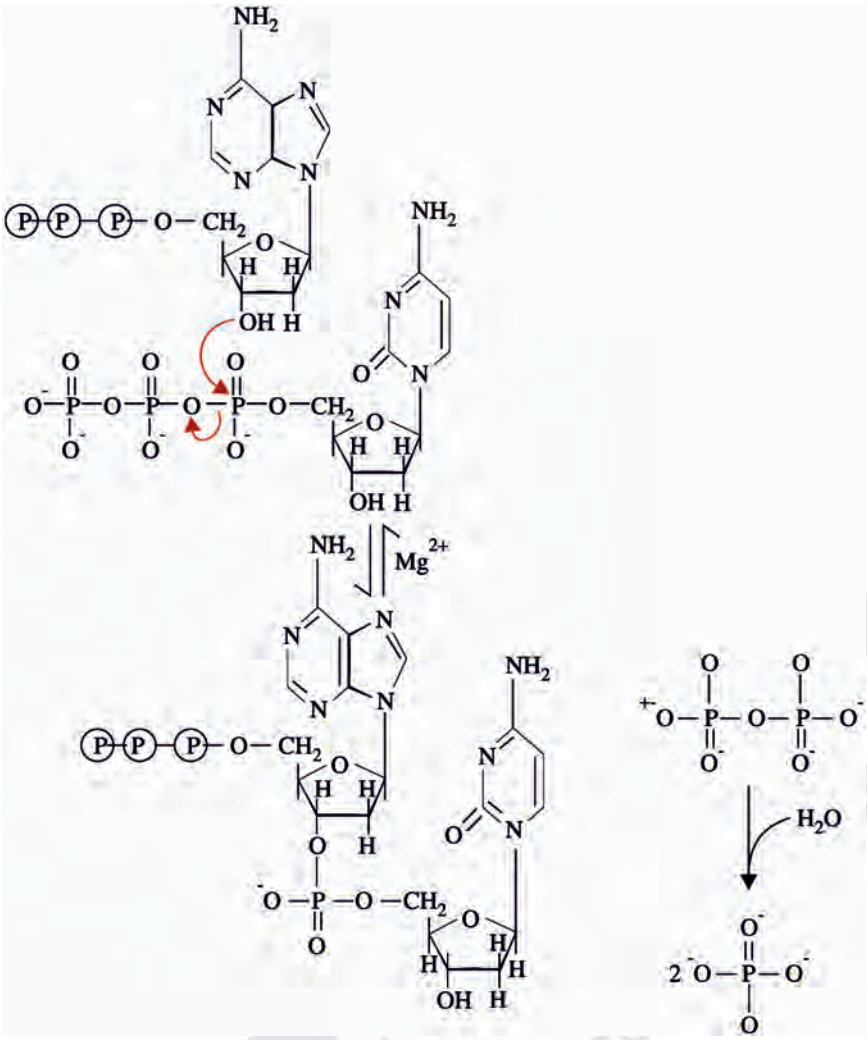


Fig. 26.3. Reacción de polimerización. Todas las ADN polimerasas catalizan la misma reacción. Tomando como sustratos nucleósidos trifosfatados (NTP), los unen mediante la formación de un enlace fosfodiéster. En la figura el fosfato más interno del dCTP se une al 3-OH del dATP con liberación de P-P, cuya hidrólisis impulsa la reacción hacia la derecha. El ion Mg^{2+} es imprescindible.

Requerimientos de la replicación

Para que la replicación tenga lugar, es necesario un número considerable de moléculas, en especial de macromoléculas. Entre estas se encuentran los cuatro tipos de nucleósidos trifosfatados y los cuatro desoxinucleósidos trifosfatados, así como iones divalentes, especialmente el Mg^{2+} que siempre acompaña a los nucleótidos en sus reacciones. El total de proteínas que participa en la replicación es desconocido, pero se sabe que constituye un número considerable.

En primer lugar se encuentran las enzimas, de las cuales existen cinco tipos principales: las polimerasas, las helicasas, las topoisomerasas, las ligasas y las nucleasas.

Las ADN polimerasas catalizan la unión de un nucleósido trifosfatado al 3´-OH de otro nucleótido que forme parte de una cadena polinucleotídica. Esto significa que ninguna de ellas es capaz de iniciar la polimerización, por lo cual se requiere de una molécula que aporte el 3´-OH, por lo general es un ARN, que por ello recibe el nombre de ARN iniciador. La adición de los desoxinucleótidos se hace de forma reiterativa, de manera que la hebra crece de uno en uno. En la replicación del ADN intervienen cuatro polimerasas (abreviadamente pol): pol-α/iniciadora, que además posee actividad de ARN polimerasa, pol-ε, pol-δ y pol-γ. Las tres primeras replican el ADN nuclear y la última, el mitocondrial.

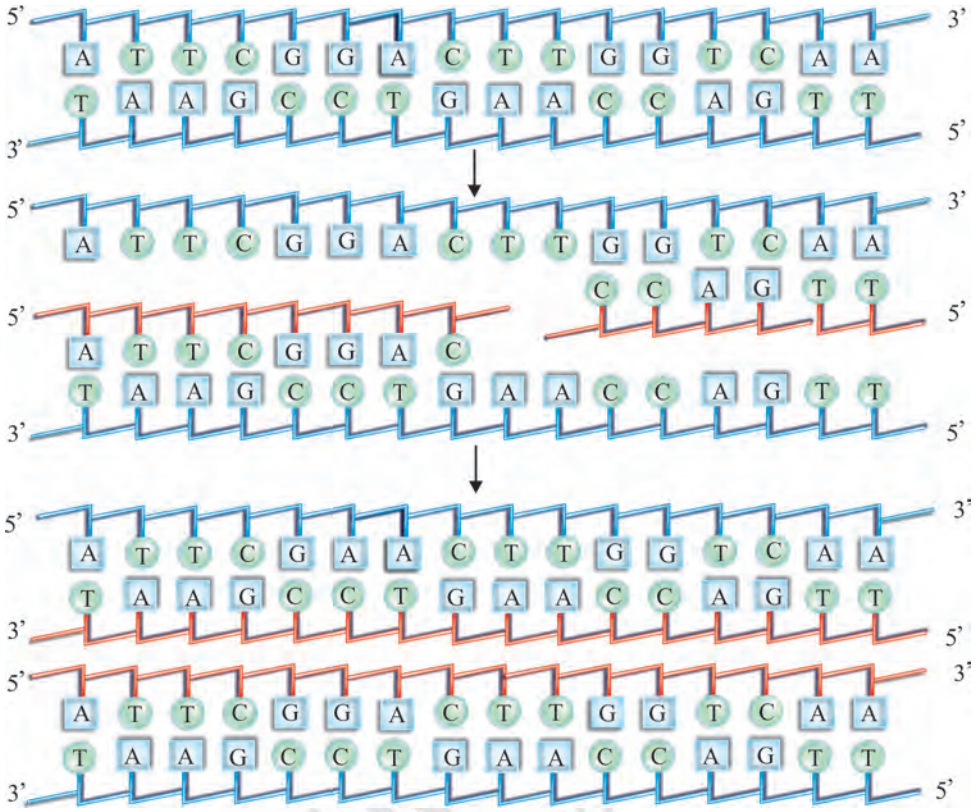


Fig. 26.4. Carácter antiparalelo. Las dos hebras del ADN sirven de molde para la formación de su cadena complementaria, pero en sentido contrario. En ambos casos la hebra que sirve de molde tiene dirección 3' → 5', en tanto, la neoformada crece en sentido 5' → 3'. En esto consiste el carácter antiparalelo de la replicación.

Las helicasas son enzimas que desenrollan la doble hélice del ADN y producen zonas monocatenarias, para lo cual necesitan estar acopladas a la hidrólisis del ATP. Existen helicasas formadas por una sola unidad y otras por seis subunidades. En la replicación interviene la helicasa Mcm2-7 que es de tipo hexamérico.

Las topoisomerasas interconvierten los topoisómeros del ADN. Por lo general estas enzimas introducen superenrollamientos negativos en el ADN, haciendo un corte en el mismo y haciendo pasar una o las dos hebras por la hendidura creada. Se clasifican en tipo I o tipo II, según produzcan el corte de una o las dos hebras del ADN, respectivamente. Ambos tipos se requieren en la replicación.

Por último, las ligasas unen dos fragmentos de una hebra de ADN que se encuentren contiguos, es decir, entre dos nucleótidos sucesivos, siempre que estos fragmentos estén formando parte de una molécula de ADN de doble hebra.

También se requiere de proteínas que no presentan actividad enzimática, entre ellas las que marcan sitios en el ADN, las que reclutan otras proteínas, las que incrementan la actividad o la procesividad de algunas enzimas, etc. Un tipo especial es el de las proteínas de unión al ADN de hebra simple. Durante la replicación las dos hebras del ADN se separan y, de no existir algún obstáculo, se volverían a unir. La proteína replicativa A se une al ADN de una hebra e impide su reasociación, lo que permite que las otras proteínas tengan acceso a las bases nitrogenadas.

Etapas de la replicación

Tradicionalmente, el estudio de la replicación se ha dividido en cinco grandes etapas: preiniciación, iniciación, elongación, terminación y posterminación.

El conocimiento acerca de lo que ocurre en cada etapa no es uniforme, ya que la complejidad de cada una es diferente. Esta división se debe fundamentalmente a

los procedimientos empleados para el estudio del proceso. Los métodos más utilizados han sido la introducción de inhibidores y el uso de mutantes que carecen de algunas de las proteínas implicadas en el proceso. Combinando hábilmente estos dos elementos, el proceso se detiene de manera selectiva y se analiza la composición del complejo replicativo hasta ese momento. De esta forma se puede establecer el orden en que intervienen cada uno de los participantes en el proceso y después inferir cómo se desarrolla el proceso en su totalidad. Es bueno señalar que estas etapas solo tienen un valor experimental y didáctico, pues en la realidad el proceso ocurre de manera continua, sin que existan pausas entre una etapa y otra. La preiniciación consiste en el ensamblaje del sistema replicativo; la iniciación, en la colocación adecuada de los primeros precursores; la elongación, en el crecimiento de la cadena y la terminación, en el fin del proceso. La posterminación se refiere a modificaciones que experimenta la molécula recién formada, hasta ser totalmente funcional. En algunos casos estas modificaciones ocurren de manera simultánea con la elongación.

Estas mismas etapas, aunque con contenidos diferentes, serán consideradas en los demás procesos –transcripción y traducción–, relacionados con los mecanismos de transferencia de la información genética, y se resaltará la similitud formal que existe entre ellos.

Replicación en procariontes

Como sucede casi siempre en la ciencia, los estudios experimentales sobre la replicación comenzaron por los organismos más sencillos y, a partir de estos, se establecieron no solo los modelos teóricos, sino también los procedimientos experimentales para los estudios en organismos más complejos.

Este estudio comenzó por los organismos procariontes. Para ello, primero se estudiaron los virus que infectan las bacterias, denominados bacteriófagos o simplemente fagos, que como utilizan una parte considerable del sistema replicativo del hospedero, se pueden considerar teniendo presente las diferencias de complejidad, como buena aproximación al estudio del proceso en las células bacterianas.

De todos los sistemas replicativos estudiados, el más conocido es el de la bacteria *E. coli*. Un procarionte con una molécula única de ADN circular de doble hebra, aproximadamente de 4×10^6 pb.

En la *E. coli* la replicación comienza siempre en un punto fijo del ADN, que se conoce como origen de la replicación (oriC) y termina en otro sitio específico, denominado TerC.

En primer lugar, es necesario obtener el topoisómero del ADN adecuado para el proceso, lo cual se logra por la acción de la topoisomerasa (Fig. 26.5).

La preiniciación consiste en la separación de las dos cadenas en el oriC, de manera que las proteínas replicativas puedan acceder a la secuencia de bases del ADN. El sitio de iniciación es marcado por un grupo de proteínas a las cuales se unen las helicasas que provocan el desenrollamiento del ADN, lo que da lugar a la formación de dos horquillas de replicación. Las hebras simples son cubiertas por las proteínas de unión al ADN de hebra simple, SSB. Esta etapa se resume en la figura 26.6.

Una ARN polimerasa sintetiza un polirribonucleótido que servirá como iniciador y con posterioridad será alargado por la ADN polimerasa III, una enzima formada por cerca de 20 subunidades que realiza la copia de las dos hebras simultáneamente. Una de las subunidades de la enzima tiene forma de anillo que se enrolla alrededor del ADN y permite a la enzima la polimerización de numerosos nucleótidos, sin abandonar el ADN. Esta parte del proceso se ilustra en la figura 26.7.

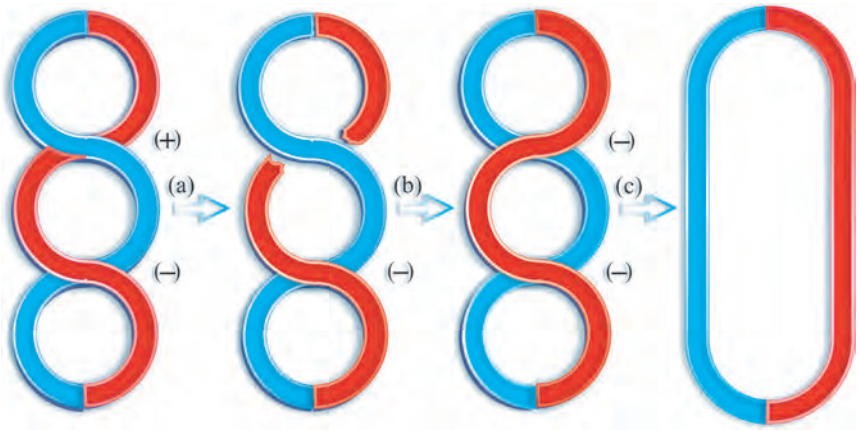


Fig. 26.5. Acción de la topoisomerasa II. El ADN circular de la *E. coli* existe superenrollado negativamente y es la topoisomerasa II la que se une al ADN y corta la molécula en sus dos bandas (a); luego cruza la banda intacta por la abertura y vuelve a sellar (b), haciendo cada vez el topoisómero más negativo, que es la forma que favorece la replicación. En la figura se representan las dos mitades de la molécula en distintos colores para diferenciar su recorrido.

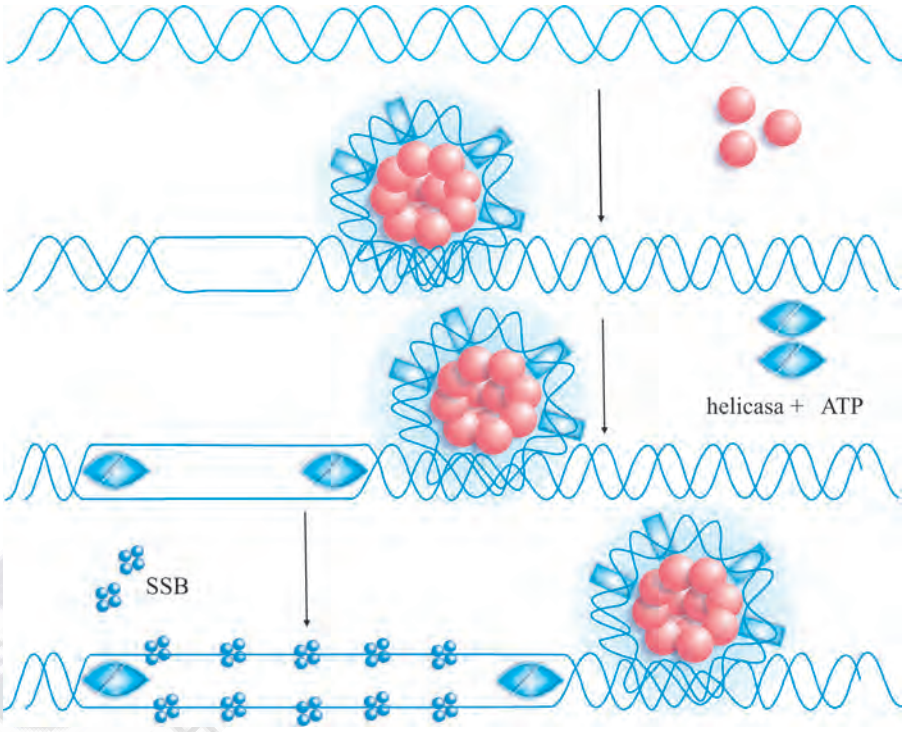


Fig. 26.6. Formación de la horquilla de replicación. Al sitio de origen se unen proteínas de reconocimiento que enrollan al ADN a su alrededor. Luego se unen las helicasas que provocan la apertura de la doble hélice. La unión de las SSB estabiliza las horquillas de replicación y da acceso a la secuencia de bases que serán el molde de las nuevas hebras.

Como las polimerasas sintetizan el ADN en forma unidireccional y cada horquilla contiene las dos hebras del ADN, una de las hebras se sintetiza de forma continua (hebra conductora, el movimiento de la polimerasa coincide con el de la horquilla), mientras que la otra lo hace por fragmentos (hebra conducida, el movimiento de la polimerasa es contrario al de la horquilla). Esos fragmentos deben ser procesados y unidos para dar la integridad a la molécula. El procesamiento de los fragmentos se muestra en la figura 26.8.

En la *E. coli* existen sitios específicos para la terminación, donde proteínas específicas detienen el movimiento de cada una de las horquillas. Más tarde, bases nitrogenadas que forman parte de secuencias específicas son metiladas, con lo cual termina el proceso de la replicación.

Replicación en eucariontes

La replicación en eucariontes es algo más compleja. Esta complejidad deriva de varios factores. El tamaño de las moléculas a replicar es mucho mayor que en procariontes. Téngase

en cuenta que el cromosoma humano más pequeño contiene una molécula de ADN de aproximadamente 46 millones de pares de bases, y el mayor, alrededor de 247 millones, es decir, de 30 a 90 veces el tamaño del ADN de *E. coli*. El proceso está confinado al pequeño espacio que representa el núcleo celular. El ADN está asociado con histonas y otras proteínas que forman la cromatina, cuya unidad estructural es el nucleosoma y estas estructuras dificultan el avance de la horquilla de replicación. Además, la cromatina no es homogénea, pues existen zonas más relajadas (eucromatina) y zonas más compactas (heterocromatina) donde el avance de la horquilla es más difícil aún. Por último, el ADN humano presenta zonas donde existen secuencias repetidas (microsatélites y minisatélites), como los centrómeros y los telómeros, que por alguna razón, aún desconocida, representan un obstáculo por el desenvolvimiento normal de las polimerasas. Por todo lo anterior no es de extrañar que el número de proteínas no enzimáticas que intervienen en el proceso sea algo mayor que las que lo hacen en *E. coli*.

Sin embargo, en esencia el contenido de cada fase es similar al de procariontes. Lo más distintivo es la preiniciación, en la cual se pueden distinguir dos momentos importantes, diferentes no solo por su contenido, sino por el momento del ciclo celular cuando se producen, estos son la formación del complejo prerreplicativo y la activación de este y su conversión en complejo de preiniciación. A continuación se desarrollará el proceso en todas sus etapas, vinculado con el ciclo celular.

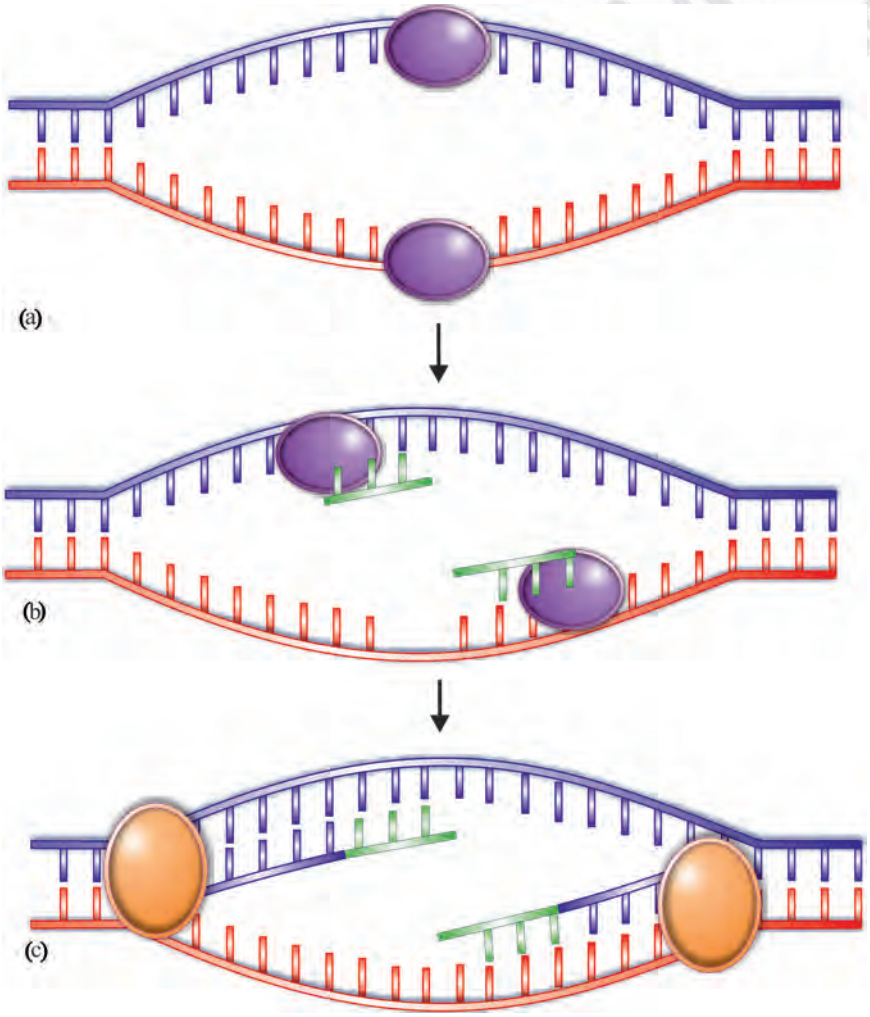


Fig. 26.7. Proceso de polimerización. A cada una de las hebras se une la ARN polimerasa (a), que sintetiza un pequeño fragmento de ARN (en verde) que servirá como iniciador (b). Al extremo del ARN iniciador se une la ADN polimerasa III que alarga cada una de las hebras (c). Obsérvese que en cada hebra el proceso transcurre en una sola dirección.

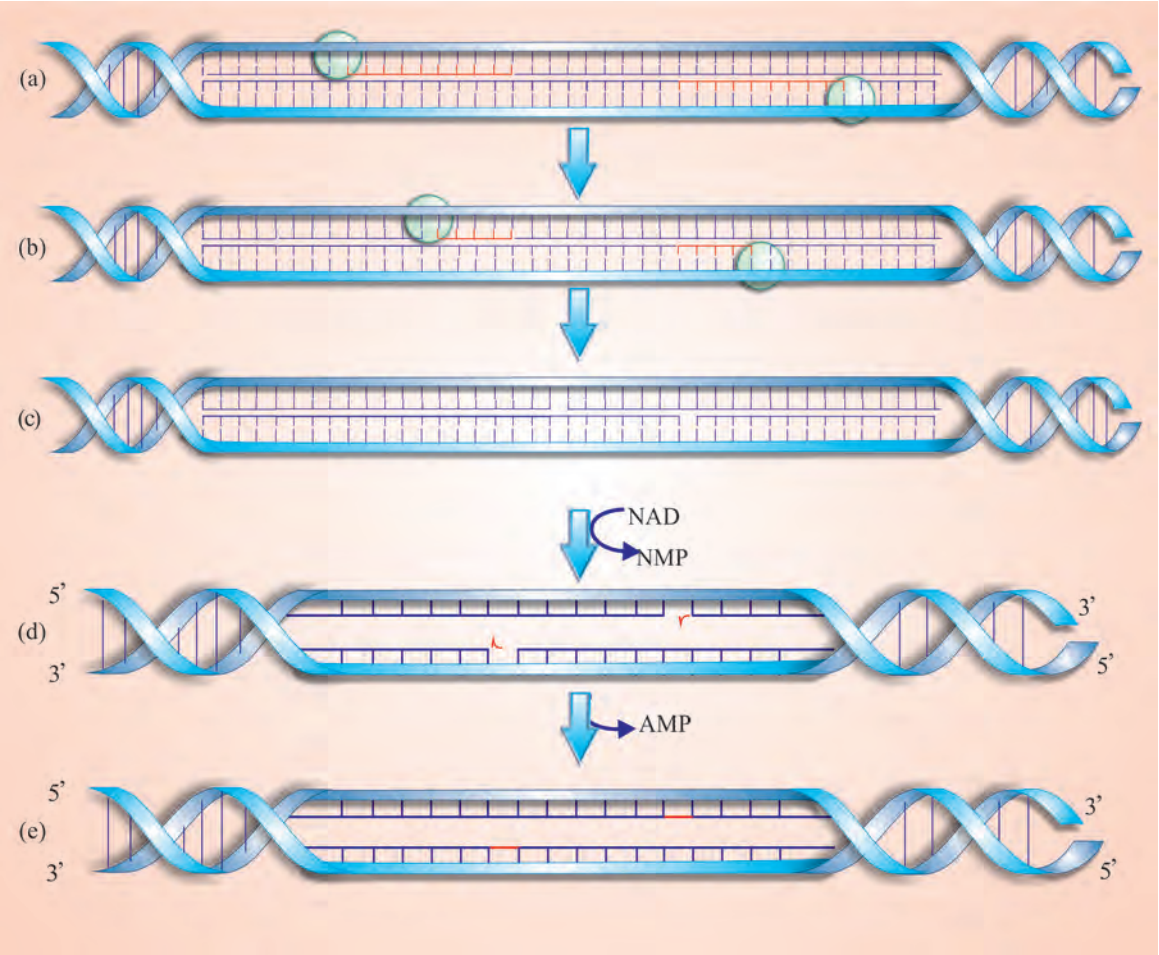


Fig. 26.8. Procesamiento de los fragmentos de Okasaki. (a) La ADN polimerasa I por su acción de exonucleasa va eliminando los ribonucleótidos que forman parte del ARN iniciador y a la vez va uniendo dNTP al extremo 3'-OH de la cadena formada por la ADN polimerasa III, de manera que no quedan espacios vacíos; (b) la acción de la polimerasa hace que la brecha entre los nucleótidos se vaya desplazando a lo largo de la cadena del ADN; (c) cuando todos los ribonucleótidos se han retirado, la enzima se separa del ADN; (d) utilizando como cofactor el NAD^+, la ADN ligasa de la *E. coli* une nucleótidos contiguos mediante la formación de un enlace fosfodiéster y (e) con lo cual los fragmentos formados en la banda conducida se unen unos con otros y se forma una banda continua.

Formación del complejo prerreplicativo

Durante la transición de la metafase a la anafase ocurre la activación del complejo promotor de la anafase APC (del inglés, *anaphase promoting complex*) que lleva a la destrucción proteolítica de las ciclinas A y B, así como a las quinasas mitóticas, lo que trae como consecuencia la disminución prácticamente a cero de la actividad de quinasas y el aumento relativo de la actividad de fosfoproteínas fosfatasas. Por otra parte, durante la telofase se produce la descondensación de los cromosomas y la formación de la cromatina, con lo cual los componentes iniciales del proceso de replicación ganan acceso al ADN.

El primer paso en la formación del complejo prerreplicativo es la identificación y la marca de los orígenes de la replicación. No se ha encontrado ninguna característica del ADN en la zona del origen en eucariontes superiores, salvo que contiene regiones ricas en pares AT. Esto se realiza cuando el complejo de reconocimiento del origen ORC (del inglés, *origin recognition complex*) se une al ADN en miles de sitios de los cromosomas,

de manera que en la transición M→G1 el ORC se ha unido al ADN en los sitios donde potencialmente puede dar inicio la replicación. El complejo ADN-ORC recluta la proteína Cdc6 que contribuye a estabilizar la unión del ORC al ADN.

Posiblemente en este momento se definan dos aspectos fundamentales de la replicación: primero, el punto de programación temporal que establece cuando durante la fase S cada uno de los orígenes será activado; y segundo, el punto de decisión de los orígenes, que establece cuáles de los orígenes potenciales, marcados por el ORC, serán activados en la fase S.

Mientras tanto el APC con su cofactor Cdh1 ha marcado con ubiquitina a la geminina que se mantenía unida a Cdt1 (también conocida como *factor de licencia*). Al ser destruida por proteólisis la geminina, la Cdt1 queda libre de su efecto inhibitorio y es reclutada hacia el complejo ADN-ORC-Cdc6.

Los pasos siguientes son el reclutamiento y el ensamblaje de la helicasa Mcm2-7 en el origen. Al menos dos hexámeros de Mcm2-7 se montan en el origen de replicación, en una disposición que se denomina "cabeza con cabeza". Esta disposición permitirá que durante la iniciación una helicasa se mueva en un sentido y la otra, en sentido contrario. De esta forma, a mediados de la fase G1 queda constituido el complejo prerreplicativo. La formación de este complejo es requisito indispensable para que pueda ocurrir la replicación, por eso se denomina factor de licencia, pero el hecho de que el ADN tenga licencia para replicarse, no quiere decir que lo haga. Otros factores son necesarios para que el proceso se produzca. Las etapas de formación del complejo prerreplicativo se muestran en la figura 26.9.

En el capítulo 25 se expresó que a mediados de G1 se induce la síntesis de la ciclina D y se incrementa la transcripción de los genes cuyos productos participan en la replicación del ADN. En la transición G1→S se forma el complejo Cdk2/E, que tiene como función la activación del complejo prerreplicativo, y es por eso que este complejo solo se puede formar durante los primeros momentos de la fase G1.

Activación del complejo prerreplicativo y su transición a complejo de preiniciación

En la transición de la fase G1 a la S se incrementa la síntesis de la ciclina E que se une a la Cdk2 y forma el complejo activo Cdk2/E. También se activa la quinasa Ddk, formada por la subunidad catalítica Cdc7, y la acompañante Dbf4 (del inglés, *dumbell forming activity*). El nombre Ddk se asignó por analogía con las Cdk y significa quinasa dependiente de Dbf4 (en inglés, *Dbf4-dependet kinase*). Solo se han podido identificar algunos de los sustratos específicos de esas quinasas.

Entre las proteínas fosforiladas por Ddk se encuentran algunas subunidades del ORC, la Cdc6, la Cdt1 y al menos la subunidad Mcm4 de la helicasa Mcm2-7. La fosforilación de Cdc6 y Cdt1 las separa del origen y son marcadas con ubiquitina y degradadas por el proteasoma. Este mecanismo garantiza que la replicación ocurra solo una vez durante el ciclo de vida de la célula. El destino de las subunidades que forman el ORC no está totalmente esclarecido.

Al mismo tiempo se ha formado un complejo integrado por la ADN polimerasa ε (pol-ε), la helicasa RecQL4 y el complejo GINS. El complejo GINS debe su nombre al hecho de que en levaduras está formado por las proteínas Sld5, Psf1, Psf2 y Psf3 y fue descubierto por un japonés que lo nombró go-ichi-na-san, que significa 5-1-2-3. Por otra parte se encuentra la proteína Cdc45, unida a la treslina.

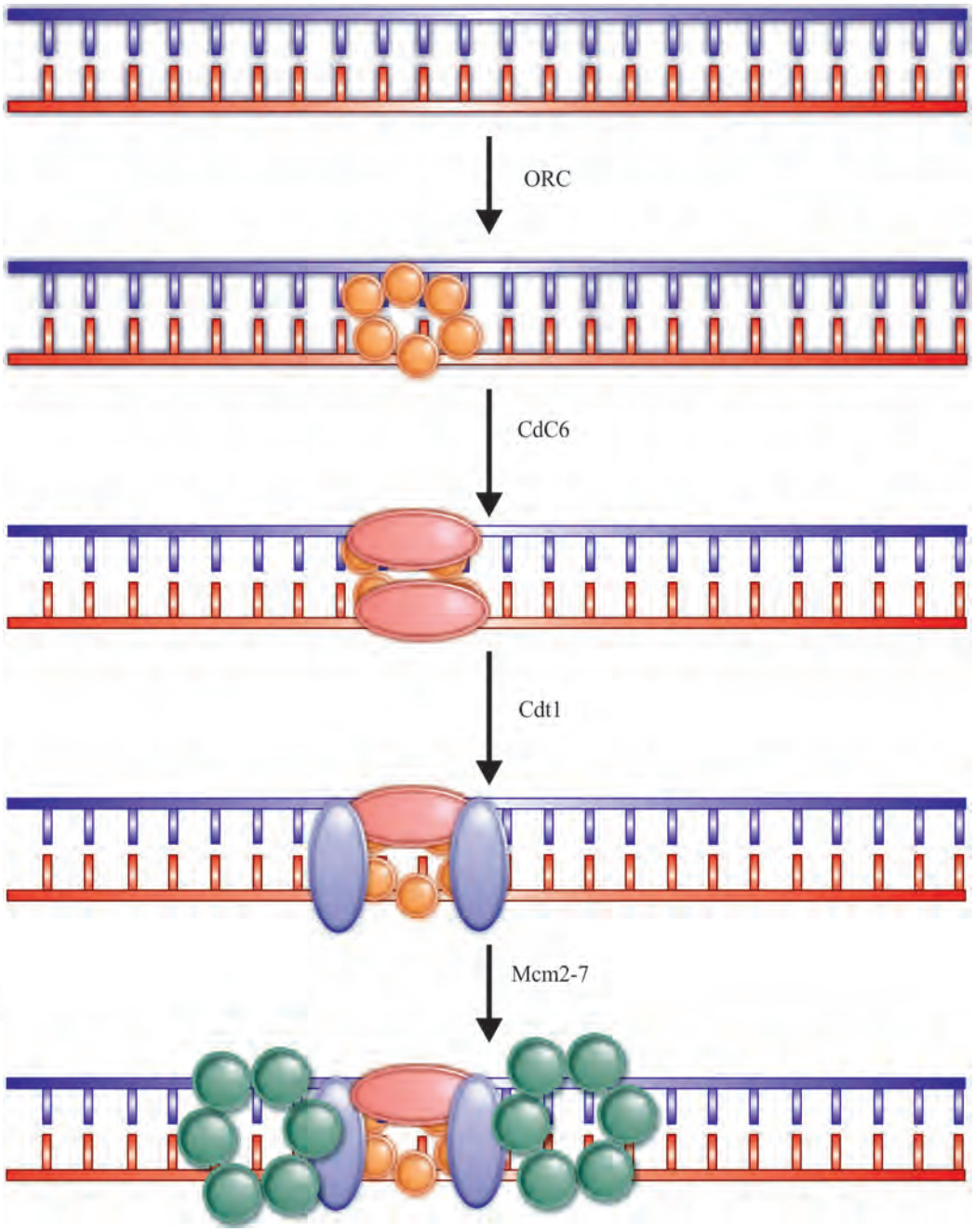


Fig. 26.9. Formación del complejo prerreplicativo. Desde la telofase de la mitosis hasta mediados de G1 se va formando el complejo prerreplicativo por la incorporación al origen de la replicación del complejo de reconocimiento del origen (ORC), la proteína del ciclo celular Cdc6, la Cdt1 y la helicasa Mcm2-7.

La Cdk2/E fosforila a la treslina y a la RecQL4, y crea, en cada una, un sitio para la proteína de unión a la topoisomerasa (TopBP) que une a los dos complejos y los lleva hacia el origen de la replicación. La interacción de Cdc45 con Mcm4 fosforilada provoca un reordenamiento del complejo que elimina a la treslina, la RecQL4 y la TopBP; quedan unidos Mcm2-7, Cdc45, GINS y pol-ε y forman el complejo CMG (Cdc45-GINS-Mcm2-7) con pol-ε que participará en la fase de elongación.

La asociación de estos complejos al origen crea tensiones estructurales que se alivian con la separación de las dos hebras del ADN, en un pequeño sector. La activación del complejo prerreplicativo se muestra en la figura 26.10.

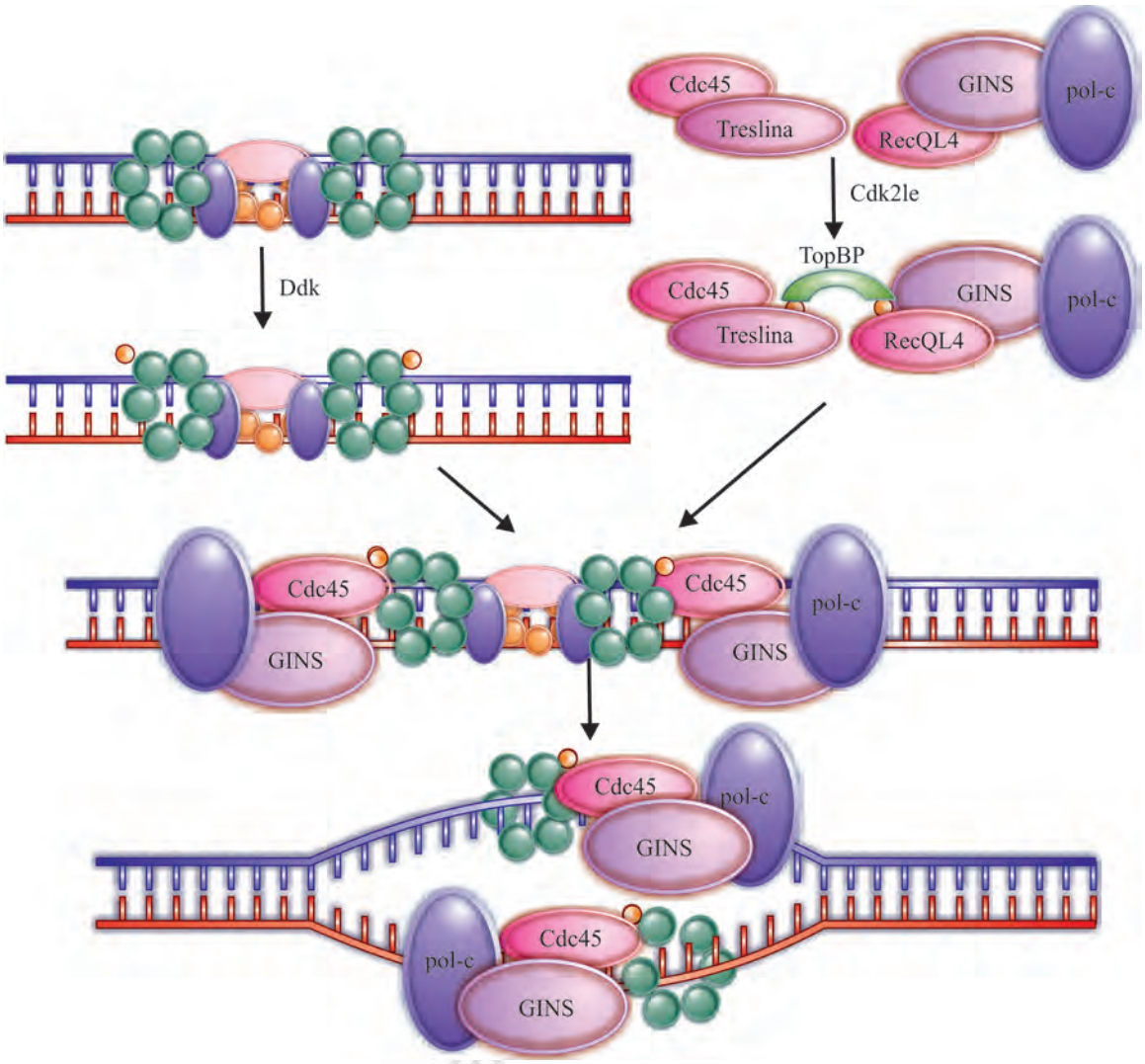


Fig. 26.10. Activación del complejo prereplicativo. A la izquierda, la Ddk fosforila algunos componentes del complejo prereplicativo, especialmente a la helicasa. A la derecha, la Cdk2/E fosforila a proteínas unidas a Cdc45 y al complejo GINS, que a su vez está unido a la polimerasa ε. La proteína de unión a la topoisomerasa, TopBP, une ambos complejos y de esta forma son reclutados hacia el origen. Las interacciones entre Cdc45 y Mcm2.7 reorganizan el complejo, liberan algunas proteínas y forman el complejo CMG, característico de la elongación.

Iniciación de la replicación

Una vez que se separan las hebras, uno de los hexámeros Mcm2-7 se enrolla alrededor de una de las hebras y el otro en la hebra complementaria, de acuerdo con su polaridad de traslación, esto es 3´→5´, y comienzan a extender el segmento de hebra simple en los dos sentidos, a partir del origen. Las hebras simples se van cubriendo por la proteína replicativa A (RPA) que impide que las hebras se vuelvan a unir. Esta etapa se muestra en la figura 26.11.

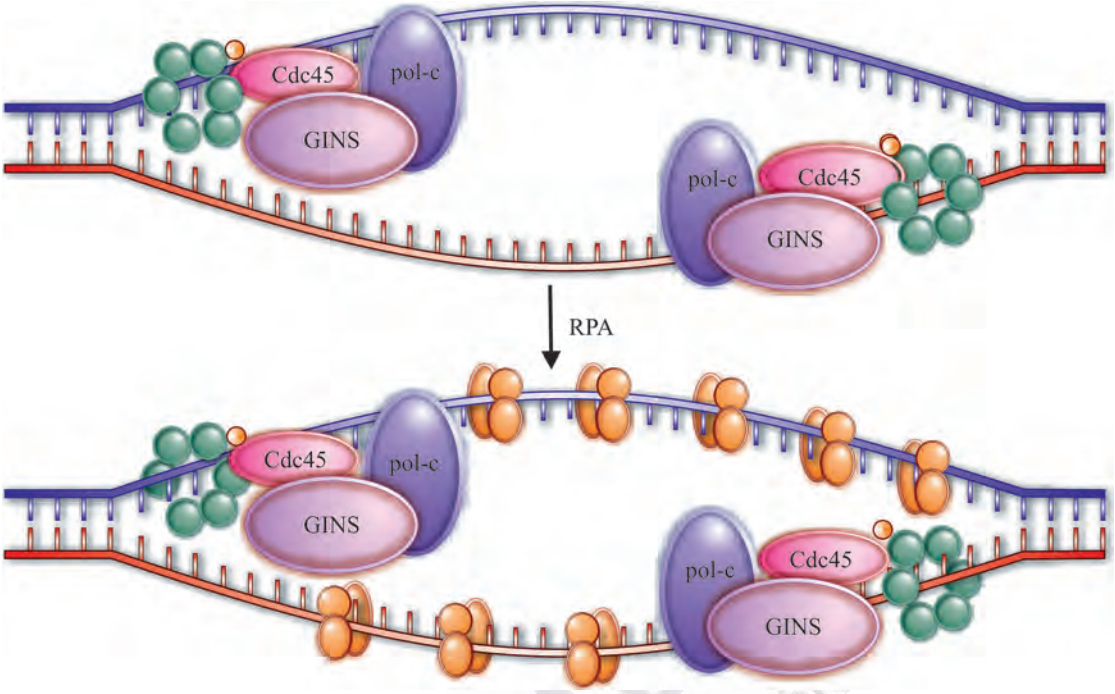


Fig. 26.11. Estabilización de la horquilla. Una vez que las helicasas incrementan las dimensiones de la horquilla, la proteína RPA se une a las hebras simples y estabiliza e impide su reasociación.

Es bueno recordar que las ADN polimerasas sintetizan el ADN en la dirección 5′→3′ y para ello utilizan como molde la cadena que tiene sentido 3′→5′. Al separarse las dos hebras, se forma una estructura similar a un ojal. Al sitio donde permanecen las dos hebras unidas y que existe uno en cada extremo del ojal, se le denomina horquilla de replicación. En la medida que se produce el movimiento de cada horquilla, una hebra se desenrolla en sentido 3′→5′ y la otra en sentido 5′→3′. La hebra simple que se desenrolla en sentido 3′→5′ representa el molde adecuado para las polimerasas que pueden sintetizar la hebra complementaria de forma continua y se le denomina hebra conductora. La otra hebra se desenrolla en sentido contrario al movimiento de la polimerasa y se le denomina hebra conducida.

A continuación sucede la incorporación a las dos hebras simples de la ADN polimerasa α (pol-α).

Como se estudió anteriormente, esta enzima presenta dos actividades: una de ARN polimerasa y otra de ADN polimerasa. La pol-α comienza la síntesis de un oligorribonucleótido de aproximadamente 10 ribonucleótidos, así, se origina un cambio de conformación de la enzima que mueve el extremo del oligorribonucleótido de la subunidad, con actividad de ARN polimerasa, hacia el sitio activo de la subunidad, con actividad de ADN polimerasa. Esta subunidad continúa alargando la hebra hasta alcanzar una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos. Este icosanucleótido se conoce como iniciador o cebador. Una vez terminada la síntesis del iniciador pol-α se disocia del ADN. Con la disociación de pol-α del ADN concluye la etapa de iniciación. La acción de la ADN polimerasa α/iniciadora se muestra en la figura 26.12.

Elongación de la replicación

Al terminar la iniciación, cada una de las hebras del ADN tiene un sector duplohelicoidal, formado por la hebra molde (del ADN original) y los 20 nucleótidos del iniciador.

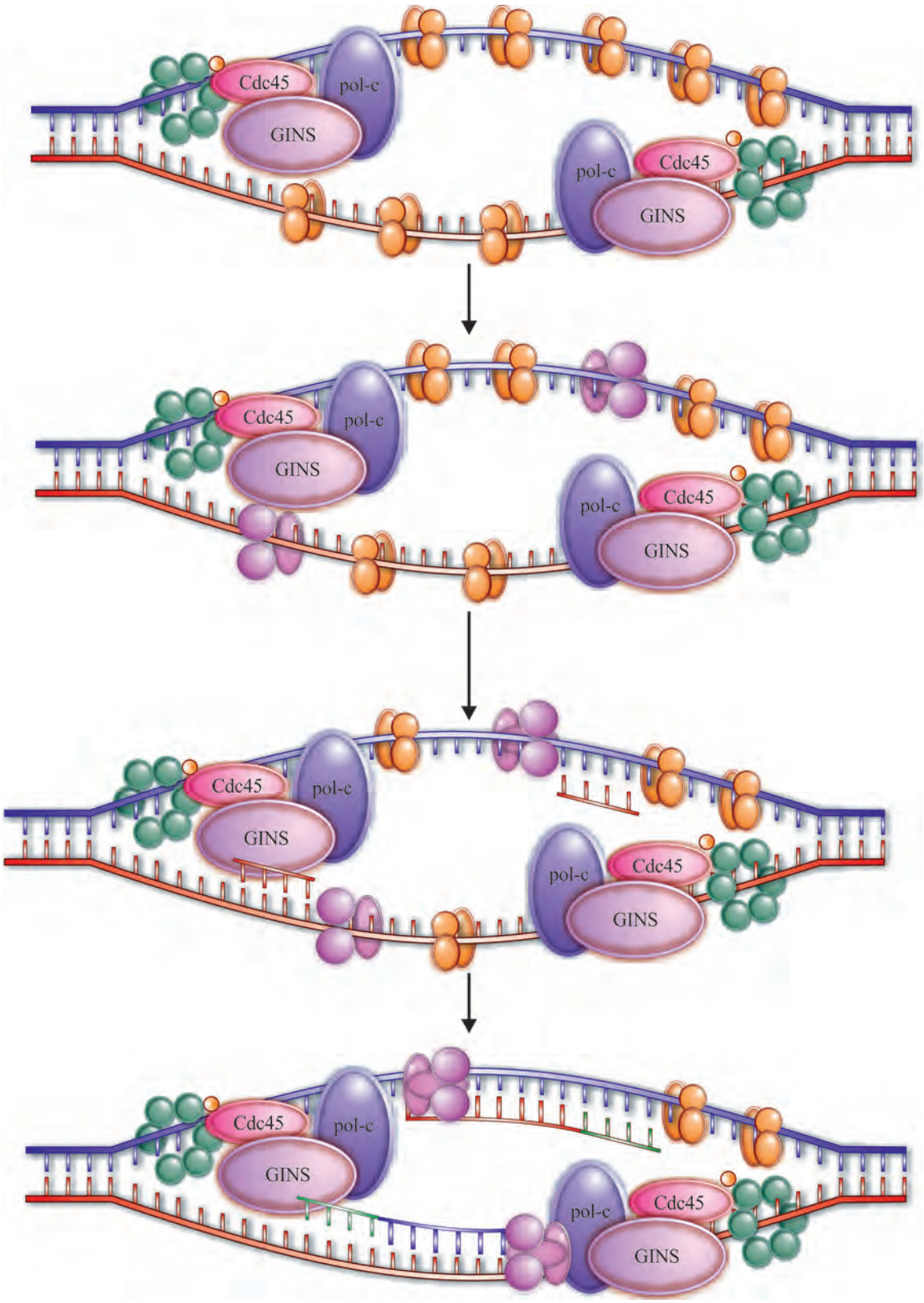


Fig. 26.12. Etapa de iniciación. A cada una de las hebras se une la ADN polimerasa α/iniciadora que forma primero un fragmento de ARN de unos 10 ribonucleótidos y después se alarga con aproximadamente otros 10 desoxinucleótidos. Este iniciador proporciona el extremo 3′-OH, necesario para la actividad de las polimerasas de la elongación.

El extremo 5´ del iniciador presenta un grupo trifosfato, mientras que el otro tiene la forma de 3´-OH. La función del iniciador es aportar el extremo 3´-OH, indispensable para la actividad de las ADN polimerasas. Durante la elongación las ADN polimerasas van añadiendo al extremo 3´-OH uno a uno los desoxinucleótidos que sus bases nitrogenadas sean complementarias a la de la cadena molde. El centro activo de estas enzimas es tan angosto que solo permite acomodar los pares de bases complementarios y catalizar la formación del enlace fosfodiéster.

Las ADN polimerasas tienden a separarse del ADN, lo que hace que la síntesis sea más demorada. Evolutivamente se ha creado un mecanismo para evitar esa situación. La proteína replicativa C deposita en el extremo 3´-OH del iniciador a una proteína en forma de anillo que recibe el nombre de antígeno nuclear de células proliferantes PCNA (del inglés, *proliferating cell nuclear antigen*). Al PCNA se asocia la pol-ε, que a su vez está unida a la helicasa por el complejo CMG (Fig. 26.13).

Una vez activado el sistema, las horquillas de replicación se mueven bidireccionalmente hacia zonas alrededor del origen de la replicación: la Mcm2-7 separando las hebras y la pol-ε uniendo los desoxinucleótidos, cuyas bases sean complementarias al molde. Este movimiento va generando superenrollamientos por delante de la horquilla, que se eliminan gracias a la actividad de la topoisomerasa I (Fig. 26.14).

Teniendo en cuenta que las ADN polimerasas sintetizan el ADN desde el extremo 5´ hacia el extremo 3´ y que las hebras del ADN tienen una disposición antiparalela, las hebras de cada horquilla se replican de forma diferente. En la hebra conductora las helicasas y las polimerasas se mueven en el mismo sentido que la horquilla y van sintetizando el ADN de forma continua. Sin embargo, en la hebra conducida el movimiento de la horquilla es contrario al de la polimerasa. Para su replicación se realizan los mismos eventos que durante la iniciación, o sea, incorporación de pol-α y síntesis del iniciador e incorporación del PCNA y su unión a la polimerasa, solo que en este caso en pol-δ y no pol-ε la que se asocia a PCNA. Esto hace que dicha hebra se duplique mediante la formación de fragmentos, denominados fragmentos de Okasaki, en honor a su descubridor, el japonés Reiji Okasaki. Esta parte del proceso se representa en la figura 26.15.

Procesamiento de los fragmentos de Okasaki

Los fragmentos que se forman durante la replicación de la hebra conducida están separados unos de otros y contienen en su extremo 5´ un oligorribonucleótido de 10 unidades. Los nucleosomas representan un obstáculo físico para la formación de esos fragmentos, de manera que su longitud se estima entre 100 y 200 nucleótidos, que es aproximadamente el tamaño del ADN asociado a los nucleosomas. El procesamiento de los fragmentos consiste precisamente en la eliminación del oligorribonucleótido y la unión de los fragmentos, lo que da lugar a una cadena continua.

El oligonucleótido iniciador es sintetizado por la pol-α que tiene la tendencia a cometer errores, por lo cual la eliminación del iniciador es un mecanismo que contribuye a la fidelidad del proceso.

La visión actual del proceso es la siguiente: al extremo 5´ del ARN iniciador se une la protína Dna2 que tiene actividad de helicasa y de endonucleasa, y se desplaza sobre el ADN, separando las dos hebras (helicasa) y cortando la hebra que contiene al iniciador cerca de la doble hebra de ADN (endonucleasa). Entonces la endonucleasa Fen-1 cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster que une al segmento desplazado con el resto del iniciador. También el complejo pol-δ-PCNA puede desplazar al iniciador en unos pocos nucleótidos y este segmento ser separado por Fen-1, y mediante ciclos repetidos de acción de estas dos enzimas pueden eliminar totalmente al iniciador.

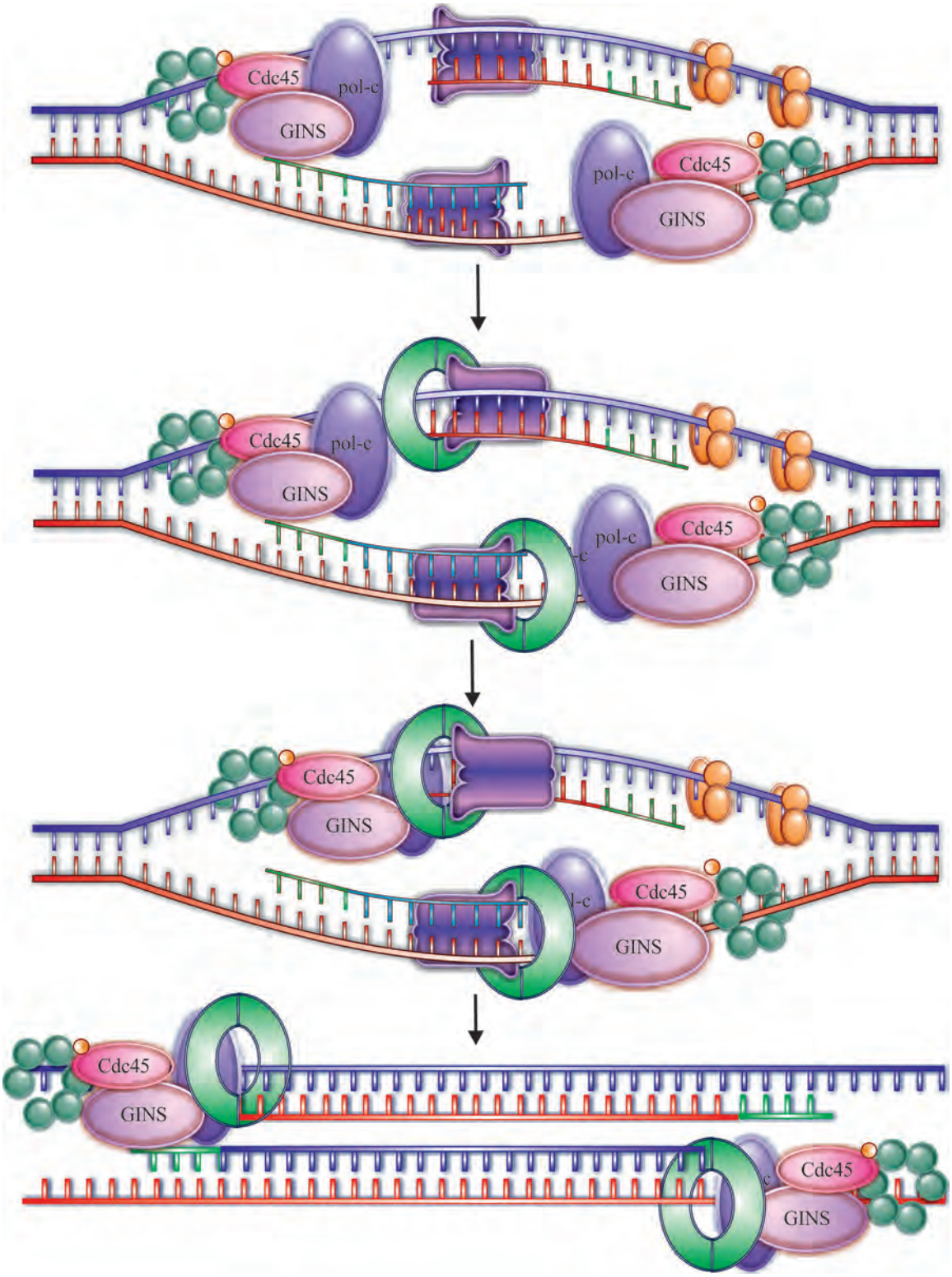


Fig. 26.13. Etapa de elongación. Al extremo 3´-OH del iniciador se asocia la proteína replicativa C que enrolla al PCNA alrededor del ADN. Al PCNA se una la polimerasa ε, que a su vez está unida con el complejo CMG. La acción combinada de la helicasa y la polimerasa produce el alargamiento de cada una de las hebras en dirección contraria y según la secuencia de bases de la hebra que le sirve de molde.

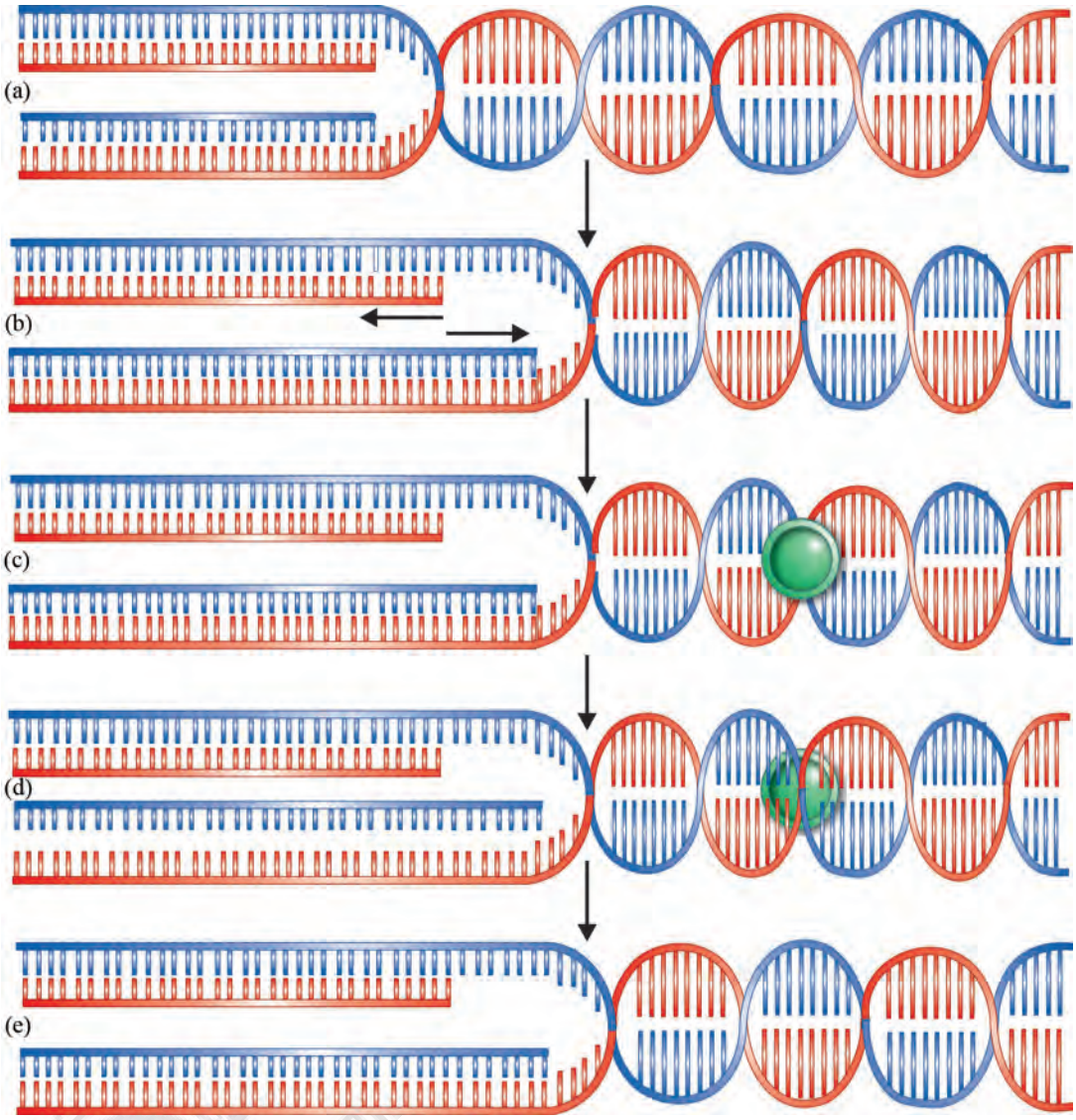


Fig. 26.14. Función de la topoisomerasa I en la elongación. (a) La horquilla de replicación se desplaza hacia la derecha; (b) el desplazamiento de la horquilla va creando zonas de tensión por delante que dificultan su avance; (c) la topoisomerasa I se une al ADN por delante de la horquilla; (d) la enzima corta una de las hebras y pasa la otra por la hendidura y (e) esta acción relaja esas tensiones y facilita el proceso.

La brecha dejada por la acción de la Dna2 y la Fen-1 es rellenada por la acción del complejo pol-δ-PCNA, hasta que solamente falta el enlace fosfodiéster que una los dos fragmentos. Esa hendidura es sellada por la acción de la ADN ligasa I en una reacción dependiente del ATP (Fig. 26.16). En la figura 26.17 se resume el procesamiento de los fragmentos de Okasaki.

Las interacciones que se establecen entre los distintos componentes del complejo de avance de la replicación, parecen indicar que la replicación de la hebra conductora está coordinada con la de la conducida.

Terminación de la replicación

En la bacteria *E. coli* la replicación del ADN se realiza en apenas 30 min. El genoma humano es unas 700 veces mayor que el de *E. coli* y la velocidad de la horquilla de

replicación es unas 200 veces menor (2-3 kb min^{-1}). A partir de estos datos se podría suponer que la replicación del ADN en las células humanas tardaría aproximadamente 20 días, si se iniciara en un solo origen por cromosoma. Los primeros trabajos sobre este tema, realizados por Huberman y Riggs, mostraron que en los mamíferos son activos entre 30 000 y 50 000 orígenes. Como ya fue expuesto, no todos los orígenes se activan simultáneamente, pues siguen un estricto programa de activación temporal durante la fase S.

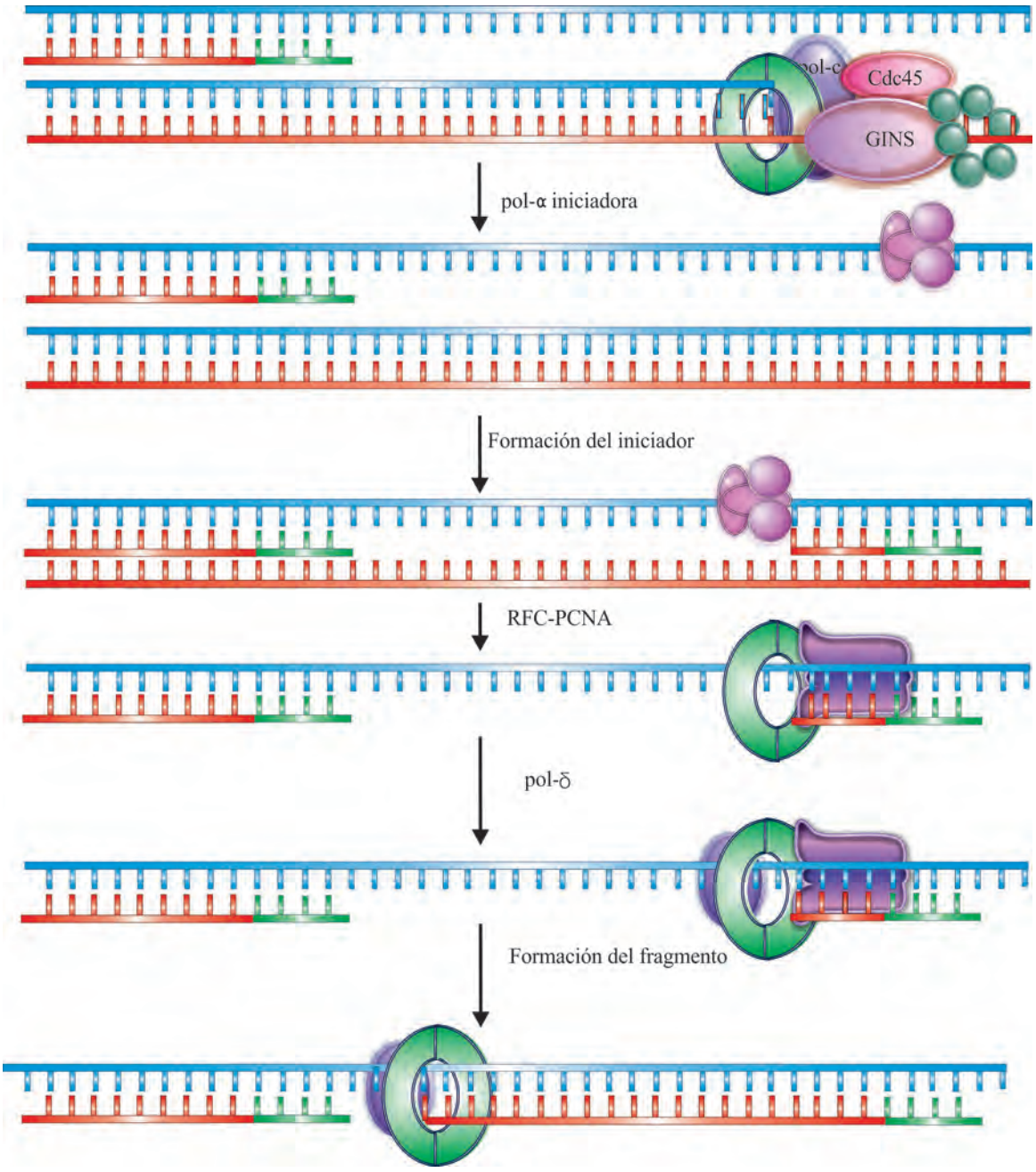


Fig. 26.15. Replicación de la hebra conducida. El desplazamiento del complejo de elongación por una hebra va dejando al descubierto la hebra complementaria. A esa hebra se une la ADN polimerasa α/inciadora que forma el iniciador. Después la proteína replicativa C incorpora al PCNA y a este se una la ADN polimerasa δ, encargada de alargar al iniciador hasta encontrar un fragmento ya formado.

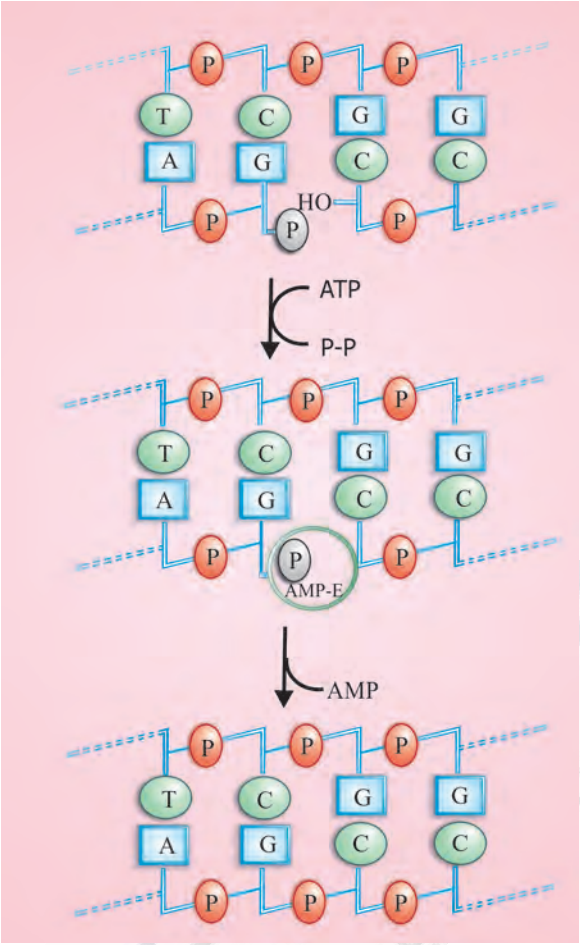


Fig. 26.16. Mecanismo de acción de la ADN ligasa. La reacción ocurre en varias etapas. La enzima transfiere un resto de AMP desde al ATP hacia el extremo 5'-P, con lo cual se facilita la formación del enlace fosfodiéster. La ligasa y el AMP se separan del ADN y la molécula queda formada íntegramente.

Por lo tanto, la separación entre los ORI es solamente de algunas decenas de kilobases. Cuando dos ORI vecinos se activan de manera eficiente, en cada uno de estos se forman horquillas de replicación que avanzan una al encuentro de la otra. Llegado un momento, dos horquillas se fusionan y el proceso de la replicación queda concluido, de lo que se infiere que cada uno de los complejos de progresión de la elongación solo tiene que sintetizar segmentos relativamente cortos de ADN y de esta forma se consigue que el colosal proceso de síntesis del ADN se realice en unas pocas horas (Fig. 26.18).

Es bueno señalar que aunque para su exposición este proceso se ha dividido en varias etapas y cada una de ellas ha sido tratada con determinada independencia, el proceso transcurre normalmente sin pausas, a partir de la activación del complejo prerreplicativo. En otros términos, en la transición entre G1 y S es que ha de tomarse la decisión de replicar o no el ADN; si ese tránsito ocurre entonces el proceso procederá hasta su culminación.

Posterminación

Una vez que un sector de la molécula de ADN ha sido replicado, se produce la adición de grupos metilos a bases específicas, así se crea un patrón de metilaciones que es característico de cada especie. El patrón de metilación del ADN genómico no está distribuido al azar. Más bien regiones discretas, incluyendo la mayoría del ADN repetitivo y parásito, están hipermetiladas, mientras otras regiones como los islotes CpG, a menudo asociadas con regiones de regulación génica, están hipometiladas. No todos los dinucleótidos CpG son metilados, por lo tanto debe existir alguna señal que indique cuáles sí y cuáles no.

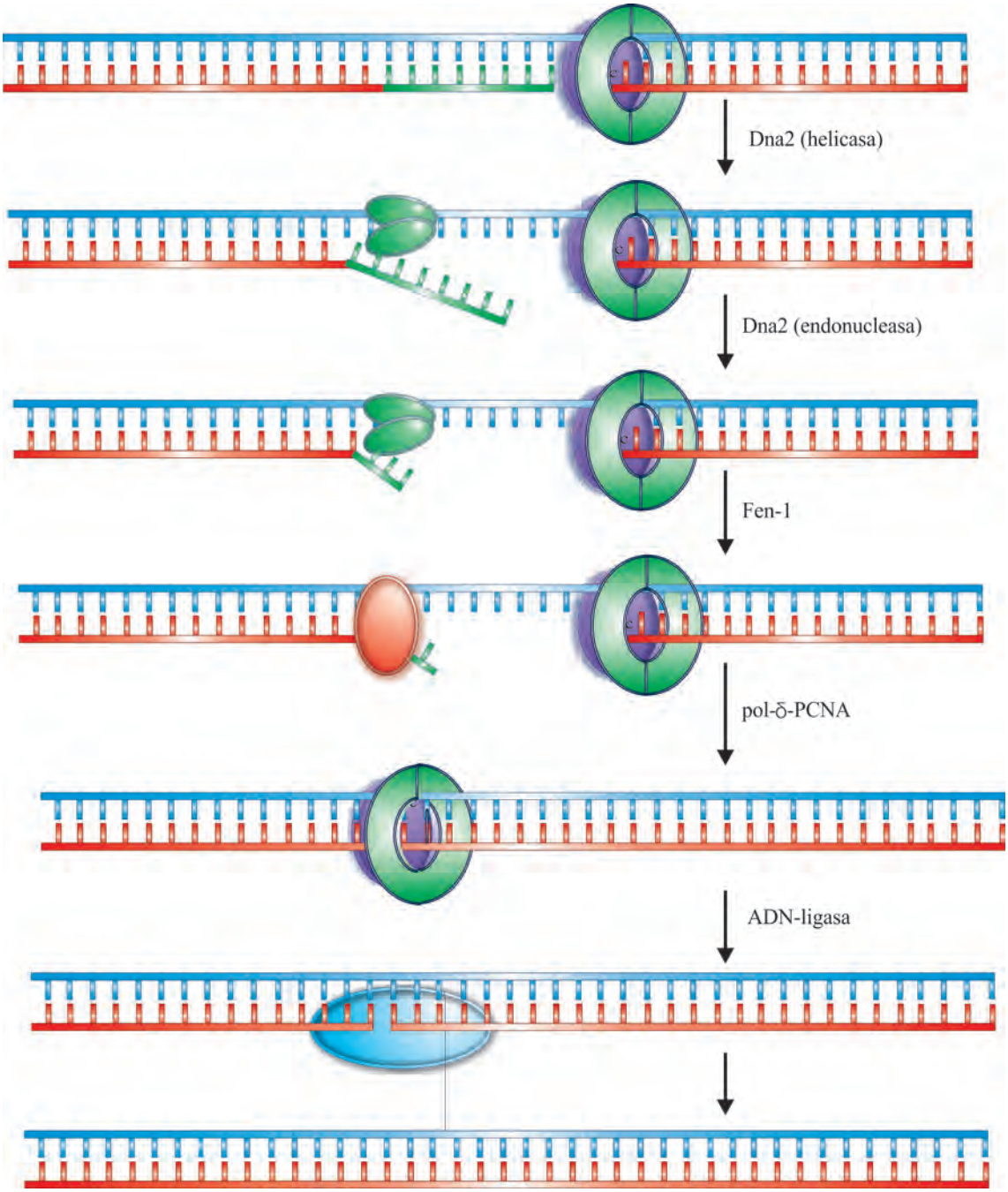


Fig. 26.17. Procesamiento de los fragmentos de Okasaki. El iniciador se separa, debido a la acción de la helicasa de la Dna2 que también por su actividad de endonucleasa elimina una parte del iniciador. La endonucleasa Fen-1 elimina el resto del iniciador. La ADN polimerasa δ rellena la brecha que es sellada por la ADN ligasa. Este proceso origina la integralidad de la hebra conducida.

La metilación es catalizada por una familia de enzimas, denominadas ADN metil-transferasas DNMT (del inglés, *DNA methyl transferase*), que tiene tres miembros. DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. De ellas, la DNMT1 es la que interviene en la fase de posterminación.

La DNMT 1 humana fue aislada en 1992 y su gen se localizó en 19p13.2. La DNMT1 tiene el dominio amino-terminal más largo de todas las DNMT de mamíferos, que desempeña un rol en la regulación de la actividad del dominio catalítico carboxilo-terminal, la localización nuclear, la unión de Zn^{2+} y las interacciones entre proteínas. Al inicio de

la replicación las dos hebras del ADN están metiladas, pero la hebra recién sintetizada carece de grupos metilos. La DNMT1 es básicamente una enzima de mantenimiento que provoca la metilación de CpG en sitios hipometilados que se encuentran fundamentalmente durante el proceso de replicación. La enzima reconoce el dinucleótido CpG y si la citosina en una hebra está metilada, entonces transfiere un grupo metilo desde la S-adenosil metionina hacia la citosina de la otra hebra. Si ninguna de las citosinas está metilada, entonces la enzima se disocia del ADN.

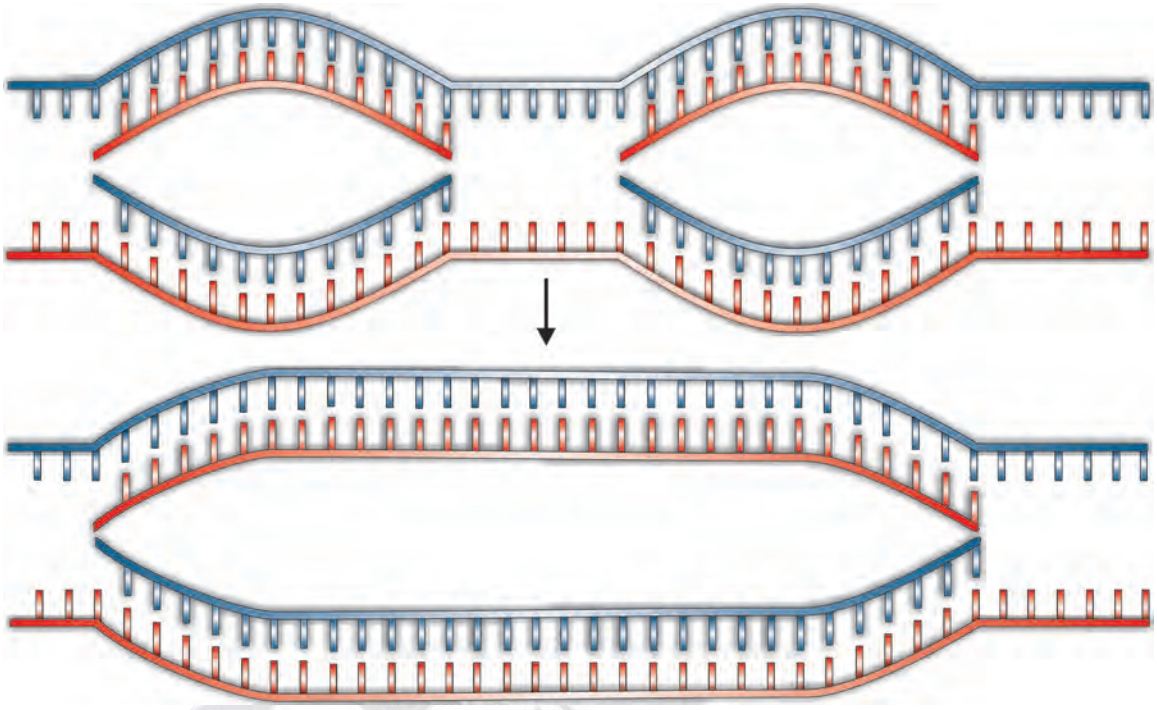


Fig. 26.18. Etapa de terminación. La replicación en eucariontes se produce con la formación de numerosas horquillas que al crecer bidireccionalmente se encuentran unas con otras y se fusionan, con lo cual se aumenta considerablemente la velocidad del proceso.

La metilación del ADN reprime la expresión de genes, debido al reclutamiento de proteínas con el dominio de unión a metil-CpG, MBD (del inglés, *methyl-CpG binding domain*) que reconoce de manera selectiva los CpG metilados. La MeCP2 es una proteína muy conocida, con dominio MBD y un dominio de represión de la transcripción. El MBD reconoce los dos metilos de CpG específicamente. Se cree que MBD se une a CpG en los nucleosomas, sin establecer conflictos de espacio con ninguna de las histonas. Trastornos en los patrones de metilación del ADN son un hallazgo común en algunas neoplasias. Un resumen del proceso se muestra en la figura 26.19.

Replicación de los telómeros

Los cromosomas lineales plantean un problema de importancia biológica fundamental: sus extremos deben ser distinguidos de las roturas cromosómicas para evitar procesos de reparación que podrían dar como resultado la fusión de cromosomas por sus extremos. Esta fusión ocasionaría trastornos graves durante la segregación de los cromosomas en la mitosis.

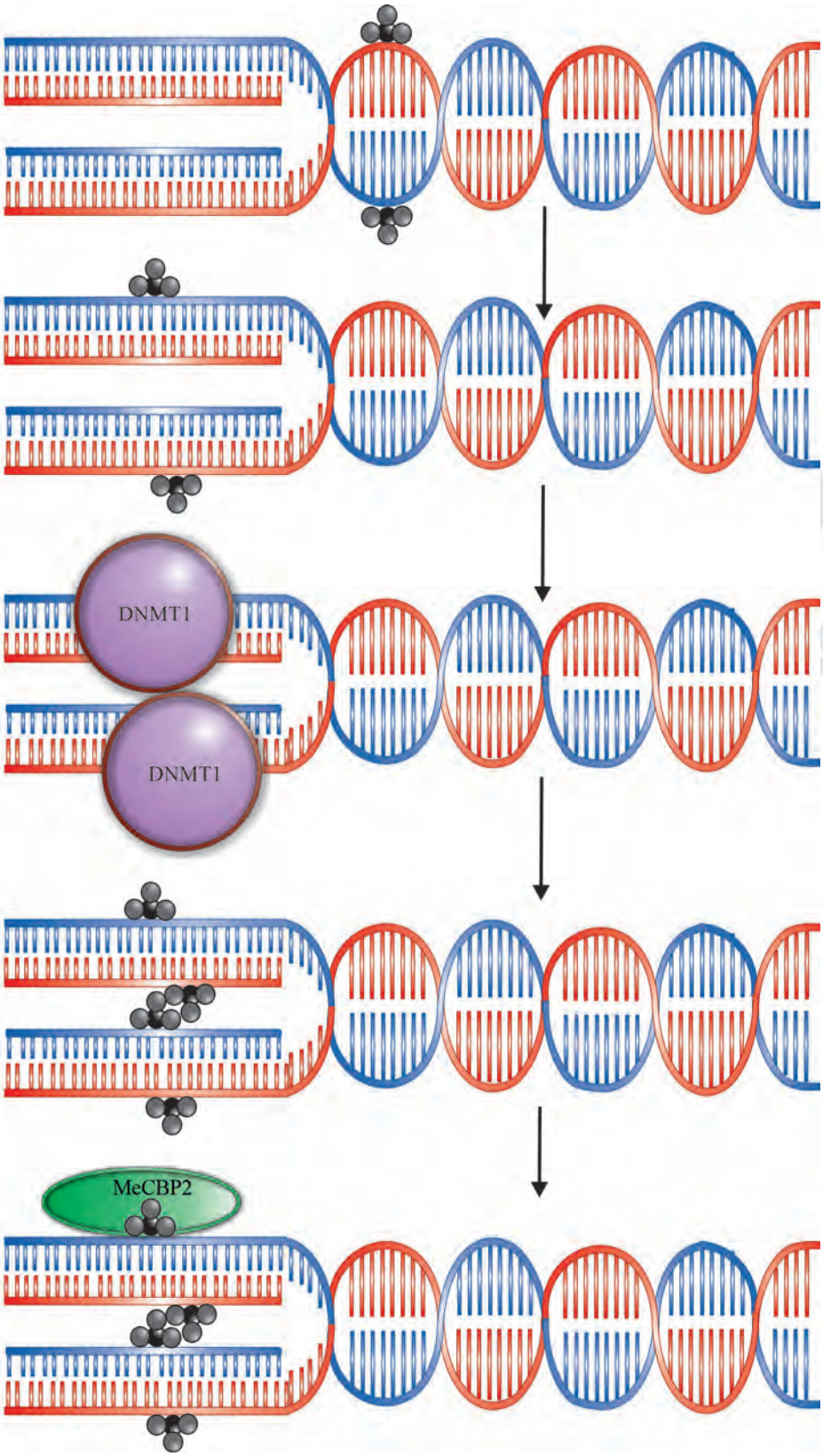


Fig. 26.19. Metilación del ADN. En determinadas regiones el ADN está metilado en la citosina del nucleótido CpG. Al producirse la duplicación, la metilación aparece solamente en una de las hebras. La DNMT1 se une al ADN y metila la hebra nueva, restituyendo el patrón de metilación. Proteínas como la MeCP2 se unen a la citosina metilada y modifican la actividad del ADN en esas regiones.

Otro problema que presentan los cromosomas lineales es que no pueden ser totalmente replicados, al menos de acuerdo con los mecanismos de replicación conocidos. Esto implicaría el acortamiento de los telómeros en cada ciclo de división celular, lo cual activaría el mecanismo de respuesta al ADN dañado y provocaría, además, la detención permanente del ciclo celular, fenómeno que se conoce como senescencia. El descubrimiento de que los telómeros poseen una extensión monofibrilar hizo que el problema fuera replanteado.

Estructura de los telómeros. Los extremos de los cromosomas lineales de eucariontes, telómeros, son estructuras altamente especializadas, esenciales para la estabilidad del genoma.

En los seres humanos y otros vertebrados el ADN telomérico es un gran segmento de repeticiones en tándem de una unidad de hexanucleótido, cuya secuencia es 5´-TTA--GGG-3´/5´-CCCTAA-3´, con un extremo 3´ monofibrilar de la hebra rica en guanina. La extensión de la doble hebra varía de 2 a 50 kb, mientras la monohebra alcanza de 100 a 250 bases. La zona monofibrilar se puede plegar sobre sí misma e invadir la zona de doble hebra, originar el lazo telomérico (lazo t) y dar origen a otras estructuras secundarias, como se muestra en la figura 26.20.

El ADN telomérico está unido a un grupo especializado de proteínas protectoras que se denominan colectivamente shelterinas (del inglés *shelter*, que significa amparo, protección, abrigo), algunas de las cuales reconoce específicamente al ADN de cadena simple y otras, al de cadena doble. Este complejo nucleoproteínico protege al extremo de los cromosomas de ser identificados como una rotura de doble hebra.

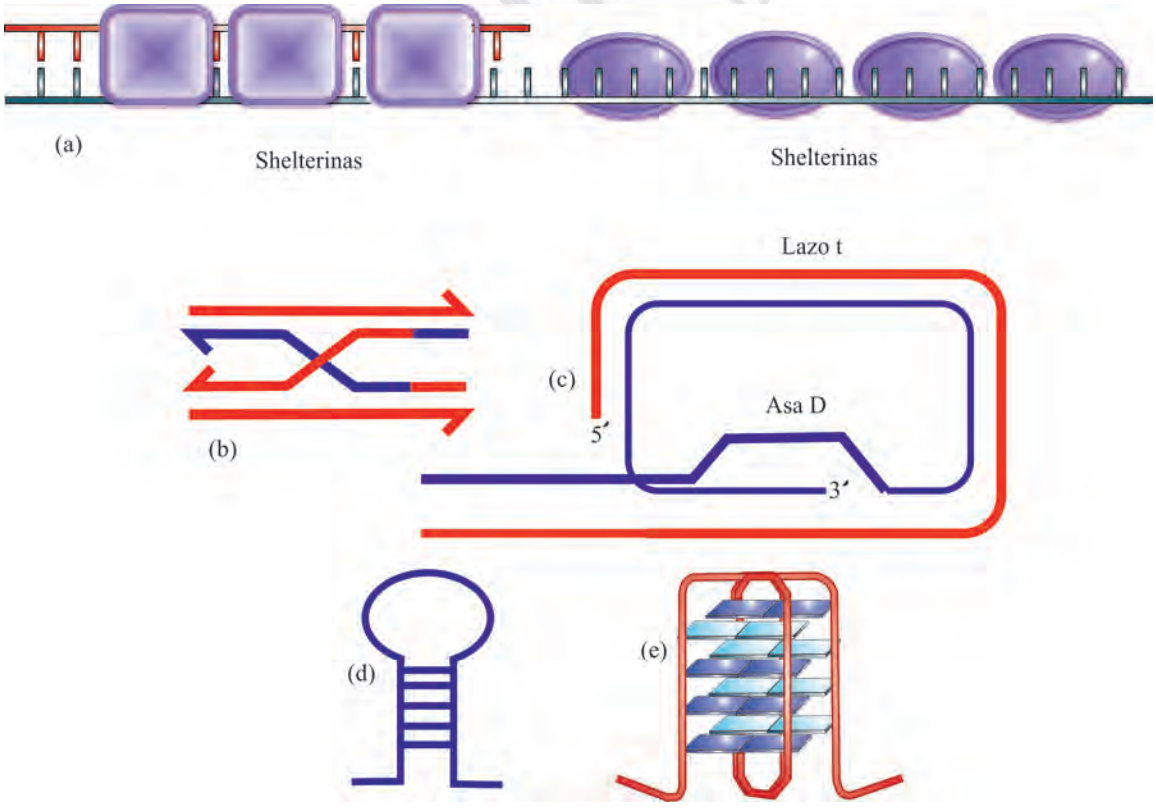


Fig. 26.20. Estructura de los telómeros. (a) La estructura de los telómeros con las shelterinas que se unen a la doble hebra y otras a la hebra simple. Diferentes estructuras secundarias que pueden aparecen en los telómeros; (b) estructura de cuatro hebras; (c) el lazo "t" y el asa "D"; (d) estructura en horquilla y (e) el apareamiento de cuatro guaninas. Todas ellas representan obstáculos para la duplicación de los telómeros.

Telomerasa. En 1985, Carol Greider y Elizabeth Blackburn descubrieron una actividad enzimática en el núcleo de Tetrahymena, capaz de alargar telómeros sintéticos. Ellas la denominaron telómero terminal transferasa, más tarde acortado a telomerasa. El tratamiento con ARNasa inactivaba a la enzima, sugiriendo que un ARN aportaba el molde para la adición de los nucleótidos. En 2010, Greider, Blackbourn y Jack Szostak, recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina, por sus aportes al conocimiento de la estructura y duplicación de los telómeros.

El gen de la telomerasa humana se localiza en la región cromosómica 5p15.33. Se trata de una ADN polimerasa especializada, que sintetiza nuevas secuencias teloméricas en los extremos de los cromosomas. Está formada por dos componentes muy conservados: la proteína central, TERT (del inglés, *telomere reverse transcriptase*), que contiene el dominio de transcriptasa inversa y un ARN esencial, TR (del inglés, *telomerasic RNA*), también denominado TERC, que unido a TERT proporciona el molde para la síntesis de las secuencias teloméricas.

En 1989, cuando aún no se había descubierto la subunidad catalítica de la telomerasa, Greider y Blackburn propusieron un modelo que ha resultado ser muy exacto. Según ellas, la telomerasa utiliza su ARN intrínseco como molde para la adición de los nucleótidos en los extremos de los cromosomas. La complementariedad entre TR y las repeticiones teloméricas facilitan alinear las dos moléculas. Después se produce la transcripción inversa y ciclos repetidos de acción originan el alargamiento de los telómeros. Después de la extensión, la maquinaria de síntesis de la hebra conducida sintetiza la hebra complementaria.

En resumen, el mecanismo de acción de la telomerasa (Fig. 26.21) se puede resumir en las etapas siguientes:

- Unión de la telomerasa al telómero, de manera que el TR quede alineado con el ADN mediante la formación de pares de bases.
- La telomerasa alarga el telómero y toma como molde la secuencia de TR, que es complementaria a la repetición.
- La telomerasa se disocia del ADN y da inicio a un nuevo ciclo.

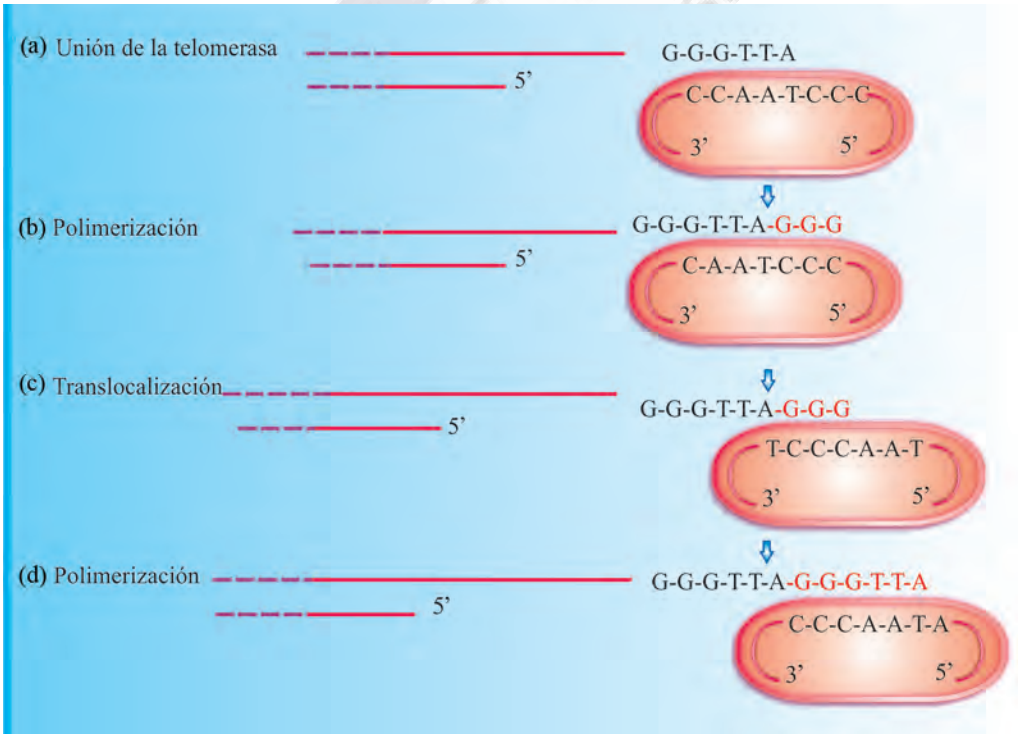


Fig. 26.21. Acción de la telomerasa. La síntesis de los telómeros se lleva a cabo por la acción de la telomerasa en un proceso que se puede dividir en tres etapas: (a) la enzima se une al extremo del telómero, utilizando el mecanismo de apareamiento de bases entre su ARN y el ADN telomérico; (b) utilizando como molde su ARN, la enzima alarga el extremo 3' de la hebra del ADN. Una vez alargado el telómero (c), la enzima se separa y vuelve a unirse al nuevo extremo y (d) comienza un nuevo ciclo de polimerización.

Proceso de la replicación de los telómeros. En líneas generales el proceso ocurre de la manera siguiente: cerca del telómero se activa un origen de replicación y da comienzo a la síntesis de la hebra conductora. Esta hebra aportará el extremo 3´ de la nueva molécula de ADN que tendrá los extremos romos, es decir, estarán al mismo nivel el extremo de la hebra molde y el de la neosintetizada.

Al menos en los seres humanos, una nucleasa asociada a las shelterinas, denominada Apolo, actúa en la resección de la hebra conductora en los telómeros. Es interesante que la resección del extremo de la hebra conductora no ocurra inmediatamente después de completarse la replicación. La hebra monofibrilar aparece en la hebra conductora aproximadamente 1 h después de hacerlo en la hebra conducida.

A medida que este proceso transcurre se va generando la hebra conducida por fragmentos de Okazaki que deben ser procesados. La síntesis por la pol-α comienza a una distancia de 70 a 100 nucleótidos del extremo de la hebra. La pol-α sintetiza el ARN iniciador de unos 10 nucleótidos y después lo alarga con desoxinucleótidos. Esta hebra puede crecer por la pol-δ, hasta alcanzar el ADN sintetizado por la horquilla vecina. El procesamiento de este fragmento lleva a la eliminación del ARN y de esta manera queda formada la hebra monofibrilar.

En células carentes de telomerasa este mecanismo provoca el acortamiento paulatino de los telómeros en las dos hebras. Sin embargo, en células que tienen esa actividad enzimática los fragmentos monofibrilares son alargados y la longitud de los telómeros, propia de la especie, se perpetúa. En la figura 26.22 se muestra este proceso.

De esta forma, el procesamiento completo de los extremos recién replicados, hasta obtener telómeros maduros, ocurre en varias etapas que se llevan a cabo, primero, en la hebra conducida y después en la conductora.

Sin embargo, en los seres humanos solamente las células que están en constante proliferación, como las células madre, pueden recibir el beneficio de la telomerasa. En la mayoría de los tejidos la actividad de telomerasa es reprimida, lo cual da como resultado una lenta erosión de los extremos cromosómicos con cada ciclo de división celular. Se ha asociado la longitud de los telómeros con el número de divisiones que una célula puede realizar, por lo tanto, el acortamiento progresivo de los telómeros determina un número cada vez menor de divisiones celulares. Por eso a los telómeros se les considera como "el reloj mitótico". Uno de los mecanismos implicados en la transformación cancerosa es la activación de las telomerasas, con lo cual se incrementa el número de divisiones celulares.

Como la replicación de los telómeros comienza a mediados de la fase S y termina al final de la misma o incluso en la fase G2, con este proceso culmina la tarea colosal de sintetizar 46 moléculas de ADN, que en su conjunto contienen siete mil millones de pares de bases. Asombra que ese proceso se desarrolle en apenas unas horas.

Fidelidad de la replicación

La replicación del ADN ocurre solo una vez durante la vida de las células, por ello es necesario que las hebras sintetizadas sean exactamente complementarias a las hebras moldes y por lo tanto las moléculas hijas sean idénticas a las parentales. A la propiedad del proceso que determina la igualdad de las moléculas nuevas en relación con la original se le denomina fidelidad. Es asombroso que la colosal tarea de copiar siete mil millones de parees de bases transcurra con una fidelidad que se ha estimado entre 10^{-9} y 10^{-10} (bases mal incorporadas/total de bases incorporadas). Varios son los mecanismos que se encargan de garantizar esa fidelidad y de cada uno de ellos se hará una breve exposición en los párrafos siguientes.

El primer factor de fidelidad es la elevada especificidad de los pares de bases, tipos Watson y Crick. El apareamiento entre citosina y guanina o entre adenina y timina resulta en un par mucho más estable que cualquier otro, y este factor de estabilidad contribuye a la fidelidad.

Un segundo factor es la elevada especificidad de las ADN polimerasas. Estas enzimas limitan el número de errores por la combinación de la selección de los nucleótidos con la corrección de la lectura. En cada paso de la elongación las polimerasas distinguen el nucleótido correcto del incorrecto, con un promedio de errores de 10^{-4} a 10^{-5} (mala incorporación/incorporación correcta). Las diferencias de energía libre entre la formación de un par de bases correcto y otro incorrecto en solución solo justifican un índice de errores de 10^{-2}, sin embargo, las polimerasas presentan el centro activo en una especie de bolsón que limita el acceso del solvente y favorece la selección de la base que forme un par tipo Watson y Crick con el molde. Algunos datos experimentales sugieren que la geometría del par de bases influye en el proceso de selección.

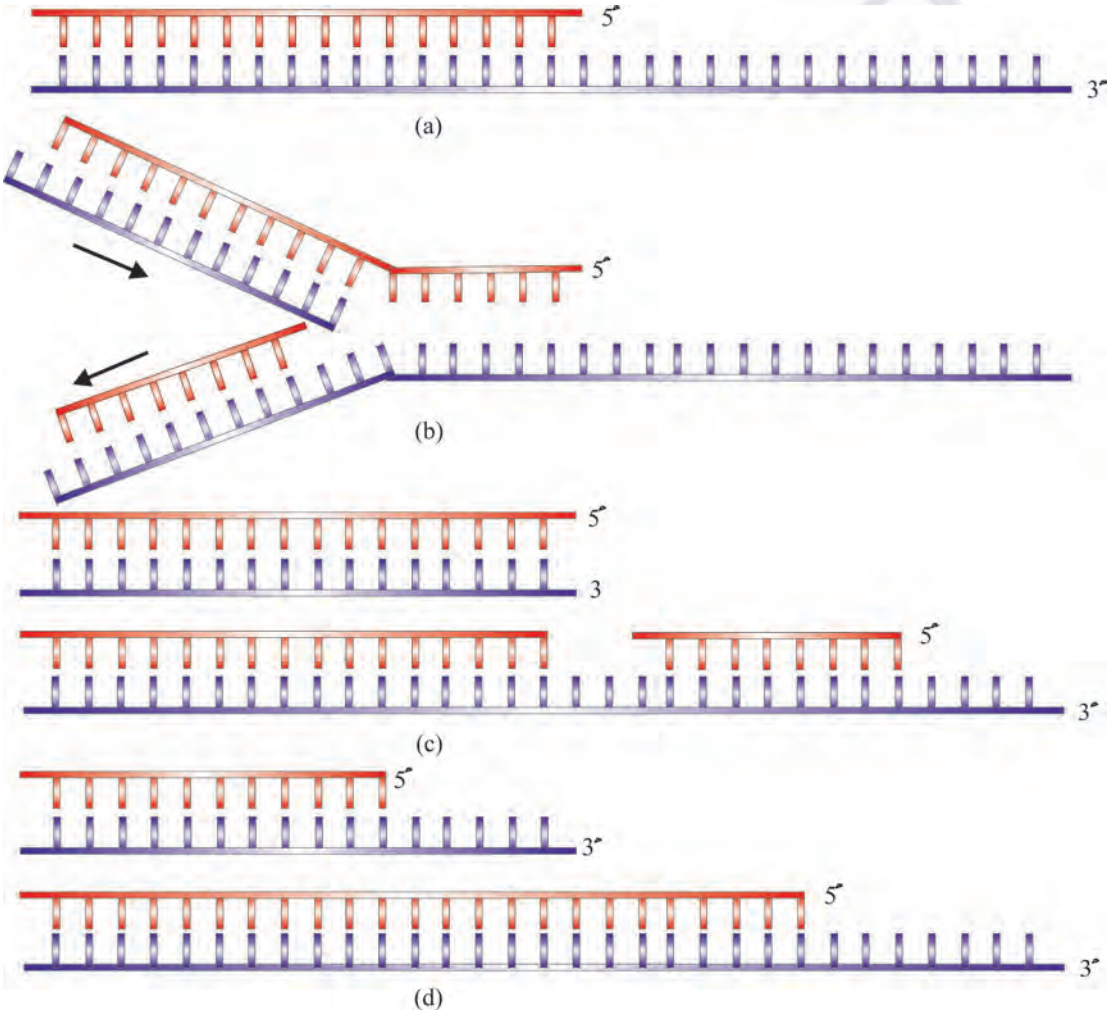


Fig. 26.22. Proceso de duplicación de los telómeros. (a) Estructura del ADN telomérico; (b) activación de un origen de replicación en la vecindad del telómero; (c) la hebra C (en rojo) se duplica de manera continua y forma extremos romos, mientras la hebra G (en azul) lo hace de forma discontinua y deja un extremo monofibrilar y (d) la hebra C duplicada es podada por la nucleasa Apolo y forma el extremo monofibrilar. De haber telomerasa, esa hebra puede alargarse; de no haber, se irá acortando y limitará el número de divisiones celulares.

Por otra parte, las polimerasas replicativas poseen actividad de exonucleasa 3´→5´, que le confiere la propiedad de rectificación de lectura. El centro activo de las polimerasas es muy angosto y solo permite acomodar pares de bases tipo Watson y Crick. Un nucleótido mal incorporado dificulta el movimiento de la enzima, lo que provoca una distorsión de la doble hélice, de tal manera que el nucleótido se desplaza hacia el sitio activo de la exonucleasa que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster y proporciona el extremo 3´-OH, necesario para la actividad de la polimerasa.

Otro factor de fidelidad es la eliminación del oligonucleótido iniciador. Se sabe que la pol-α es propensa a cometer errores y no puede rectificarlos, pues carece de actividad de exonucleasa 3´→5´. Cuando se produce el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, la zona sintetizada por pol-α es eliminada y sustituida por la acción de la pol-δ que realiza su acción con una elevada fidelidad.

Cuando todos estos factores fallan, se pone en marcha el mecanismo de reparación de bases mal apareadas que ocurre simultáneamente con la replicación.

Rectificación de los errores de la replicación

Durante la replicación del ADN pueden ocurrir errores en la acción de las ADN polimerasas, el principal es la colocación de nucleótidos diferentes a los dictados por el molde, creando un sitio donde existe un mal apareamiento de las bases. También en algunas zonas del ADN se produce el deslizamiento de la polimerasa. Cuando se desliza hacia delante, deja de copiar alguna de las bases del molde y origina una deleción; cuando lo hace hacia atrás, una o más bases pueden ser copiadas dos veces y dar lugar a una inserción. Si este proceso se repite en varios ciclos de replicación, aparecen los microsatélites, esto es, secuencias repetidas como $[A]_n$ o $[CA]_n$ que están presentes en gran número en nuestro genoma. Estos errores hacen que el segmento añadido o la hebra molde, cuando existe una deleción, formen una estructura en forma de lazo, conocida como lazos de inserción o deleción (LID). Estos errores son corregidos por el sistema de reparación de malos apareamientos, MMR (del inglés *mismatch repair*) que degrada la sección de la hebra recién sintetizada que contiene el error y permite que la polimerasa pueda generar otra hebra libre de errores.

Estos mecanismos fueron dilucidados inicialmente en *E. coli*, donde el estudio de una cepa mutadora permitió la identificación de los genes mutS, mutL, mutH y uvrD [mut, por fenotipo mutador; uvr, por reparación de daños provocados por la luz ultravioleta], cuyos productos estaban implicados en el mecanismo. Los seres humanos poseen cinco homólogos de MutS, MSH (del inglés, *MutS homologue)* y cinco de MutL, MLH y PMS (del inglés, *MutL homologue* y *post mitotic segregation*), que forman complejos heterodiméricos. De los cinco MSH, solo tres participan en MMR.

El proceso, en líneas generales, transcurre de la manera siguiente: (a) el reconocimiento de la lesión, ya sea un mal apareamiento o un LID; (b) discriminación entre la hebra molde y la neoformada; (c) eliminación de un segmento de ADN en la hebra dañada, que incluye el sitio de la lesión, y (d) llenado y sellado de la brecha formada.

El reconocimiento de la lesión se realiza por los complejos MutSα para malos apareamientos y MutSβ para inserciones o deleciones (Fig. 26.23).

En los seres humanos la señal que está implicada en el proceso no es del todo conocida. Al parecer, una hendidura en la hebra es suficiente para desencadenar el mecanismo. Estos hallazgos, unidos al hecho de que MMR es más eficiente en la hebra conducida, sugieren que los extremos de ADN que aparecen como intermediarios normales durante la replicación, puedan ser suficientes como señal para dirigir la corrección de los errores de la replicación en las células eucariontes.

Una vez identificada la hebra lesionada se procede a la eliminación de un segmento de la misma que incluya el mal apareamiento. La eliminación se hace mediante la acción de exonucleasas que van eliminando uno a uno los nucleótidos de la hebra lesionada y crean una brecha que puede llegar a alcanzar los 2 000 nucleótidos. La RPA se une al segmento de hebra que queda sin aparear, debido a la acción de la exonucleasa.

La brecha se rellena utilizando la maquinaria molecular de la replicación del ADN. Al extremo 3´ de la hebra recién sintetizada se asocia el factor replicativo C, RP-C que enrolla al PCNA alrededor del ADN. El RP-C es sustituido por la ADN polimerasa δ que va alargando la hebra y toma como molde la cadena íntegra. Cuando la polimerasa ha llenado la brecha, solo queda una hendidura equivalente a la formación del enlace fosfodiéster. Este enlace se forma por la ADN ligasa I. En la figura 26.23 se resume este proceso.

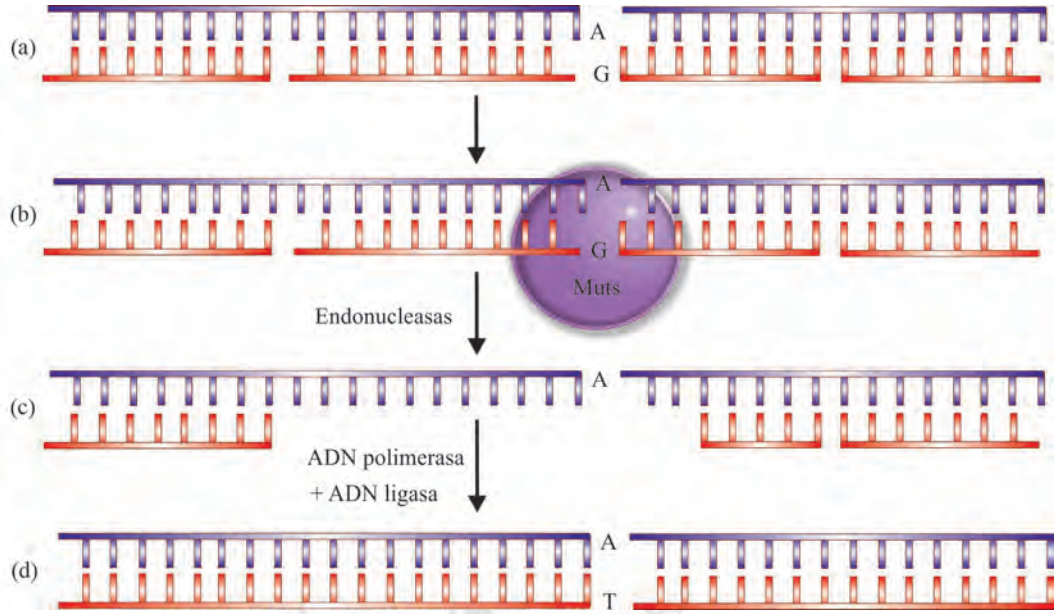


Fig. 26.23. Rectificación de errores. Cuando existen malos apareamientos, inserciones o deleciones, las proteínas MutS se unen a la zona alterada. Una exonucleasa es reclutada hacia donde existe una hendidura en el ADN, propia del proceso de duplicación, y elimina sucesivamente los nucleótidos hasta sobrepasar la zona lesionada. Más tarde la brecha se llena por la acción combinada de las polimerasas y las ligasas.

Defectos en esta vía son la causa de cánceres de colon no polipósicos hereditarios, pero también pueden desempeñar una función en el desarrollo del 15 % al 25 % de tumores esporádicos que ocurren en otros tejidos. A partir de la década de los años 90 se ha encontrado que una elevada proporción de estos cánceres exhiben un fenotipo conocido como inestabilidad de microsatélites MSI (del inglés, *microsatellite instability)*. El sistema es importante también desde el punto de vista clínico, pues tumores con deficiencias en este sistema son resistentes a determinadas drogas quimioterapéuticas citotóxicas.

Procesos complementarios a la replicación

Unas veces simultáneo con la replicación y otras con posterioridad, van ocurriendo eventos que restituyen la estructura normal de la cromatina, tal y como debe aparecen en las fases posteriores del ciclo celular.

Durante el avance de la horquilla de replicación los nucleosomas se desarman y vuelven a formarse por detrás de la horquilla sobre la molécula de ADN. Este proceso se lleva a cabo gracias a un conjunto de proteínas de la superfamilia de las chaperonas moleculares. Estas proteínas forman los nucleosomas con las histonas canónicas, o sea, H2A, H2A, H3 y H4 (Fig. 26.24).

Las dos moléculas que resultan de la replicación son envueltas por un complejo proteínico denominado cohesinas, que las mantienen unidas. Al proceso que determina que las moléculas de ADN producidas durante la duplicación se mantengan unidas, se le denomina cohesión de las cromátidas hermanas. En el centro de este proceso se encuentran las proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas, SMC (del inglés, *structural maintenance of chromosomes*) que junto con otras forman los complejos de cohesinas.

Las cohesinas están formadas por cuatro proteínas, dos de la familia SMC (SMC1 y SMC3) y dos del tipo Scc (del inglés, *sister chromatid cohesion*). Los representantes de estas proteínas en vertebrados son Rad21 (homólogo de Scc1) y SA1 y SA2 (homólogos de Scc3). La proteína Rad21 se une al extremo de SMC1 y SMC2, y forma una estructura anular. SA1 o SA2 se asocian a Rad21 y fortalecen la unión. Esto posibilita que al inicio de la mitosis las dos cromátidas que forman cada cromosoma se encuentren juntas y se pueda producir con determinada facilidad la segregación de cada una hacia las células hijas. El proceso de cohesión de cromátidas hermanas se muestra en la figura 26.25.

Una vez concluida la replicación, en algunas zonas del ADN, como los centrómeros y las regiones de heterocromatina, las histonas canónicas son sustituidas por las variantes que caracterizan a cada una de estas regiones.

Estos procesos complementarios evidencian el concepto de que en los seres humanos el proceso de replicación se debe entender para la cromatina y no solamente para el ADN.

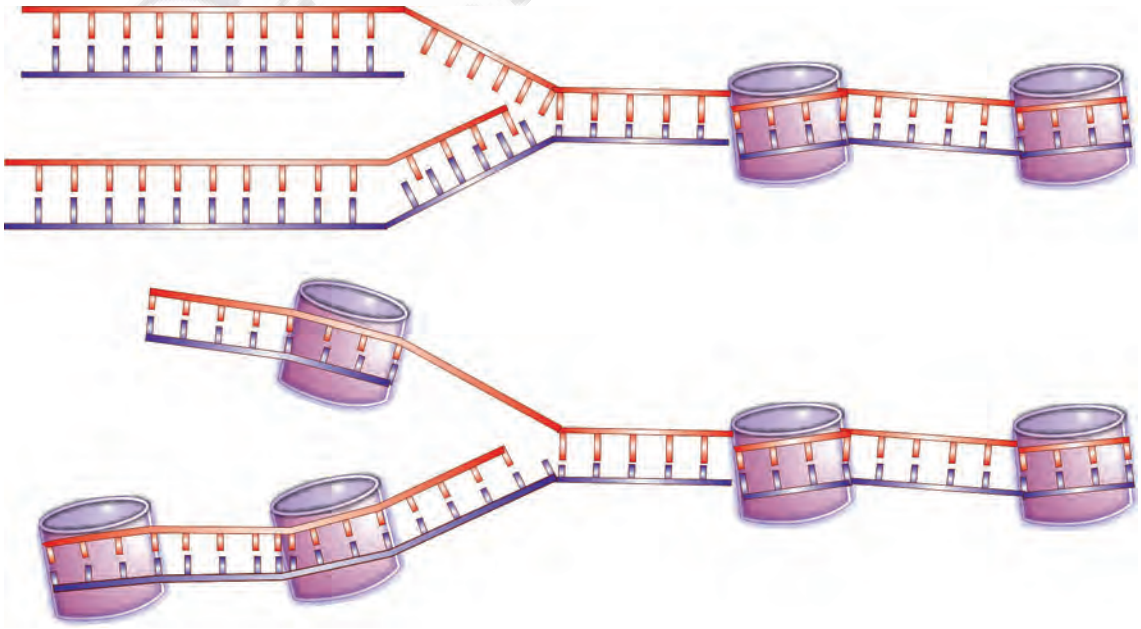


Fig. 26.24. Formación de los nucleosomas. El ADN forma parte de los nucleosomas. A medida que la replicación avanza, los nucleosomas se desarman por delante de la horquilla y se vuelven a armar por detrás, en cada una de las moléculas hijas.

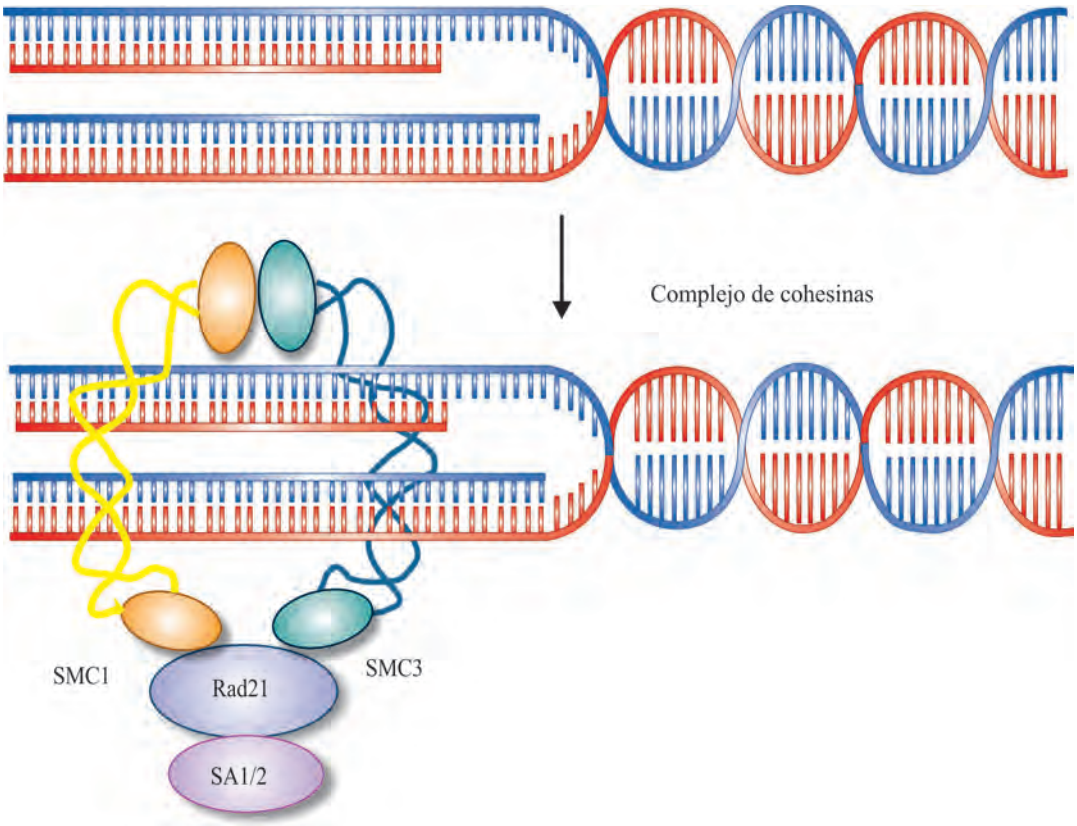


Fig. 26.25. Cohesión de cromátidas hermanas. A medida que la duplicación avanza, las moléculas hijas estructuradas como nucleosomas se mantienen unidas mediante el complejo de cohesinas. En la figura no se representan los nucleosomas en aras de la simplicidad.

Control de la replicación

Los mecanismos que controlan la replicación del ADN deben garantizar dos aspectos: primero, que el proceso transcurra hasta completarse totalmente, y segundo, que se realice solamente una vez durante la vida de la célula.

En cuanto al primer aspecto, las deficiencias en la replicación llevan a la detención de la polimerasa durante la elongación. Esta polimerasa detenida es una señal que activa un mecanismo de respuesta, donde interviene la proteína p53 que, entre otros funciones, tiene la de inducir la síntesis de p21, que es un inhibidor de las Cdk. De esta manera p53 provoca la detención del ciclo celular y da tiempo a que la deficiencia sea superada y el proceso se reinicie adecuadamente. De no poder continuar, p53 induce la apoptosis y provoca la muerte de la célula.

En cuanto al segundo aspecto, es importante que el complejo prerreplicativo se forme durante la primera mitad de la etapa G1, cuando la actividad de quinasas es muy baja y antes de que la célula reciba el estímulo para su reproducción. Este complejo se activa en la fase S, al incrementarse la actividad de quinasas, que se mantendrá elevado durante el resto del ciclo celular, con lo cual no puede formarse de nuevo el complejo prerreplicativo. Además, las proteínas Cdc6 y Cdt1 que forman parte del complejo, son fosforiladas al inicio de la fase S y después marcadas con ubiquitina y degradadas por el proteasoma. Por lo tanto, el complejo prerreplicativo solamente puede volver a formarse cuando ocurra la síntesis de estas proteínas, que es en los momentos finales de la mitosis.

Estos son los mecanismos básicos que garantizan la realización total del proceso, solamente una vez durante la vida celular.

Inhibidores de la replicación

Las diferencias en el mecanismo de replicación que existe entre las bacterias y los seres humanos ha permitido el uso de inhibidores del proceso en el tratamiento de infecciones bacterianas. Estos inhibidores actúan sobre los mecanismos moleculares específicos de las bacterias, sin influir sobre el proceso en el hospedero. Por otra parte, su uso con fines experimentales ha permitido avanzar en el conocimiento del proceso. Atendiendo a su mecanismo de acción se clasifican en dos grupos: los que actúan sobre el ADN molde y los que actúan sobre las proteínas replicativas.

Al primer grupo pertenecen los colorantes de acridina, la y el etidio, que se intercalan entre las bases y dificultan la separación de las cadenas; la netropsina y la distamicina A, que se unen fuertemente a zonas ricas en pares A-T, y la bleomicina y la neocarzinostatina, que provocan roturas de los enlaces entre los carbonos 3' y 4' de la desoxirribosa.

Al segundo grupo pertenece la afidicolina, que inhibe la ADN polimerasa alfa, la novobiocina y el ácido nalidíxico, que actúan sobre la topoisomerasa II (Fig. 26.26).

Un grupo importante de inhibidores lo constituyen los 2'-3' didesoxirribonucleósidos trifosfatados que se han empleado para determinar la secuencia de bases de los ADN. Solo actúan *in vitro*, ya que los nucleósidos trifosfatados no atraviesan la membrana celular.

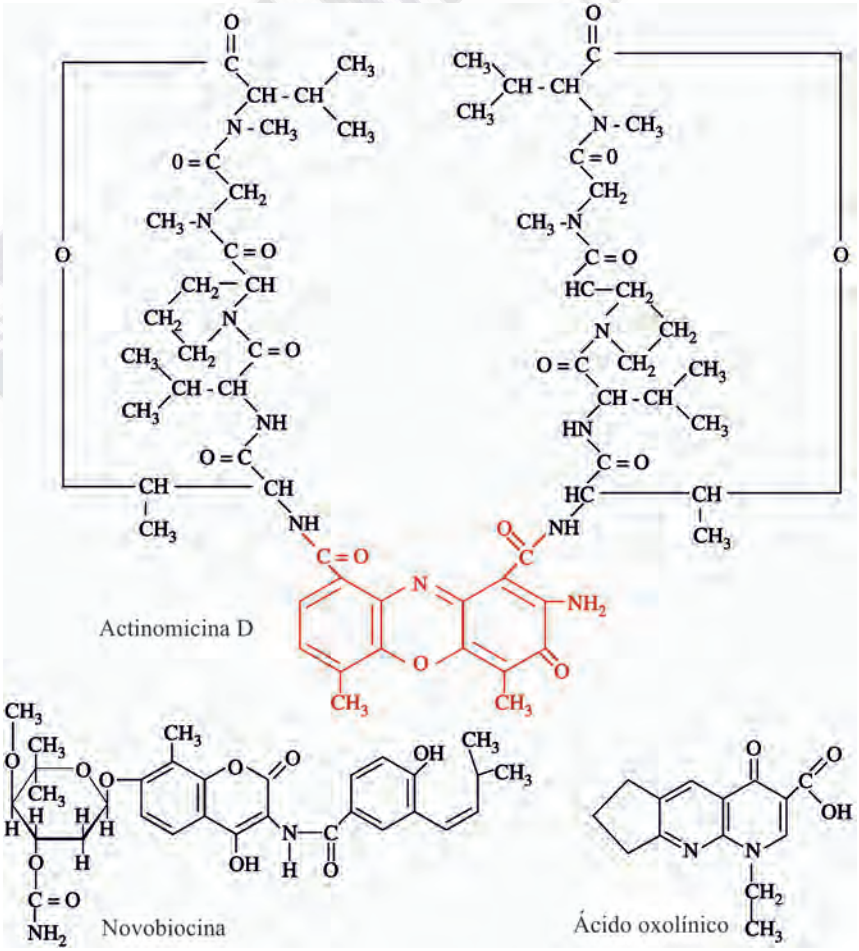


Fig. 26.26. Inhibidores de la replicación. Se muestra la estructura de la actinomicina D que está compuesta por un anillo triple de fenoxazona y dos polipéptidos cíclicos laterales. Al interactuar con el ADN, el anillo de fenoxazona se intercala entre dos pares de bases (preferiblemente GC) y los péptidos interactúan con las zonas vecinas fortaleciendo la unión entre las dos bandas. Las proteínas replicativas, al llegar al sitio donde está la actinomicina D, no pueden separar las bandas del ADN y se detiene el movimiento de la horquilla. La novobiocina y el ácido oxonílico, por su parte, son inhibidores de las topoisomerasas y su acción dificulta la replicación.

Hasta aquí se han desarrollado los aspectos más sobresalientes de uno de los procesos más importantes de la materia viva. Como se vio al inicio, se planteaban problemas importantes para su realización, cuya complejidad hacían prever respuestas complejas y así ha resultado.

Pero cabría preguntarse ¿por qué resulta tan complejo este proceso? ¿No existen mecanismos más simples e igualmente probables para un proceso de esta naturaleza? ¿Por qué se requiere un número tan elevado de enzimas y otras proteínas, con tan elevados grados de complejidad estructural y funcional?

Por supuesto, que estas respuestas no las tiene nadie. Cuando se analiza un mecanismo de este tipo, solo se pueden expresar las ventajas que representa con respecto a otro alternativo, sin llegar a saber por qué los organismos con estas características se han seleccionado de manera evolutiva sobre otros; esa es la base del razonamiento que se expone a continuación.

El primer aspecto a considerar es que los errores que se producen durante la replicación pueden alterar procesos en la célula y el organismo, que pudieran tener graves consecuencias. Cuando el ADN dañado se transmite a la descendencia, las modificaciones en el contenido de la información genética podrán alterar las instrucciones para la formación de un nuevo organismo.

A diferencia de otros procesos, la replicación ocurre solo una vez durante la vida de la célula, por lo tanto deben existir mecanismos que garanticen este aspecto. Más de una replicación en la vida de una célula incrementaría la dosis de cada uno de los genes y crearía serios problemas para la supervivencia de la célula y el organismo.

Por otra parte la replicación es un proceso colosal, pues se trata de replicar siete mil millones de pares de bases con un elevado grado de fidelidad, tomando como molde o guía una molécula con una estructura compleja que representa en sí misma un obstáculo para el proceso. Si a esto se añade la estructura en nucleosomas del material genético, el grado de complejidad crece sustancialmente. Por lo tanto, no solo son necesarias las enzimas que unan los desoxinucleótidos, sino, además, las que transformen la estructura en un molde adecuado para el proceso, que proporcionen el acceso a la secuencia de bases, que eliminen los obstáculos que el mismo proceso va creando y que retornen el material genético a su estructural natural.

Por último, se trata de copiar un grupo de moléculas cuya longitud total es cercana a 1 m y confinada al espacio minúsculo del núcleo celular donde, además, se encuentran otras estructuras que también son importantes para la realización de otros procesos.

Estas, entre otras, pueden ser las razones más evidentes del elevado grado de complejidad, lo que está apoyado, además, por el hecho de que en la medida que aumenta la longitud del ADN en las células, son mayores el grado de complejidad del proceso y el número de factores proteínicos específicos involucrados.

El elevado grado de precisión que requiere la transferencia de información, de generación en generación, con un elevado grado de fidelidad, obliga a la complejidad del proceso molecular que constituye su fundamento final.

Resumen

La trasmisión de la información genética de un organismo a sus descendientes constituye el fenómeno más importante de la materia viva, y aunque adquiere diferentes formas de acuerdo con el tipo de organismo, su fundamento final es el mecanismo de replicación del ADN. Toda la información genética está codificada en la secuencia de

bases nitrogenadas del ADN, y el apareamiento específico de ellas es el mecanismo básico utilizado en todos los sistemas replicativos. La replicación tiene un carácter reiterativo, pues los desoxinucleótidos se añaden por el mismo mecanismo al extremo de una cadena en crecimiento, procede por complementariedad de bases, acoplada a la hidrólisis del pirofosfato y de forma antiparalela y semiconservativa.

La replicación más sencilla es la de los virus de los procariontes, cuyo estudio ha permitido esclarecer algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso. La replicación del ADN en la *E. coli* fue durante mucho tiempo el paradigma de este proceso, por el grado de detalle del conocimiento del proceso, la caracterización de las especies moleculares implicadas y la relativa facilidad para su estudio experimental.

Cinco tipos fundamentales de enzimas participan en el proceso: las polimerasas, que catalizan la formación del enlace fosfodiéster que une los desoxinucleótidos; las helicasas que producen la apertura de la doble hélice del ADN; las topoisomerasas que alivian las tensiones creadas por los superenrollamientos; las ligasas que unen fragmentos de ADN alienados en una doble hélice y las nucleasas que eliminan oligodesoxinucleótidos durante el procesamiento de los fragmentos de Okasaki.

Durante las últimas décadas se ha producido un notable avance del conocimiento sobre el proceso en eucariontes, sobre todo en el ser humano. En nuestro organismo la replicación está vinculada a la progresión del ciclo celular.

Durante la etapa G1 se ensambla el complejo prerreplicativo, formado por las proteínas del ORC, la Cdc6 y la Cdt1 que reclutan hacia el origen a la helicasa Mcm2-7. En el paso de G1→S se activa el complejo prerreplicativo y se transforma en el complejo de preiniciación por la acción de proteínas quinasas específicas. Se forma el complejo de elongación CMG que trae hacia el origen a la polimerasa ε y que de forma no precisada provoca la apertura de la doble hélice y crea las horquillas de replicación. A comienzos de la fase S, al origen se asocia la polimersa α/iniciadora que forma un oligonucleótido que servirá de iniciador. Una vez que la proteína replicativa C enrolle al PCNA en el extremo 3´-OH del iniciador, el complejo CMG comienza la elongación, siempre en sentido 5´-P→3´-OH. La hebra conductora se sintetiza de forma continua, pero la conducida lo hace por fragmentos que son procesados y unidos unos con otros por la acción de la endonucleasa Fen-1, la polimerasa δ y la ligasa. Cuando dos horquillas vecinas se encuentran, el proceso termina.

Posteriormente se produce la metilación del ADN, la formación de los nucleosomas, la unión de las moléculas formadas mediante las cohesinas y la sustitución de las histonas canónicas por las variantes típicas de sitios específicos.

Todo el proceso presenta una elevada fidelidad de copia que viene dada, entre otros factores, por la precisión del apareamiento de bases, la especificidad de las polimerasas, la eliminación del ARN iniciador y el mecanismo de edición. Cuando todos estos fallan, se produce la rectificación de los errores por el mecanismo de reparación de bases mal apareadas.

Numerosos son los antibióticos cuya acción específica consiste en actuar como inhibidores de la replicación, los cuales, además del beneficio que han reportado a la lucha contra las enfermedades infecciosas, han sido de inestimable valor para el estudio del complejo proceso de la replicación del ADN.

Los resultados obtenidos experimentalmente en diferentes sistemas replicativos permiten intentar una descripción generalizada del proceso, que tendrá su expresión particular en cada organismo dado. La replicación comienza en sitios específicos del ADN, denominados orígenes de replicación, a donde se unen proteínas específicas. La

unión de estas proteínas provoca el desenrollamiento local de la doble hebra del ADN, que por acción de otras proteínas es agrandado. Un sistema enzimático específico forma el ARN iniciador que después será alargado por polimerasas específicas. Una de las hebras se forma de manera continua, en tanto la otra se sintetiza por fragmentos que luego son unidos por la acción de ADN ligasas. Todo el proceso se caracteriza por la elevada velocidad de polimerización, la alta procesividad y la extraordinaria fidelidad de copia.

Ejercicios

1. Demuestre que en el proceso de replicación se cumplen los principios siguientes:
   a) De los cambios graduales.
   b) De acoplamiento.
   c) De transferencia de información.
2. Teniendo en cuenta las características de su acción, explique por qué es necesario que en la preiniciación intervenga la topoisomerasa II y durante la elongación, la topoisomerasa I.
3. ¿Por qué algunos autores afirman que la replicación es un proceso semidiscontinuo?
4. ¿Cuál es la justificación molecular de la necesidad de formar el ARN iniciador?
5. Para poder aislar con facilidad los fragmentos de Okasaki se prefiere utilizar bacterias mutantes que son deficientes en la actividad de la ADN ligasa. ¿Por qué cree usted que sea así?
6. ¿Cuáles son las características del ADN humano que hacen necesaria la participación de un elevado número de proteínas para su replicación?
7. ¿Por qué el complejo prerreplicativo solamente se puede formar durante la etapa G1 del ciclo celular?
8. En el laboratorio se aísla una célula con mutaciones en el promotor del gen de la ciclina E que hace que esta proteína se sintetice continuamente durante todo el ciclo celular. ¿Qué implicaciones tiene esa situación en la replicación del ADN?
9. Si una mutación en uno de los genes que codifican una de las subunidades del complejo GINS impide la formación de ese complejo, ¿podría afectarse el proceso de duplicación? ¿Por qué?
10. Se ha observado que en muchas células cancerosas existe una elevada actividad de la enzima telomerasa. ¿Tendrá que ver la elevada actividad de la enzima con el proceso de transformación cancerosa?
11. Existen varios síndromes debido a deficiencias en la duplicación de los telómeros y en muchos de ellos los pacientes muestran un envejecimiento precoz. ¿Cómo puede explicarse esa situación?
12. ¿Qué consecuencias traería para la mitosis la ausencia de alguno de los componentes del complejo de cohesinas?
13. ¿Qué pasaría si al aparecer un mal apareamiento durante la replicación ese error no es rectificado?
14. Si durante la elongación se presenta un obstáculo para el avance de la horquilla se produce la separación de la polimerasa de la helicasa. ¿Qué consecuencias trae ese fenómeno?
15. ¿Por qué cree usted que se proponga el uso de inhibidores de la telomerasa en el tratamiento del cáncer?

CENCIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Transcripción del ADN

En el capítulo anterior se estudió cómo la duplicación del ADN es el fundamento molecular de la transferencia de información de una célula u organismo a sus descendientes. La información genética es la propiedad del ADN que le permite dirigir la formación de un organismo, monocelular o pluricelular, y dotarlo de mecanismos de supervivencia en un ambiente determinado. Por lo tanto, los organismos deben contar con mecanismos por medio de los cuales se logre la expresión de la información genética; ese mecanismo, en líneas generales, consiste en sintetizar las moléculas de ARN y de proteínas, cuya estructura primaria está codificada en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN. En un primer proceso, denominado transcripción, el ADN dirige la síntesis de los ARN y algunos de ellos cumplen funciones específicas en las células. Para la síntesis de proteínas se requiere un segundo proceso, denominado traducción, en el cual el ARNm sintetizado a partir de la información contenida en el ADN, dirige la síntesis de las proteínas en los ribosomas (Fig. 27.1).

En los procariontes estos dos procesos ocurren de manera continua –en algunos casos hasta simultáneamente– no así en los eucariontes que realizan la transcripción en el núcleo y la traducción en el citoplasma. De una forma o de otra la expresión de la información genética constituye el mecanismo fundamental, mediante el cual el ADN determina las características estructurales y funcionales de una célula y de un organismo como un todo; por eso, como se vio anteriormente, no es imprescindible la duplicación exacta de todos los componentes celulares al producirse la división celular, basta con la división del ADN y los componentes celulares que intervienen en su expresión para que las células hijas sean de la misma especie que las parentales.

El nombre de transcripción se fundamenta en el hecho de que durante el proceso se copia una información escrita en el lenguaje de la secuencia de bases nitrogenadas del ADN, en una molécula de ARN que tiene el mismo lenguaje.

En este capítulo se hará una descripción lo más pormenorizada posible de los mecanismos moleculares de la transcripción del ADN, teniendo en cuenta, además, que existen aspectos que no están totalmente aclarados.

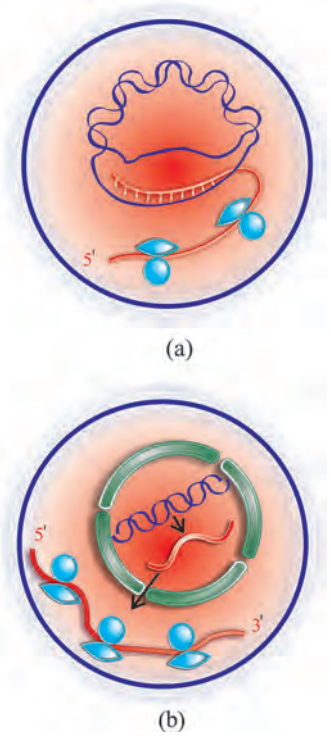


Fig. 27.1. Relación transcripción-traducción. En los procariontes (a) al no existir envoltura nuclear la traducción comienza generalmente antes de terminar la transcripción. En los eucariontes (b) el ARNm se forma en el núcleo y allí se procesa antes de ser transportado al citoplasma, donde es traducido.

Inicios

El estudio experimental de la transcripción comenzó en 1959, cuando Samuel Weis y Leonard Gladstone, trabajando con extractos de hígado de ratas, descubrieron una actividad enzimática capaz de incorporar CMP a partir de CTP marcado en el fosfato α con ^{32}P. Ellos se percataron de que el mecanismo de la reacción era semejante al descrito para la síntesis de ADN, más bien que al de la polinucleotidofosforilasa, descubierta 3 años antes por Severo Ochoa.

Con este descubrimiento los autores habían abierto el inmenso campo de la transcripción genética, que es algo fundamental para los procesos biológicos como el crecimiento celular, la diferenciación y el cáncer. Una actividad similar de síntesis de ARN fue encontrada unos años después en *E. coli*, en el laboratorio de J. Hurwith, A. Bresler y R. Diringer, el de A. Stevens y el de M. Chamberlin y P. Berg.

Por razones prácticas, en la década siguiente se establecieron los mecanismos generales de la síntesis de ARN con el uso de la ARN polimerasa bacteriana purificada, de esta manera se pudo conocer la naturaleza de los sustratos, la dirección del proceso y los conceptos del ADN como molde, de la secuencia de promotor y de la holoenzima.

Sin embargo, aunque estas enzimas compartían la propiedad de transcribir un conjunto diverso de secuencias de ADN, carecían de la habilidad de reconocer secuencias específicas para el comienzo de la transcripción en cada gen. La selección de los sitios de iniciación y terminación fue resuelta esencialmente con el descubrimiento del factor de iniciación sigma, en 1969, por R. R. Burgess, A. A. Travers, J. J. Dunn y E. K. F. Bautz; posteriormente, J. Roberts descubrió el factor de terminación rho. En ese mismo año, Burgess aclaró la composición en subunidades de la enzima bacteriana. La primera secuencia de promotor, reconocida por la ARN polimerasa bacteriana, fue establecida en 1974 por T. Sekiya y H. G. Khorana, este hecho constituyó una hazaña técnica en esa época pregenómica.

No obstante, los primeros intentos de reproducir la transcripción *in vitro*, utilizando únicamente Pol II purificada, no podían iniciar la transcripción en un sitio específico. Esta iniciación selectiva solamente se logró cuando la reacción era suplementada con un extracto crudo de núcleo, obtenido por cromatografía. Estos experimentos, llevados a cabo por T. Matsui, J. Segal, P. A. Weil y R. G. Roeder, en 1980, condujeron al descubrimiento de los factores generales de transcripción, un conjunto de aproximadamente 30 polipéptidos necesarios para la selección adecuada del sitio de iniciación y la formación del complejo de preiniciación.

El sentimiento general, al final de estas primeras décadas, era que se habían revelado los principios básicos que determinan la especificidad, la selectividad y la fidelidad de la transcripción genética. Desde entonces hasta la fecha, se ha ido conociendo con más profundidad el complejo mecanismo de la transcripción. En este capítulo se presentan los mecanismos fundamentales, pues un examen exhaustivo del proceso está más allá del alcance de este texto. En el año 2006 Roger Konrberg recibió el Premio Nobel de Química, por sus estudios sobre las bases moleculares de la transcripción en eucariontes.

Aspectos generales

La transcripción es el proceso central en el crecimiento y desarrollo de las células, en la cual los genes que se encuentran en el ADN de los cromosomas son selectivamente localizados, reconocidos y transcritos. Existe una gran variedad de ARN, entre los que se destacan los mensajeros (ARNm), ribosomales (ARNr) y de transferencia (ARNt). Pero en los últimos años se han descubierto numerosos ARN, generalmente pequeños, con

variadas funciones dentro del proceso general de expresión de la información genética. Entre estos se encuentran el ARN relacionado con los telómeros, TERRA (del inglés, *telomeric repeat RNA*), y el que sirve de cofactor a la telomerasa TR (del inglés, *telomerasic RNA*), los que intervienen en el procesamiento de los ARNm, conocidos como ARN nucleares cortos (ARNnc) y los que procesan los ARNr, denominados ARN nucleolares cortos (ARNnoc). Los que participan en el procesamiento de proteínas en el citoplasma, conocidos como ARN cortos citoplasmáticos (ARNcc) y, por último, numerosos ARN que intervienen en los mecanismos de control de la expresión de la información genética, por ejemplo, los ARN no codificantes largos (ARNnl), los ARN de interferencia (ARNi) y los microARN. En estos dos casos se prefiere su abreviatura en inglés, pues se puede pronunciar como una palabra: miRNA y siRNA.

El notable progreso, en los últimos años, de la genética de numerosos organismos, incluyendo al hombre, la tecnología del ADN recombinante, la bioquímica-física, etc., ha ampliado considerablemente los conocimientos acerca de este proceso. Aun cuando se puedan presentar diferencias en los mecanismos de transcripción en diferentes organismos, existen algunas características que les son comunes a todos ellos.

Los precursores de la síntesis de los ARN son los cuatro ribonucleósidos trifosfatados, ATP, GTP, UTP y CTP. En la reacción de polimerización, estos ribonucleótidos son añadidos uno a uno al extremo de una hebra en crecimiento, por enzimas denominadas ARN polimerasas dependientes de ADN o simplemente ARN polimerasas.

La secuencia de bases del ARN es complementaria a la hebra de ADN que se está copiando. Aunque el ADN es en general de doble hebra, en cada sector específico, solo una de ellas se utiliza como molde o patrón para la síntesis de ARN. En el caso de los genes que codifican proteínas, la hebra que dirige la síntesis del ARNm se denomina hebra molde, mientras que su complementaria recibe el nombre de hebra codificante. Esto se debe a que si en la hebra codificante se sustituye la timina por uracilo, se tiene la secuencia de bases del ARNm.

La hebra de ARN crece en el sentido 5'→3', mientras va copiando la hebra del ADN que está en dirección 3'→5', luego la síntesis es antiparalela y unidireccional. La reacción básica de polimerización consiste en la adición de un ribonucleósido monofosfatado a partir de su forma trifosfatada al extremo 3'OH del nucleótido precedente, con liberación de pirofosfato, formándose un enlace fosfodiéster. Al igual que en la duplicación, la polimerización avanza acoplada a la hidrólisis del pirofosfato. Las ARN polimerasas son capaces, por sí mismas, de iniciar la síntesis, luego, no existe necesidad de un iniciador.

Como en la transcripción solamente se copia un pequeño segmento de ADN, son necesarios un sitio de iniciación (SIT) y un sitio de terminación (STT), además del sitio de unión de la ARN polimerasa, denominado promotor.

En resumen, la transcripción se origina por el mecanismo básico de complementariedad de bases, añadidas en forma gradual, unidireccional y antiparalela, desde el sitio de iniciación hasta el sitio de terminación, sin necesidad de un iniciador y acoplada a la hidrólisis del pirofosfato.

Etapas de la transcripción

El estudio de este proceso se ha dividido clásicamente en cinco etapas: la iniciación, la elongación y la terminación, así como los eventos previos a la iniciación (preiniciación) y los posteriores a la terminación (posterminación). Aunque en líneas generales el proceso es muy similar en procariontes y eucariontes, existen diferencias notables en cuanto al número de proteínas que participan, así como en los mecanismos de etapas específicas del proceso.

La fase más compleja es la preiniciación, en la cual se produce el reconocimiento del promotor por proteínas accesorias y el reclutamiento de la ARN polimerasa hacia ese sitio. En la iniciación se produce la apertura del ADN y la enzima coloca los primeros nucleótidos, después de lo cual pasa al modo de elongación. Esta es la fase más larga y depende de la longitud del gen que se transcribe; en eucariontes se van originando eventos simultáneos a la polimerización. La terminación ocurre gracias a la existencia de señales moleculares y proteínas específicas. En unos casos, simultáneo con la elongación, y en otros con posterioridad a la terminación, los transcritos primarios son procesados hasta hacerlos totalmente funcionales. En los eucariontes todo este proceso ocurre en el núcleo y como en estos organismos muchos de los ARN realizan sus funciones en el citoplasma, deben ser transportados hacia allá.

En primer lugar se hará una breve reseña del proceso en procariontes, tomando como modelo la *E. coli* y más adelante se tratará la transcripción en eucariontes, donde se ha producido un extraordinario avance en los últimos años.

Transcripción en procariontes

La transcripción en *E. coli*, que es el organismo procarionte donde el proceso ha sido más estudiado, es más simple que la duplicación y una sola enzima es suficiente para la realización de todo el proceso. Se comienza por describir las características estructurales y funcionales de la enzima para no interrumpir la secuencia de los eventos moleculares.

La enzima ARN polimerasa, dependiente de ADN de la *E. coli*, presenta una estructura muy compleja que le permite realizar numerosas funciones. Esta enzima debe realizar múltiples acciones para llevar adelante la transcripción: reconocer el sitio de comienzo de la cadena de ARN que se debe sintetizar en una doble hebra de ADN, para lo cual debe identificar una secuencia de bases específica, debido a las irregularidades de la estructura del ADN en esa zona del genoma; colocar cada nucleótido en su posición correcta, de acuerdo con la secuencia de bases del ADN; realizar la síntesis total de la molécula de ARN desde el principio hasta el final; reconocer las señales que indica el lugar apropiado para la terminación del proceso; además, debe reconocer sitios reguladores tanto en el ADN como en el ARN transcrito, y poder interactuar con factores proteínicos y pequeñas moléculas que modulan la actividad de la enzima en su recorrido sobre el ADN.

La ARN polimerasa de *E. coli* está constituida por cinco subunidades: dos subunidades α; una β; una β'; una ω y una σ, de 70 kD, para un total de más de 450 kD. Es una de las mayores enzimas conocidas. Cada célula bacteriana contiene aproximadamente 3 000 moléculas de la enzima.

Diversos procedimientos experimentales permiten afirmar que la subunidad β se relaciona con la unión de los ribonucleótidos sustratos y de los inhibidores de la polimerización, así como la subunidad β' en la unión con el ADN. Ambas subunidades contienen un ion Zn^{2+} por molécula. La función de la subunidad α se relaciona con el ensamblaje de la enzima. Ninguna de las subunidades presenta actividad catalítica, ni de unión con el ADN en ausencia de las otras. La subunidad σ se disocia fácilmente de la holoenzima y el núcleo queda constituido por el resto de las subunidades.

Recientemente se ha reportado la existencia en la *E. coli* de, por lo menos, cinco subunidades σ diferentes. Cada una de estas subunidades participa en la transcripción de genes o grupos de genes específicos.

La holoenzima presenta una forma más bien alargada, con una longitud máxima de 25 nm, es lo suficientemente grande para entrar en contacto con casi 75 pares de bases del ADN, sin embargo, el núcleo solo presenta 10 nm de longitud, que le permiten cubrir aproximadamente 30 pb.

El núcleo de la enzima tiene gran afinidad por el ADN y se une a este fuertemente en cualquier lugar de la cadena.

Eventos previos a la iniciación (preiniciación)

Los eventos de preiniciación consisten en la localización, por parte de la ARN polimerasa, de un sitio específico del ADN y la separación de las dos cadenas, de forma que la secuencia de bases sea accesible a la enzima.

Por convención se representa la hebra de ADN, que no es copiada, y se designa como la hebra codificante por ser muy parecida, en su secuencia, al ARN, esta se debe escribir de izquierda a derecha en el sentido 5' → 3'. La otra hebra se denomina molde porque esa es precisamente su función. La primera base que se transcribe, se toma como referencia y se designa como +1 (SIT). Las escritas a su izquierda llevan números negativos y las que van hacia la derecha, números positivos –la posición cero no existe. Por ejemplo:

5'--- G C T A T A A T G T G T G G A G C A T T G---3'
-10 -5 +1 +5

Se tiene presente que si en la secuencia escrita a partir de la adenina +1 se sustituyen las T por U, se obtiene la secuencia del ARN transcrito primario.

El elemento central en la regulación de la transcripción es el promotor, que se define como un segmento de ADN donde se produce la unión de la ARN polimerasa y su posterior activación para iniciar la transcripción. Asimismo, el promotor contiene en sí o en sus alrededores, otras señales que controlan la unión específica de proteínas reguladoras. Estas proteínas modulan la efectividad de la unión de la polimerasa con el promotor. Para designar la efectividad que tiene la transcripción en los diferentes promotores, se utiliza el concepto de fortaleza del promotor, de donde se derivan los promotores fuertes (muy efectivos) y débiles (poco efectivos).

Al parecer, el reconocimiento entre la ARN polimerasa y el promotor se debe a la presencia de un grupo de donantes y aceptores de puentes de hidrógeno, orientados específicamente, que interactúan con grupos similares en el dominio de unión de la enzima; estos determinan la especificidad del reconocimiento. A la estabilidad contribuyen otras interacciones menos específicas, pero más fuertes, como las interacciones iónicas entre las cargas negativas de la parte monótona de la estructura del ADN y residuos básicos del dominio de unión de la proteína, y quizás interacciones hidrofóbicas entre el metilo de la timina y grupos apolares de la superficie de la enzima.

En este momento es conveniente hacer la distinción entre dos términos que se utilizarán frecuentemente y se refieren a las secuencias consenso y las conservadas, ambas derivan del análisis de sectores homólogos del ADN. Las secuencias consenso se construyen a partir de las bases que ocupan una determinada posición, en la mayoría de los casos estudiados, aunque como tal no exista en ninguno de ellos. Las conservadas son las secuencias que aparecen completas en la mayor parte de los casos estudiados, luego son reales. Las secuencias consenso en general solo existen como posibilidad (Fig. 27.2).



Fig. 27.2. Secuencias consenso y conservadas. Las secuencias consenso (a) se obtienen a partir del análisis de un número de secuencias de sectores equivalentes del ADN y no siempre existen en la realidad. Las secuencias conservadas (b) son aquellas que se mantienen casi inalterables en todos los organismos analizados.

En los promotores conocidos se distinguen dos importantes secuencias consenso: la primera aparece alrededor de la posición -10 y tiene la estructura TATAATG. La otra secuencia importante aparece alrededor de la posición -35 y contiene típicamente ocho pares de bases, por ejemplo, TGTTGACA, donde existe un predominio de pares AT. La distancia entre las posiciones más conservadas de -10 y -35 es por lo general 17 (±1). En la figura 27.3 se muestra la estructura primaria de algunos promotores.



Fig. 27.3. Estructura del promotor. Se muestra la secuencia del promotor de tres operones. En azul, la secuencia de 35 que parece estar muy conservada. En rojo, la región 10 con su secuencia consenso TATAAT. La letra roja corresponde con el primer nucleótido en ser transcrito, que generalmente es A.

La fortaleza de los promotores se relaciona con estas características. Si la secuencia se asemeja más al consenso, la fortaleza del promotor aumenta, y disminuye en la medida que se hace más diferente. La distancia entre las secuencias que da la mayor fortaleza es de 17 pb.

La subunidad σ, al unirse al núcleo de la polimerasa, aumenta la afinidad por estas secuencias, de manera que permite a la enzima unirse a esta zona específica del ADN. Se cree que la unión se produce primero en la zona de -35 y después en la otra más cercana, pero ambas son indispensables.

La unión de la polimerasa en el sitio adecuado provoca un desenrollamiento local del ADN (favorecido por el elevado contenido de pares AT) que incluye aproximadamente las bases de -10 a +5. Esta estructura es muy estable y se denomina promotor abierto (Fig. 27.4).

Una vez formado el promotor abierto, la enzima comienza a deslizarse sobre el ADN hasta arribar a la primera base que va a ser copiada (SIT). En ocasiones, para la unión de la polimerasa con el sitio adecuado se requieren proteínas adicionales (capítulo 34).

En resumen, los eventos de preiniciación comprenden el reconocimiento de señales específicas, la unión ADN-enzima formando un promotor cerrado y su transformación posterior en un promotor abierto, y el desplazamiento de la enzima hasta la posición +1 para dar comienzo al proceso.

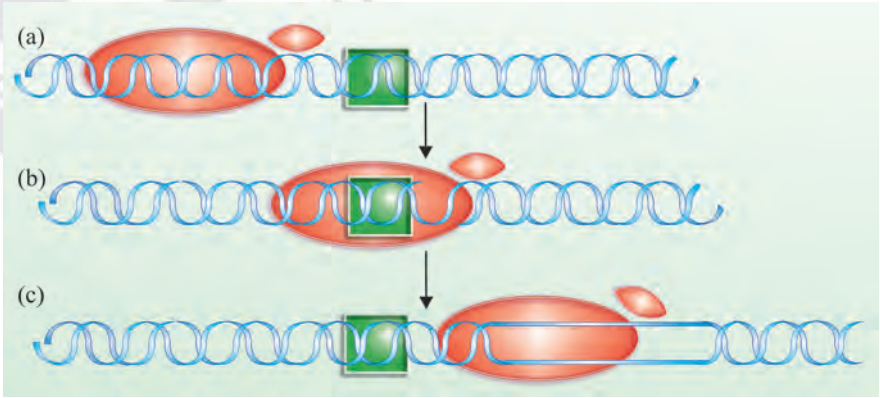


Fig. 27.4. Unión de la ARN polimerasa al promotor. Para realizar la unión al promotor: (a) la ARN polimerasa rastrea la señal sobre el ADN, (b) hasta localizar el promotor al cual se une firmemente y (c) logra una desnaturalización limitada que permite el acceso a la secuencia de bases de la hebra molde.

Iniciación

La iniciación de la transcripción comienza con la unión al complejo, formado por la polimerasa y el promotor abierto del ribonucleósido trifosfato que formará el extremo 5'P de la cadena naciente de ARN. La unión del segundo nucleótido y la formación del enlace fosfodiéster también constituyen parte de la iniciación, por tanto, consiste en la formación de un complejo ternario entre la polimerasa, el ADN y un segmento de ARN, lo suficientemente largo para que el complejo sea estable y no se disocie.

La ARN polimerasa contiene dos sitios de unión para nucleósidos trifosfatados, que se denominan sitios de iniciación y de elongación. El primero une frecuentemente nucleótidos de purina (93 % en una serie estudiada), casi siempre ATP (52 % en la misma serie); luego, la primera base en ser copiada es casi siempre la timina, que ocupa la posición +1 en nuestro ejemplo. Una vez formado el par AT se incorpora otro nucleósido trifosfatado al sitio de elongación; solo se incorporará aquel capaz de formar un par con la base +2, por ejemplo, la citosina (Fig. 27.5).

Cuando los dos sitios están ocupados, se produce la reacción y se forma el primer enlace fosfodiéster. Inmediatamente después se produce el movimiento de la polimerasa hacia el nucleótido siguiente. El final de la iniciación está determinado por la separación del factor σ y la formación de un complejo ternario estable. Se creía que la separación de σ ocurría con la formación del primer enlace fosfodiéster, pero estudios posteriores demostraron que para ello se requiere la incorporación de seis a nueve nucleótidos (Fig. 27.6).

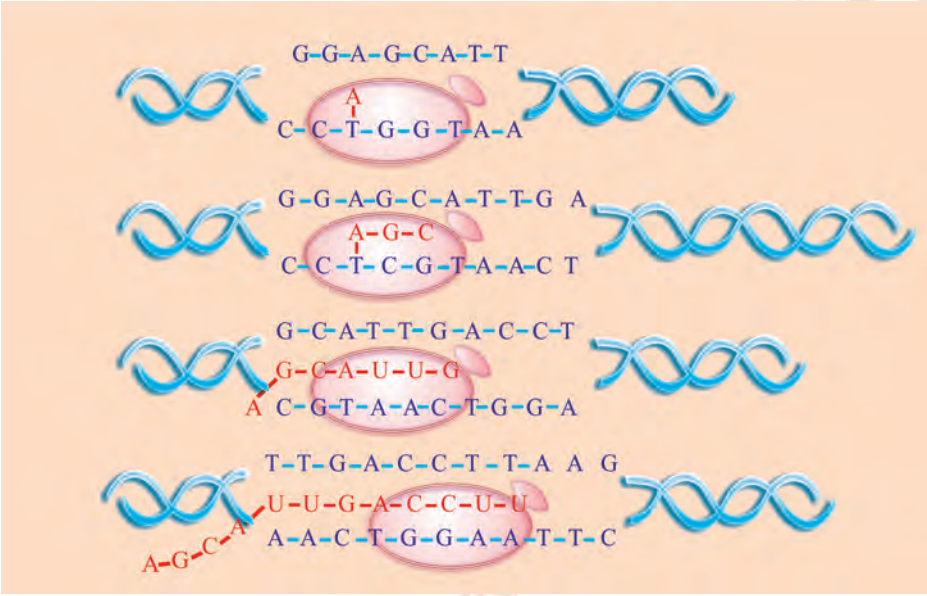


Fig. 27.5. Iniciación. Una vez formado el promotor abierto, la polimerasa comienza a unir los nucleótidos, dirigida por una de las bandas del ADN. Cuando la cadena contiene de seis a ocho nucleótidos, se separa la subunidad σ y solo continúa actuando el núcleo de la polimerasa.

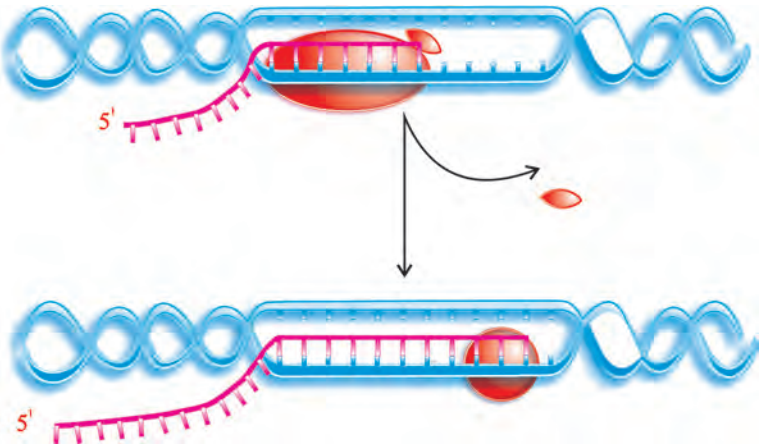


Fig. 27.6. Final de la iniciación. Al separarse la subunidad σ, se produce un cambio de conformación en la polimerasa que reduce sus dimensiones, lo que hace que el número de bases cubierto por la enzima sea mucho menor.

Elongación

Una vez liberado el factor σ, la polimerasa adquiere una nueva conformación y se forma un complejo ternario (polimerasa: ADN: ARN naciente) que es muy estable.

La reacción de elongación comprende los pasos siguientes:

1. Unión a la enzima del nucleósido trifosfato sustrato, es específica tanto para la base como para la ribosa.
2. Ataque nucleofílico del P(α) al extremo 3'OH de la cadena naciente, con la formación del enlace fosfodiéster, que genera pirofosfato.
3. Liberación del pirofosfato de la enzima, que es hidrolizado por las pirofosfatasas.
4. Desplazamiento de la polimerasa a lo largo del ADN en un nucleótido, con el desenrollamiento por delante y el reenrollamiento por detrás.

La zona de elongación tiene una longitud constante de 17 pb, lo que sugiere que esto se debe a una propiedad de la enzima y no a la secuencia de bases del ADN. La velocidad promedio de la elongación se encuentra en el rango de 30 a 60 nucleótidos por segundo (Fig. 27.7).

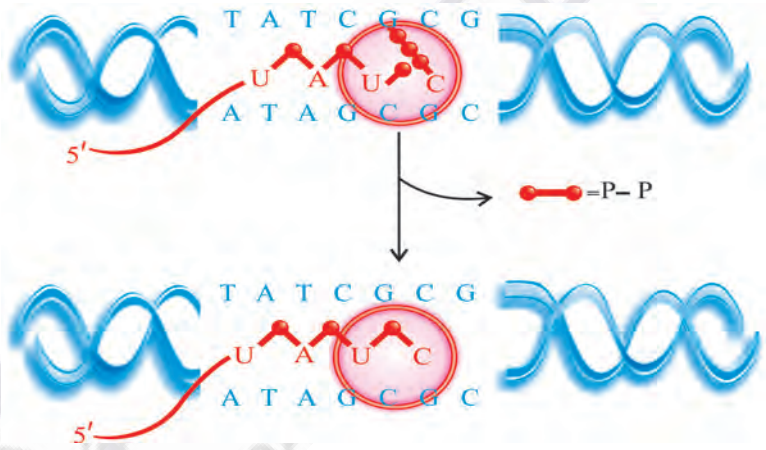


Fig. 27.7. Elongación. Un nucleósido trifosfato, cuya base es complementaria a la del molde, es colocado en el sitio de elongación; se forma el enlace fosfodiéster con la liberación de PP y la polimerasa avanza hacia el próximo nucleótido. Estos eventos se repiten tantas veces como nucleótidos tenga el gen que se está transcribiendo.

Un detalle interesante es que el desplazamiento de la polimerasa no se produce a una velocidad constante; existen zonas en las que el desplazamiento es más rápido que en otras, incluso, hay pausas donde la enzima se detiene totalmente, estas pausas se relacionan con las zonas ricas en pares CG.

Durante esta fase, al núcleo de la polimerasa se une la proteína NusA, la que al parecer evita la terminación prematura de la cadena.

En la elongación se forma un híbrido ADN:ARN, de aproximadamente 12 pares de bases. En la medida que la polimerasa avanza, el ADN se vuelve a enrollar detrás de ella.

En resumen, la elongación consiste en el aumento gradual de la cadena polirribonucleotídica, por acción fundamentalmente del núcleo de la ARN polimerasa. El complejo de la ARN polimerasa, al moverse sobre el ADN, se estabiliza por proteínas auxiliares que impiden la dislocación de la enzima.

Terminación

La terminación de la síntesis del ARN ocurre en sitios de secuencia de bases específicas en la molécula del ADN. Se conocen muchas de estas secuencias y todas tienen las características que se muestran en la figura 27.8.

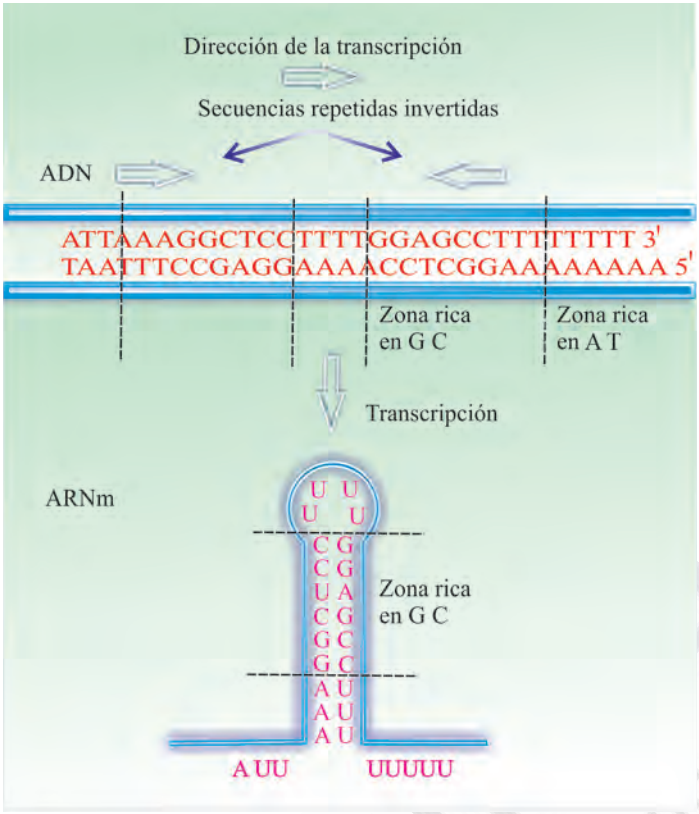


Fig. 27.8. Señal de terminación. Las características de la secuencia del ADN en la zona de terminación pueden dar lugar a una estructura cruciforme (no representada) en el ADN y a una estructura en forma de horquilla de pelo (parte inferior) en el ARN transcrito.

Existen tres regiones importantes:

– Una secuencia repetida-invertida, con un segmento no repetido central, o sea, la secuencia en una hebra del ADN sería del tipo:

ABCDFG....ZZYYZZ.....G'F'E'D'C'B'A'

donde: A y A', B y B' y las demás son bases complementarias. De esta manera la secuencia es capaz de formar pares de bases intracatenarios, dando lugar a una estructura en forma de horquilla de pelo en el ARN y posiblemente también en el ADN.

– Una secuencia rica en CG muchas veces se localiza dentro de la horquilla, aunque puede encontrarse parcialmente dentro del asa.

– Es usual que se presente a continuación una secuencia rica en AT, que sale fuera de la horquilla y hace que el ARN contenga una adenina, seguida por 4 a 8 uridinas.

Todo parece indicar que la formación de la estructura en forma de horquilla, en la molécula del ARN, está implicada notablemente en el mecanismo de la terminación. Se ha comprobado que mientras mayor sea su contenido de pares GC y mayor la longitud de la cola de poli(U), la terminación será más efectiva.

No se conoce con exactitud cómo se produce la terminación, pero parece estar relacionada con una pausa en el movimiento de la polimerasa. El proceso incluye: el cese de la elongación de la cadena de ARN, la liberación del ARN recién formado y la liberación de la ARN polimerasa del ADN (Fig. 27.9). En el proceso de terminación intervienen proteínas específicas, cuya acción no está totalmente esclarecida.

Existen dos tipos de mecanismos de terminación: la señalada con anterioridad, que es reconocida por la propia polimerasa, y la que ocurre por la acción de una proteína

específica, denominada rho (ρ); esta es una proteína oligomérica que se une al ARN y se mueve sobre este utilizando la energía de hidrólisis de nucleósidos trifosfatados. La proteína rho está formada por seis subunidades de 46 kD cada una, cuya agregación se estabiliza por la unión al ARN en presencia de ATP; cada monómero se une a un segmento de 12 a 14 bases, por lo que en total se unen de 72 a 84 bases (Fig. 27.10).

En resumen, la terminación incluye el detenimiento de la elongación, la liberación del ARN y de la polimerasa. En ocasiones son necesarias secuencias específicas del ADN y en otras se requieren proteínas específicas.

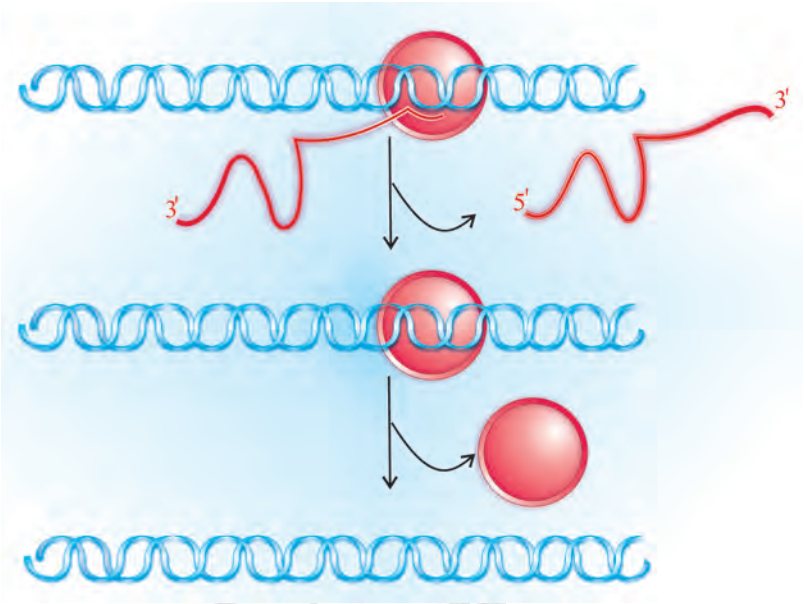


Fig. 27.9. Terminación: consta de los pasos siguientes: cese de la elongación, separación del ARN neoformado y separación de la ARN polimerasa.

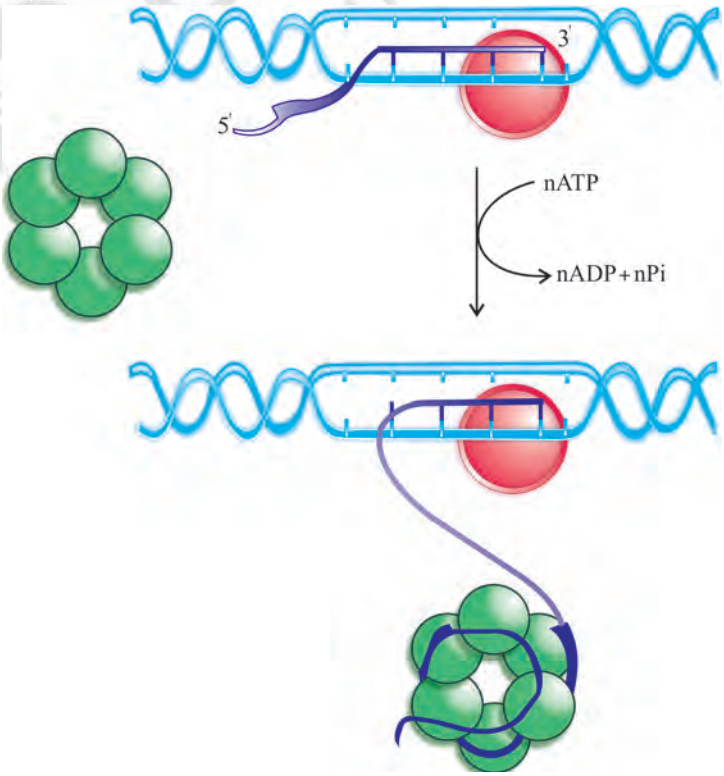


Fig. 27.10. Unión de rho (ρ) al ARN. El factor rho se une a una secuencia específica del ARN, lo cual estimula su acción hidrolítica y provoca la terminación de la transcripción.

Eventos posterminación

En procariontes los distintos tipos de ARN sufren diferentes grados de modificación, antes de ser totalmente funcionales. A continuación se tratará de forma somera este proceso, que se denomina maduración.

Los ARN mensajeros no sufren modificaciones. La estructura típica de un mensajero contiene cuatro sectores funcionalmente diferentes. Una secuencia inicial hacia el extremo 5', conocida como secuencia conductora, que contiene una zona rica en purinas (la secuencia de Shine Dalgarno) y un triplete de bases específico, el AUG, denominado también codon de iniciación (Fig. 27.11).

Hacia el extremo 3' contiene también una secuencia de longitud variable, conocida como secuencia de terminación. Un tercer tipo de sector está constituido por las secuencias codificadoras, aquellas que contienen la información para la síntesis de polipéptidos específicos.

La figura 27.12 resume las principales características estructurales de los ARNm de procariontes.

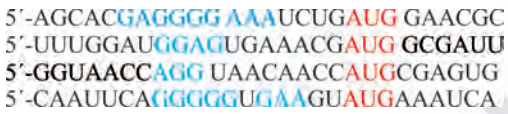


Fig. 27.11. Extremo 5' del ARNm de procariontes. Hacia el extremo 5' del codon de iniciación (en rojo) aparece una zona rica en purinas, conocida como secuencia de Shine y Dalgarno, y es la que va a permitir la fijación del ARNm al ribosoma en la posición precisa.

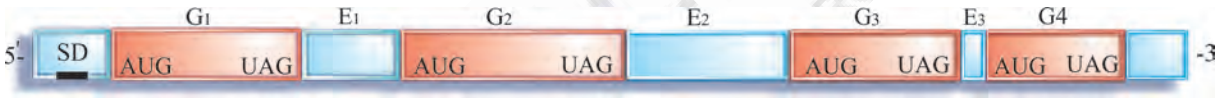


Fig. 27.12. Estructura de un ARNm policistrónico. Los ARNm de procariontes son policistrónicos, contienen la información para varias cadenas polipeptídicas (G1, G2, G3 y G4), cada una de las cuales presenta su codón de iniciación (AUG) y de terminación (UAG), separados por secuencias espaciadoras (E1, E2 y E3), la zona conductora hacia el extremo 5' que contiene la secuencia de Shine y Dalgarno (SD), así como la zona no traducible del extremo 3'OH.

Los ARN mensajeros de procariontes contienen típicamente información para varias cadenas polipeptídicas, por lo que reciben el nombre de policistrónicos.

Entre las secuencias codificadoras se encuentran zonas de longitud variable, conocidas como espaciadores. Los ARN policistrónicos tienen una longitud típica de 3 000 a 8 000 bases.

En cuanto a los demás tipos de ARN, su síntesis no difiere de la del mensajero, pero algunos hechos indican que ni los ARNt ni los ARNr son los transcritos primarios (productos inmediatos de la transcripción), como son:

- El extremo 5' presenta un nucleosidomonofosfato y no un trifosfato, como cabe esperar de un transcrito primario.
- Los ARNt y los ARNr son mucho más cortos que los transcritos primarios.
- Todos los ARNt contienen bases raras que no aparecen en las moléculas recién sintetizadas.

Todos estos cambios se realizan después de la transcripción, en un proceso que se conoce como modificaciones postranscripcionales o maduración.

Maduración de los ARNt

Los ARNt se sintetizan como precursores más largos, que se acortan y se modifican.

El ARNt mejor conocido es el que transfiere tirosina, que está formado por 85 nucleótidos. La *E. coli* tiene dos genes para este ARNt, que están adyacentes y presentan dos secuencias idénticas de 350 bases, cada una con un espaciador de 200 nucleótidos. Los dos genes son transcritos en un solo ARN, que es cortado cuando se ha completado su síntesis.

En primer lugar ocurre la transformación del extremo 3' por la eliminación de las bases en varios pasos enzimáticos, hasta dejar solo dos nucleótidos después del CCA; luego se eliminan las bases anteriores al extremo 5', quedando este formado. La enzima ribonucleasa P (ARNasa P) hidroliza la molécula en el lugar adecuado, ya que reconoce su estructura tridimensional en esta zona; inmediatamente, la misma enzima elimina los dos nucleótidos sobrantes del extremo 3', con lo cual la molécula adquiere su tamaño definitivo. Por último, se produce la modificación de las bases nitrogenadas en sitios específicos y se forman la seudouridina, la tiouridina, la metilguanosina y la isopenteniladenosina (Fig. 27.13).

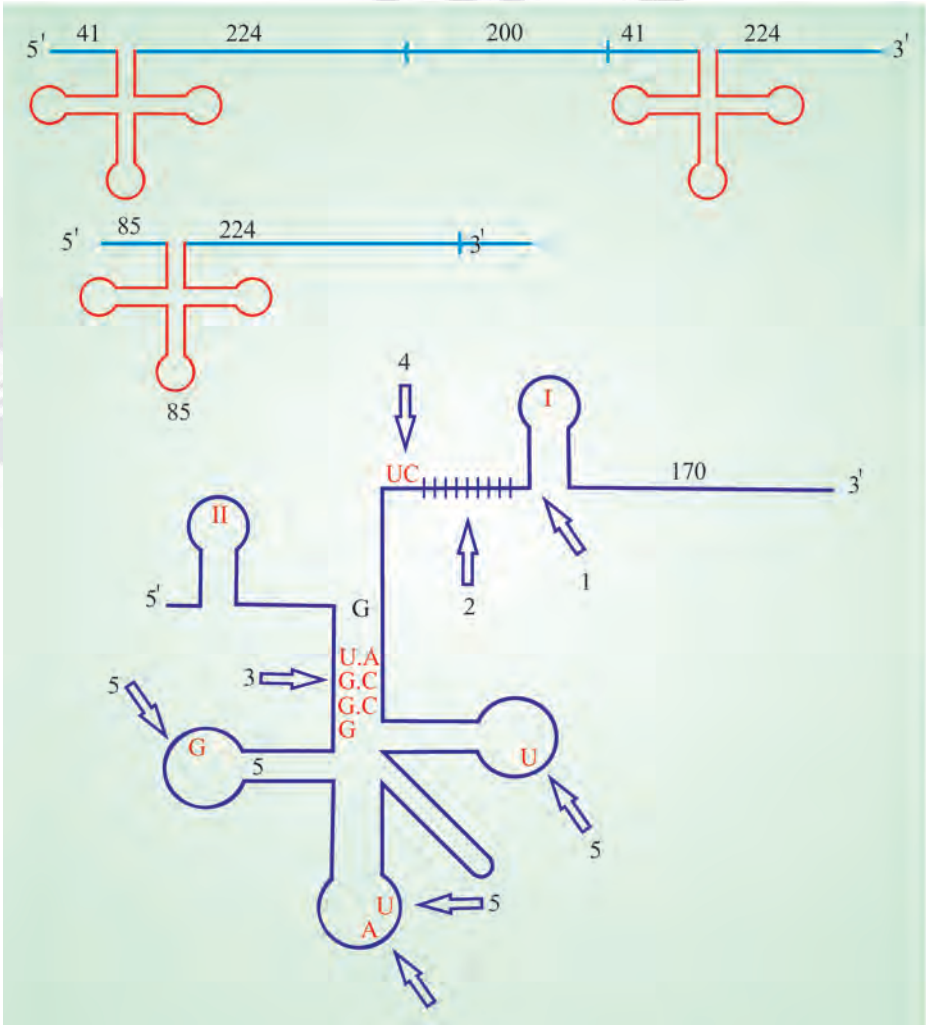


Fig. 27.13. Maduración del ARNt. Los pasos que se indican en el esquema se explican detalladamente en el texto.

Maduración de los ARNr

Los ARN ribosomales se sintetizan como un ácido nucleico único que después es cortado y modificado hasta obtener cada tipo particular. Los ribosomas bacterianos contienen tres tipos de ARN, conocidos como ARNr de 5 S, 16 S y 23 S, los cuales contienen 120, 1 541 y 2 904 nucleótidos, respectivamente. Estas moléculas, junto con las de algunos ARNt, son sintetizadas en un precursor que contiene más de 5 000 nucleótidos.

El transcrito primario se va hidrolizando en la medida que se va formando por un conjunto de enzimas del tipo de las endonucleasas y exonucleasas.

Las características más sobresalientes de la maduración en procariontes se resumen en los aspectos siguientes:

1. Todos los ARNt y ARNr son procesados, no así los ARNm.
2. Se requieren cerca de 10 tipos de ARNasa que generan tanto el extremo 3'OH como el 5'P.
3. Las ARNasas reconocen preferentemente las estructuras tridimensionales, más que las secuencias de bases.
4. Las bases raras se forman por la transformación enzimática de las comunes.

Transcripción en eucariontes

En el capítulo 24 se estudió la estructura de los genes de eucariontes. Es bueno recordar que presentan una zona de regulación y una de codificación. La zona esencial de regulación para proceder a la transcripción es el promotor.

El promotor es la zona que controla la expresión del gen y generalmente se encuentra adyacente al mismo, hacia el extremo 5'. El promotor consta de varias secuencias de 6 a 8 nucleótidos, que son sitios de unión de las proteínas que intervienen en la fase de iniciación de la transcripción. Esas proteínas se denominan factores de transcripción.

Características generales

La transcripción en eucariontes se torna compleja, debido a varios factores: primero, la organización estructural de los genes; segundo, el hecho de que el ADN esté íntimamente relacionado con proteínas, formando la cromatina y su unidad estructural, el nucleosoma; tercero, la especialización de las ARN polimerasas y su compleja estructura; cuarto, la participación de numerosas proteínas, denominadas factores de transcripción, que intervienen en diferentes momentos del proceso, especialmente en la transcripción de los genes que codifican proteínas, y quinto, el proceso se lleva a cabo en el espacio reducido del núcleo celular. El primer aspecto ya fue tratado en el capítulo 24, por eso, en este solo se hará referencia a los cuatro restantes.

La estructura de la cromatina constituye un factor decisivo para la transcripción. En ocasiones, los promotores se encuentran sobre la superficie de los nucleosomas y no son accesibles a los factores de transcripción. También representan un obstáculo físico para el avance de las ARN polimerasas durante la fase de elongación. Esto se resuelve gracias a la participación de estructuras multiproteínicas, denominadas complejos remodeladores de la cromatina (CRC), que al utilizar la energía del ATP pueden modificar la estructura, la composición o la posición de los nucleosomas, y permitir el acceso de la maquinaria molecular de la transcripción al ADN. Estas dos variantes se muestran en la figura 27.14.

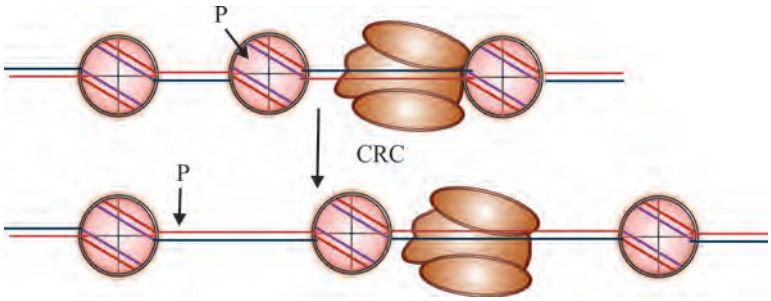


Fig. 27.14. La cromatina en la transcripción. La organización de la cromatina puede traer como consecuencia que un promotor (P) se encuentre sobre la superficie de un nucleosoma inaccesible a la maquinaria molecular de la transcripción o un obstáculo para el avance de la ARNPII. Los complejos remodeladores (CRC) de la cromatina pueden desplazar los nucleosomas y favorecer el proceso.

Los eucariontes contienen tres ARN polimerasas (ARNP) nucleares, denominadas ARNPI, ARNPII y ARNPIII, que están formadas por 14, 12 y 17 subunidades respectivamente, con una masa molecular de 500 a 700 kDa. Estas subunidades se numeran en orden decreciente de su masa molecular. Recuérdese que en un inicio las enzimas fueron nombradas A, B y C, y aunque esa nomenclatura no se conserva, es la que se emplea para las subunidades. Así, las subunidades mayores de las ARNPI, ARNPII y ARNPIII se denominarían Rpa1, Rpb1 y Rpc1, respectivamente.

En general, las ARNP tienen una forma de "muela de cangrejo", consistente en cuatro módulos grandes y rígidos, el núcleo y los otros tres, que por analogía con su forma se denominan: el saliente, la abrazadera y la mandíbula, con pequeños dominios como apéndices. El núcleo y el saliente constituyen la parte central de las ARNP, entre los cuales se forman dos canales: primario y secundario. Los módulos de abrazadera y mandíbula sobresalen del núcleo y el saliente respectivamente, como los brazos de una muela de cangrejo, y forman parte del canal primario. Mientras el canal primario es mayor y sirve como sitio de unión del ácido nucleico, el secundario es menor y presumiblemente es el sitio de entrada de los nucleósidos trifosfatados.

Además, para realizar su función las ARNP necesitan el concurso de numerosas proteínas durante todo el proceso de la transcripción. En la preiniciación, proteínas denominadas factores de transcripción son necesarias para el reconocimiento del promotor y el reclutamiento de la enzima. En el caso de ARNPII son dos los tipos de factores de transcripción: los necesarios para la transcripción de cualquier gen, que por eso se denominan factores generales de transcripción, y los que solo se utilizan en un grupo de genes, o sea, factores de transcripción génico-específicos. También se requiere el concurso de proteínas adicionales durante la elongación y la terminación.

El confinamiento del proceso al limitado espacio del núcleo representa una restricción espacial para su desarrollo.

A continuación se describirá cómo se lleva a cabo el proceso por cada una de las polimerasas.

Transcripción por la ARN polimerasa I

La ARN polimerasa I transcribe los genes de los ARN ribosomales de 28 S, 5,8 S y 18 S, que forman parte de la estructura de los ribosomas: los dos primeros de la subunidad mayor y el tercero de la menor, de ahí que la actividad de la ARN polimerasa I esté estrechamente vinculada con la biogénesis de los ribosomas. Este proceso se incrementa cuando la célula está en situaciones de riqueza de nutrientes, mientras que disminuye cuando estos son escasos. Por su parte, la biogénesis de los ribosomas se relaciona con el crecimiento celular (ver capítulo 29).

Por todo lo anterior, no es extraño que el proceso de transcripción por la ARN polimerasa I esté regulada por las condiciones celulares y su actividad esté coordinada con las ARNPII y ARNPIII.

La ARNPI sintetiza más del 50 % del ARN celular total en células en crecimiento activo. Se trata de una enzima compleja, formada por 14 subunidades: cinco de ellas comunes a las tres polimerasas, dos subunidades compartidas con ARN polimerasa III y siete subunidades exclusivas.

Las células humanas contienen ~400 copias de repeticiones de ADN ribosomal, distribuidas en el brazo corto de cinco cromosomas (13, 14, 15, 21 y 22). Cada repetición es transcrita en el nucléolo por la ARNPI, sintetizándose el ARNr precursor de 45 S en seres humanos, que es procesado en los ARNr de 18 S, 5,8 S y 28 S maduros (ver capítulo 29). La transcripción por la ARNPI se ha podido visibilizar mediante el microscopio electrónico y se muestra con una silueta similar a un árbol de navidad (Fig. 27.15).

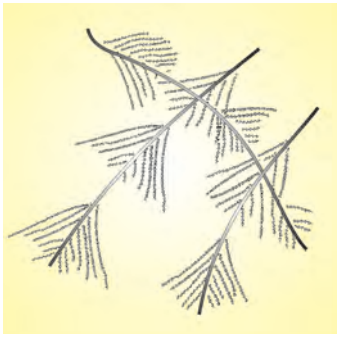


Fig. 27.15. Transcripción de genes organizados en tándem. La figura simula una microfotografía electrónica. Cuando un gen se encuentra repetido en el genoma y está organizado en tándem, o sea, uno a continuación del otro, al producirse la transcripción con numerosas polimerasas, es posible observar una imagen arborescente.

La estructura de la cromatina influye sobre el estado activo o silente de los genes ADNr y solo una porción de ellos es transcrita en cada momento. La mayoría de las unidades génicas ribosomales consiste en una unidad de transcripción que contiene las secuencias de los ARNr maduros, secuencias espaciadoras internas (ITS) y externas (ETS), separadas por secuencias intergénicas (IGS).

El promotor de los genes de tipo I se encuentra adyacente a la zona de codificación hacia el extremo 5' de la unidad de transcripción. Contiene dos elementos de regulación: un elemento proximal, denominado CP (del inglés *core promoter*), que se superpone con el sitio de inicio de la transcripción (SIT), y uno distal, nombrado UCE (del inglés *upstream control element*) aproximadamente a 100 pb del SIT.

La iniciación por la ARNPI requiere, al menos, de tres factores de transcripción. El UBF (*upstream binding factor*) es una proteína homodimérica que se une al UCE y va provocando una flexión en el ADN, cercana a los 180º, de manera que se produce un acercamiento entre los dos módulos del promotor. La formación de esta estructura favorece la unión del factor SL-1 (del inglés *Selective factor*) al sitio CP. El SL-1 está integrado por la proteína TBP (del inglés *TATA binding protein*) y otros cinco polipéptidos, conocidos como TAFI (*TBP associated factors* de la polimerasa I). SL-1 recluta a la ARNPI hacia el promotor.

Otra proteína, denominada factor intermediario de iniciación de la transcripción IA, TIFIA (del inglés *transcription iniciation factor*) se asocia al SL-1 y a la enzima. Por último se incorpora el TFIIH (un factor común con la polimerasa II) que contiene subunidades con actividad de helicasa, necesarias para la apertura de la doble hélice del ADN y para permitir que la polimerasa tenga acceso a la secuencia de bases que debe copiar. El TIFIA está asociado a RNAPI, por lo menos hasta que se produzca la formación del primer enlace fosfodiéster, luego de lo cual abandona a la enzima. Se discute si los otros factores de transcripción permanecen unidos al promotor, con lo cual facilitarían una nueva ronda de transcripción.

La elongación transcurre a velocidad variable y al parecer sin requerir factores de elongación. La enzima sintetiza un ARN de 45 S, que luego es procesado y da lugar a los tres ARNr. Un resumen de la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa I se muestra en la figura 27.16.

La ARNPI concluye la síntesis en el terminador principal, que se localiza después de la secuencia del precursor del ARNr y requiere del reconocimiento del terminador por factores proteínicos específicos. En los seres humanos el terminador principal (T1) está constituido por una secuencia de 11 pb y es reconocido por TTF-I humano (*transcription termination factor for ARNPI*). Además, los mamíferos requieren un factor de liberación para la formación de extremo 3' del ARNr y la disociación de ARNPI. Este factor ha sido designado PTRF (*Pol I and transcript release factor*) y se asocia con la polimerasa y TTF-I.

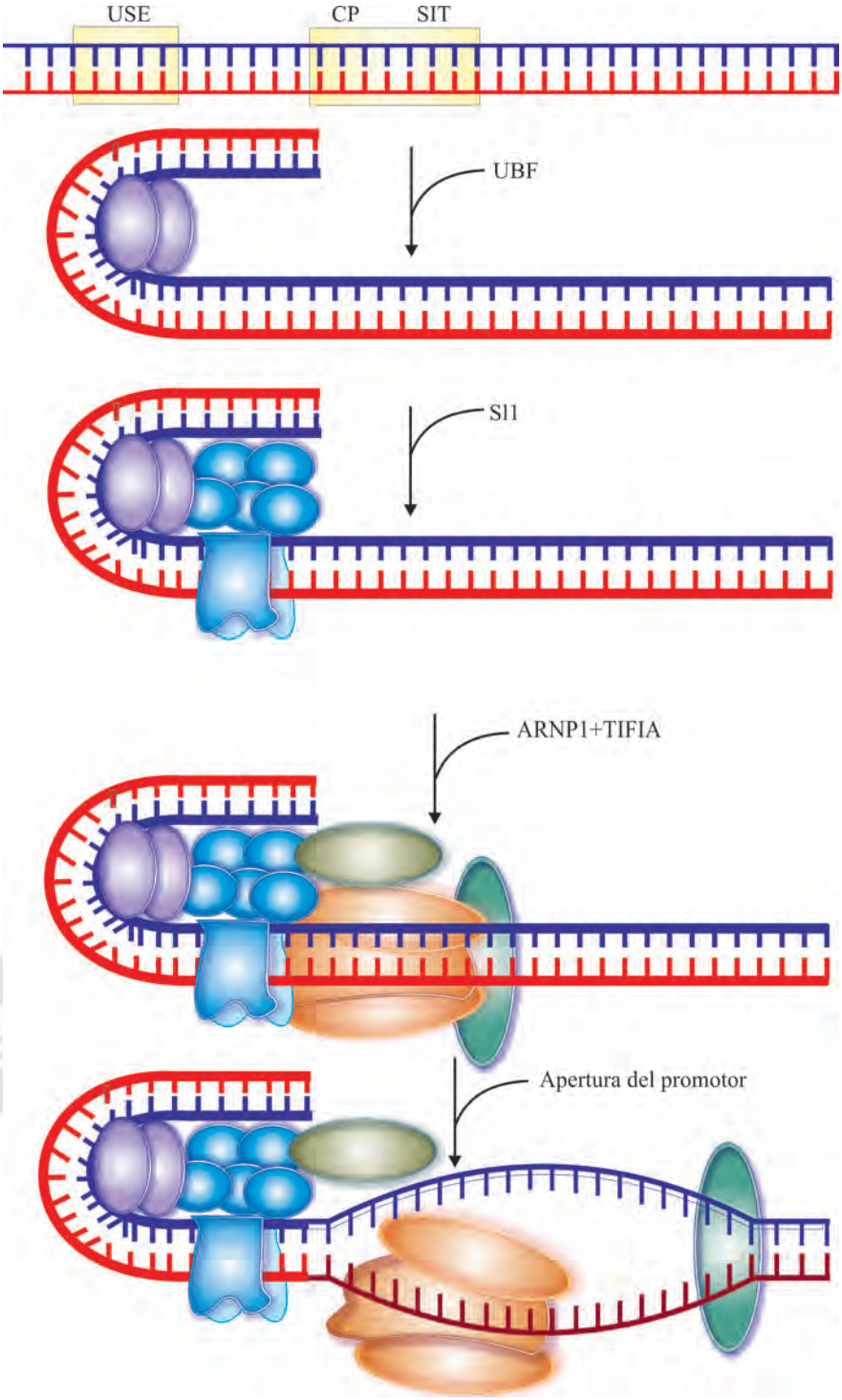


Fig. 27.16. Iniciación por la ARNPI. Al elemento distal del promotor se une UBF que provoca la flexión del ADN y permite la incorporación de SL-1. La ARNPI es reclutada en unión de TIFIA. La incorporación de TFIIH con su actividad de helicasa permite la apertura del promotor y el deslizamiento de la ARNPI hacia el SIT.

Durante la elongación al transcrito primario se van asociando proteínas ribosomales que provocan plegamientos en el ARNr. Estos plegamientos crean estructuras secundarias que son reconocidas por endonucleasas que cortan el ARN hasta darle su tamaño definitivo. El procesamiento de los ARNr y la formación de los ribosomas se estudiarán en el capítulo 29.

Las partículas ribosomales son transportadas a través del complejo del poro nuclear hacia el citoplasma donde realizan su función.

El principal mecanismo de regulación de la transcripción por ARNPI es el acceso al promotor. La célula modifica la estructura de la cromatina, de manera que en momentos favorables aumenta el número de promotores accesibles y en momentos desfavorables disminuye.

Transcripción por la ARN polimerasa II

Los genes de tipo II codifican para numerosos tipos de ARN. Aquí solamente se estudiarán los que codifican proteínas y la transcripción de los mismos da lugar a los ARNm. Por esta razón se hará un estudio más detallado de este proceso.

La enzima. La ARN polimerasa II (ARNPII) es una enzima compleja, formada, al menos, por 12 subunidades, y la subunidad mayor (Rpb1) es la catalítica. Esta subunidad posee un dominio C-terminal (CTD) que presenta características especiales y es único entre las tres polimerasas.

El CTD está unido flexiblemente al cuerpo de la enzima y consiste en el heptapéptido Tir1–Ser2–Pro3–Tre4–Ser5–Pro6–Ser7 (YSPTSPS), que en los seres humanos está repetido 52 veces. El CTD muestra diferentes patrones de fosforilación durante la transcripción. La ARNPII es reclutada hacia el promotor en su forma desfosforilada (ARNPIIA) que es fosforilada intensamente durante la transcripción (ARNPIIO). Al inicio de la transcripción la fosforilación del CTD permite la liberación del promotor y el reclutamiento de los factores formadores del casquete (veáse más adelante).

El promotor. Se han identificado, al menos, ocho tipos de promotores para los genes de tipo II. En este capítulo solamente se estudiará el caracterizado por la secuencia TATA, por el ser el mejor conocido. La secuencia TATA se localiza aproximadamente a 35 nucleótidos a la izquierda (posición -35) del sitio de iniciación de la transcripción y sirve como sitio de unión de los factores generales de transcripción, esto es, un grupo de proteínas que es necesario para la transcripción por la ARNPII. Además, bastante alejados del sitio de iniciación se encuentran otras secuencias que sirven de sitio de unión a factores de transcripción génico-específicos, es decir, que solamente son necesarios para controlar la transcripción de algunos genes.

En este momento es bueno recordar que la zona de codificación está formada por los exones y los intrones (capítulo 24).

La etapa más compleja es la iniciación, pues requiere de un conjunto de proteínas denominadas factores generales de transcripción, que localizan al promotor, reclutan a la polimerasa y provocan la apertura de la doble hélice del ADN. Estos factores de transcripción se abrevian con las letras TF (del inglés, *transcription factors*), seguida del número dos en romanos (II), que indica que son de la polimerasa II, y una letra que indica el orden en el cual fueron descubiertos.

Preiniciación

El proceso comienza cuando una de las subunidades del TFIID, conocida como proteína de unión a TATA, TBP (del inglés *TATA-bindign protein*) se asocia a la secuencia TATA. Esta proteína tiene la forma de una silla de montar y se dispone "a horcajadas" sobre el ADN, lo que provoca una flexión en el mismo. La TBP se separa de esos promotores por la acción combinada del cofactor negativo 2, NC2 (del inglés, *negative cofactor 2*) y el modificador 1 de la transcripción, Mot1 (del inglés, *modifier of transcription 1*), que es una ATPasa dependiente de TBP. A continuación se unen TFIIA y TFIIB, este último determina el sentido de la transcripción.

Los factores TFIIA y TFIIB interactúan con TBP, promueven la formación del complejo de preiniciación (PIC), estabilizan las interacciones entre TBP y el ADN, y contrarrestan los efectos de NC2 y Mot1. A continuación, a la proteína TBP se incorporan los TAF (del inglés *TBP associted factors*), con los cual se completa el TFIID. Se incorpora el TFIIE y el TFIIF, acompañado por la ARN polimerasa, al que le sigue el TFIIH que contiene las helicasas. Este proceso se muestra en la figura 27.17.

En la preiniciación también participa el complejo mediador, que está formado por 30 proteínas, y es importante tanto para la iniciación como para la elongación. Las evidencias experimentales sugieren que el mediador interviene en la transcripción dependiente de activadores, donde funciona como un puente molecular entre la polimerasa II, los factores generales de transcripción y los elementos reguladores existentes en el ADN. El mediador se presenta en dos formas: una que se une fuertemente a la polimerasa II y la otra, al complejo Cdk8/ciclina C. El primero parece actuar como activador y el segundo, como represor. Para algunos autores el mediador es parte de la holoenzima.

Juntos, los factores generales de transcripción actúan como un conjunto de proteínas que reconocen el núcleo del promotor, ensamblan la plataforma iniciadora de la transcripción, reclutan la ARN polimerasa II y facilitan la transición de la polimerasa del modo de iniciación al de elongación.

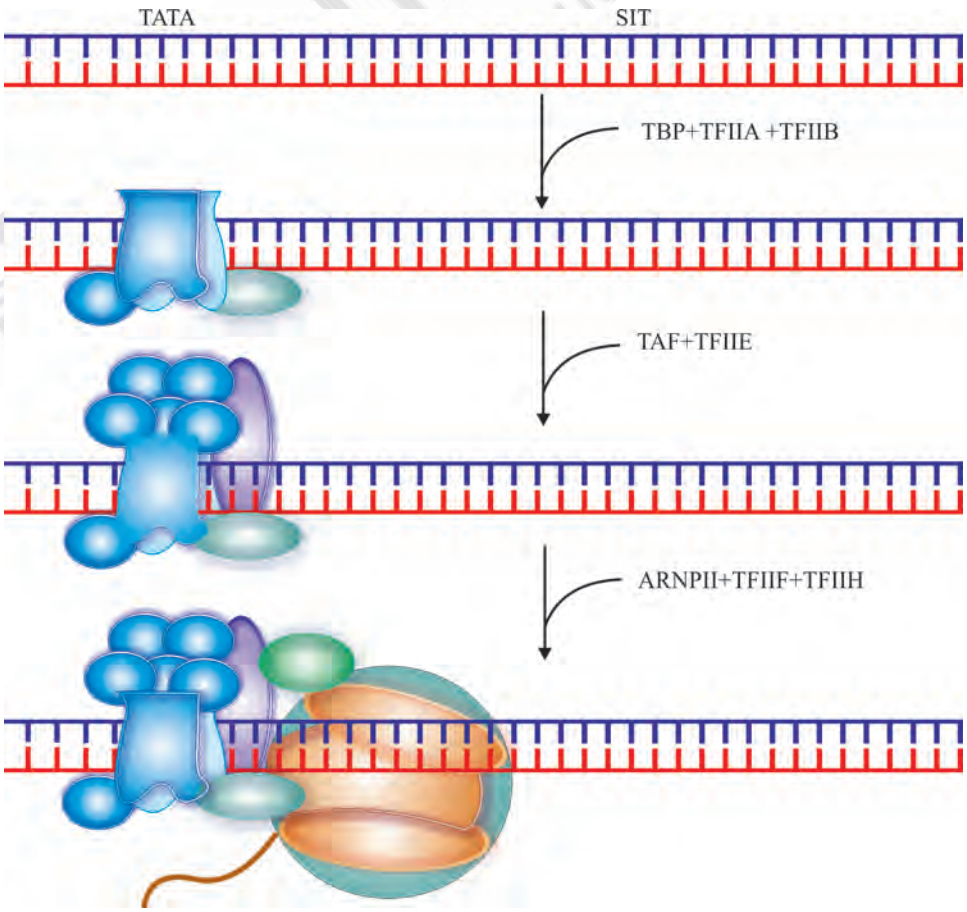


Fig. 27.17. Preiniciación por la ARNPII. La proteína de unión a TATA (TBP) inicia el reconocimiento del promotor. Luego se incorporan TFIIA y TFIIB, que determinan el sentido de la transcripción. Con posterioridad se asocia TFIIE y a continuación la ARNPII reclutada por TFIIF. La incorporación de TFIIH completa la formación del complejo de preiniciación.

Iniciación

La iniciación consta, al menos, de tres pasos: la salida del promotor, la formación de los primeros enlaces fosfodiésteres y la aclaración del promotor. Después de estos, la polimerasa pasa al estado de elongación.

Una vez formado este complejo multiproteínico se produce la apertura del promotor en una reacción dependiente de ATP, en la cual participa la subunidad XPB del TFIIH. Esta reacción provoca cambios conformacionales en el complejo de preiniciación, que permiten tanto la salida de la ARNPII del promotor como la unión de los primeros nucleótidos.

La polimerasa comienza a deslizarse sobre el ADN hasta encontrar el sitio de iniciación (SIT). El primer nucleótido en ser copiado es generalmente de adenina. Aunque desde el punto de vista conceptual este debía ser el final de la iniciación, el mecanismo inclina a ubicar el fin de esta etapa una vez incorporados de ocho a nueve nucleótidos.

La salida del promotor y la primera fase de la elongación son momentos críticos. Cuando el transcrito tiene menos de nueve nucleótidos, el complejo es inestable y propenso a una iniciación abortiva, como consecuencia, en cada adición de nucleótido se establece una competencia entre la formación del enlace y la disociación de la polimerasa, hasta que se ha sintetizado un polímero de aproximadamente nueve nucleótidos. Evidencias recientes sugieren que el TFIIF es necesario para la iniciación y capaz de estimular la velocidad de la elongación, actuando en los momentos iniciales en la disminución de la frecuencia de las iniciaciones abortivas, tal vez, simplemente, aumentado la velocidad de la adición del nucleótido, con lo cual el transcrito crece rápidamente hasta alcanzar la longitud adecuada para la estabilidad, esto es, nueve nucleótidos.

Una vez que el transcrito ha alcanzado la longitud de nueve nucleótidos, la enzima hace una pausa. Durante esos primeros momentos el CTD es fosforilado en la serina 5 (S5) por el complejo Cdk7/H que forma parte del TFIIH. Esa fosforilación crea el sitio de unión del factor de elongación negativo NELF (del inglés, *negative elongation factor*) y el factor que induce sensibilidad a DRB (5,6-dicloro-1-β-d-ribofuranosilbenzimidazol), DSIF (del inglés, *DRB sensitivity inducing factor*), que determinan una pausa en el movimiento de la polimerasa. La pausa es superada y la polimerasa continúa su movimiento, gracias a la intervención del factor b positivo de la elongación P-TEFb (del inglés, *positive transcription elongation factor b*) que provoca la fosforilación de NELF y DSIF, catalizada por la Cdk9/ciclina T, que son parte P-TEFb. Este factor también fosforila al CTD en la serina 2 y convierte a la polimerasa en competente para la elongación. Esta fase del proceso se muestra en la figura 27.18.

Se ha observado que en la mayoría de los genes la polimerasa se encuentra en este estado de pausa y se ha interpretado como que la transcripción comienza y se detiene en espera de una señal que indique que debe continuar. No es aventurero imaginar que esas señales pudieran estar relacionadas con la activación de P-TEFb, mediante mecanismos de transferencia de información, y que conducirían a la activación rápida de la transcripción de genes específicos.

Al comenzar la síntesis del ARNm muchos de los factores de transcripción abandonan a la enzima fenómeno, este proceso se conoce como aclaración del promotor. Los complejos TFIIE y TFIIH actúan juntos para modular la actividad de la pol-II y facilitan la aclaración del promotor.

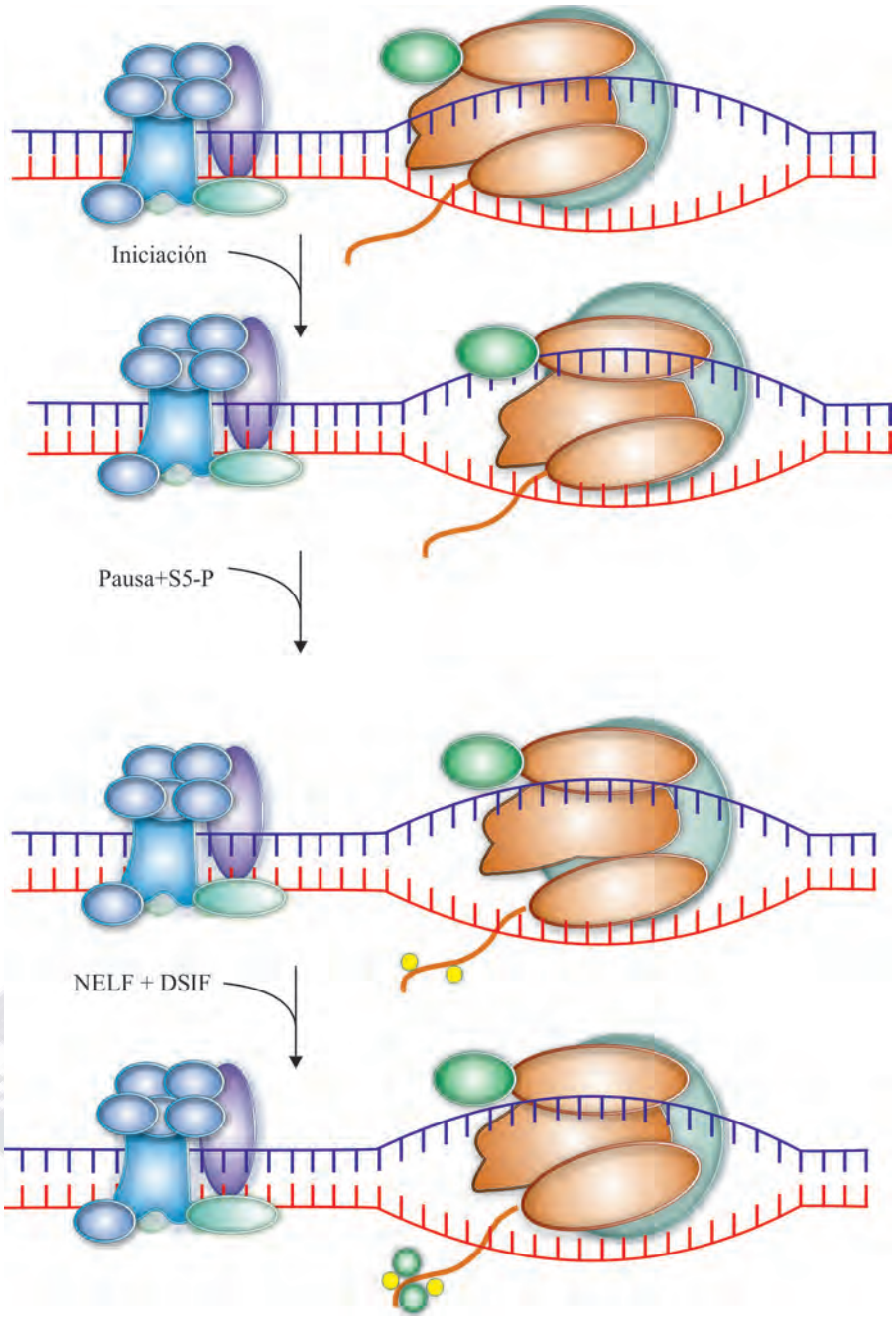


Fig. 27.18. Iniciación por la ARNPII. La ARNPII se desplaza sobre el ADN y une ribonucleótidos. Cuando ha unido unos 10 nucleótidos, hace una pausa. Simultáneamente se produce la fosforilación de S5 en el CTD y la unión del complejo NELF-DSIF. Solo ante el estímulo adecuado la ARNPII pasa al modo de elongación.

Elongación

Una vez sobrepasada la pausa, la enzima continúa uniendo ribonucleótidos cuyas bases nitrogenadas sean complementarias a la hebra de ADN que le sirve de molde. Durante su trayectoria se producen pausas que algunas veces son superadas por la polimerasa y otras veces requieren de la participación de proteínas específicas, conocidas como factores de elongación.

Aunque la elongación es un evento altamente procesativo, no es continuo, pues durante el mismo la ARNPII se detiene con frecuencia, debido a varios obstáculos como secuencias reguladoras específicas o errores en la incorporación de nucleótidos. En tales casos se produce un retroceso de la ARNPII, disociando el extremo 3´-OH del transcrito del ADN y llevándolo hacia el canal secundario. El retroceso en dos o tres nucleótidos

es reversible y la enzima puede avanzar de nuevo. Sin embargo, cuando hay nucleótidos mal incorporados la enzima puede reanudar el proceso mediante la hidrólisis del ARN naciente que se encuentra en el canal secundario.

La actividad hidrolítica es intrínseca de la ARNPII, pero es muy potenciada por el factor de elongación S (TFIIS), especialmente cuando el segmento a separar es de siete a nueve nucleótidos, situación en la cual la actividad de la polimerasa es insuficiente. Esta actividad es importante para la fidelidad del proceso. Otros factores de elongación que interactúan directamente con la ARNPII y permiten reiniciar el proceso después de una pausa, son el ELL, el complejo de las elonguinas, formado por las elonguinas A, B y C, y la proteína deficiente en el síndrome de Cockaine (CSB, del inglés *Cockaine syndrome gene B*).

Otros complejos aceleran la transcripción mediante modificaciones en la estructura de la cromatina. El FACT (del inglés *facilitates chromatin transcription*) interactúa con los nucleosomas, específicamente con los dímeros de las histonas H2A y H2B, separándolas del resto y facilitando así el avance del complejo de elongación. Por su parte el elongador cataliza la acetilación de residuos específicos de lisina en la histona H3, lo cual debilita la unión entre la histona y el ADN, y facilita el avance de la polimerasa.

También durante la elongación se producen cambios en el CTD de la subunidad mayor de la ARNPII. De los siete residuos que forman las repeticiones (YSPTSPS), las tres serinas, la treonina y la tirosina pueden ser fosforiladas, y las dos prolinas pueden experimentar reacciones de isomerización cis/trans. Además, las serinas y la treonina pueden ser glicosiladas. De existir todas las combinaciones posibles, se pudiera afirmar que en una célula no existen dos ARNPII iguales. Varios estudios indican que modificaciones específicas del CTD están vinculadas a determinadas etapas de la transcripción y el procesamiento del pre-ARNm, lo cual ha conducido a formular la hipótesis del "código CTD", que afirma que las modificaciones realizadas sirven para el reclutamiento y la interacción de factores con la ARNPII.

El fenómeno más estudiado es el de la fosforilación. El CTD es rico en la fosforilación de la serina-5 (S5), en las proximidades del promotor, y va perdiendo esa marca en la medida que la elongación progresa. Esta fosforilación es catalizada por la Cdk7/ciclina H/Mat que forma parte del TFIIH; dicha enzima también fosforila la S7. Por su parte la Cdk8/ciclina C que forma parte del mediador también fosforila S5.

Mientras la fosforilación en S5 predomina cerca del promotor, en S2 va predominando en la medida que avanza la elongación y coincide con la entrada del ARNPII, que es su modo de elongación. El reclutamiento de las quinasas que fosforilan a S2 depende de la fosforilación en S5. Se han identificado dos enzimas con esta actividad, la Cdk12 y la Cdk13. El incremento de S2-P hacia el extremo 3´ de la unidad de transcripción está relacionado con el reclutamiento de los factores que intervienen en el empalme, la terminación y la exportación hacia el citoplasma del ARNm.

Por su parte la fosforilación en Y1 se mantiene durante toda la elongación, pues impide el reclutamiento de los factores que intervienen en la terminación. La fosforilación en S7 que aparece desde el inicio de la transcripción, se mantiene estable durante todo el proceso.

Las marcas en S5 son borradas por las fosfatasas pequeñas del CTD, SCP (del inglés, *small CTD phosphatases*) especialmente la Scp1. La fosfatasa Fcp1 viaja junto con la ARNPII y elimina la marca en S2 cuando se alcanza la señal de terminación. Con posterioridad, la ARNPII defosforilada está lista para un nuevo ciclo catalítico. El estudio del resto de las modificaciones está más allá del alcance de este capítulo. Todas estas modificaciones permiten el reclutamiento de factores que intervienen en la formación del casquete y el empalme del pre-ARNm, que son los procesos que se estudiarán a continuación.

Adición del casquete o modificación del extremo 5´

El primer nucleótido transcrito por la ARNPII contiene un grupo trifosfato y es modificado por la adición de 7-metil-guanosina durante los primeros estados de la transcripción. La adición se realiza mediante la formación de una unión trifosfato 7mG(5´) ppp(5´)-N1. La estructura así formada se denomina casquete. Esta modificación es única de los transcritos por la ARNPII y permite que factores que intervienen en su procesamiento sean reclutados exclusivamente hacia ellos.

La adición de 7mG necesita de tres actividades enzimáticas: una trifosfatasa, una guanilato transferasa y una metil transferasa. La primera cataliza la hidrólisis del fosfato gamma (γ) del primer nucleótido; la segunda transfiere un grupo guanilato (GMP) hacia el fosfato β del transcrito y la tercera transfiere un grupo metilo desde la S-adenosil--metionina hacia el nitrógeno 7 de la guanina. En eucariontes inferiores las tres actividades enzimáticas residen en diferentes polipéptidos, sin embargo, en metazoos las dos primeras están en un solo polipéptido, mientras que la actividad de metil-transferasa es un complejo de dos proteínas: una, que es la subunidad catalítica, y otra, que es la activadora. Las reacciones de formación del casquete se muestran en la figura 27.19.

La 7mG es exclusiva de los transcritos de la ARNPII, por la existencia en la subunidad mayor de esta enzima del CTD, que cuando está fosforilado en los momentos iniciales de la transcripción recluta a las enzimas que adicionan el casquete.

El casquete protege a los transcritos de la acción de las exonucleasas e interactúa, además, con proteínas nucleares y citoplasmáticas que median acciones adicionales. Las dos proteínas de unión al casquete, mejor caracterizadas, son el complejo de unión al casquete CBC (*cap-binding complex*) y el factor de iniciación de la traducción 4E eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*). El eIF4E es la subunidad de unión al casquete del factor de iniciación de la traducción eIF4F y será estudiado en el capítulo 30, aquí solo se tratará del CBC.

El CBC es un complejo multifacético, esencial para la expresión de los genes, que integra la transcripción, el procesamiento y exportación del transcrito y la traducción. Está formado por dos subunidades de 20 (Cbp20, por *cap-binding protein*) y 80 kDa (Cbp80). Cbp20 es inestable en ausencia de Cbp80. Las dos se unen de forma sinérgica a 7mG, pues ninguna de las subunidades, por separado, presenta afinidad por el casquete. Sin embargo, Cbp20 es la que se une directamente a 7mG y lo atrapa entre dos tirosinas (Y20 y Y43), muy conservadas evolutivamente. La unión de Cbp80 provoca un cambio conformacional en Cbp20, necesario para la unión de alta afinidad a 7mG. La adición del casquete se muestra en la figura 27.20.

Cbp80 contiene en su extremo N-terminal una secuencia de localización nuclear, pero Cbp20 no, lo que sugiere que ambas proteínas son transportadas hacia el núcleo en forma de dímeros.

La eliminación experimental del gen que codifica a Cbp80 en mamíferos resulta en la desregulación de aproximadamente 400 genes y una reducción significativa de la proliferación celular. CBC estimula la elongación en mamíferos mediante el reclutamiento de P-TEFb; también participa en el proceso de empalme y de terminación de la transcripción. Por último CBC participa en el primer ciclo de traducción del ARNm, en el cual sustituye al eIF4E, como se verá en el capítulo 30.

Eliminación de los intrones

El proceso de eliminación de los intrones se denomina empalme y consiste en separar el intrón y unir los extremos de los exones, con lo cual se da continuidad al pre-ARNm.

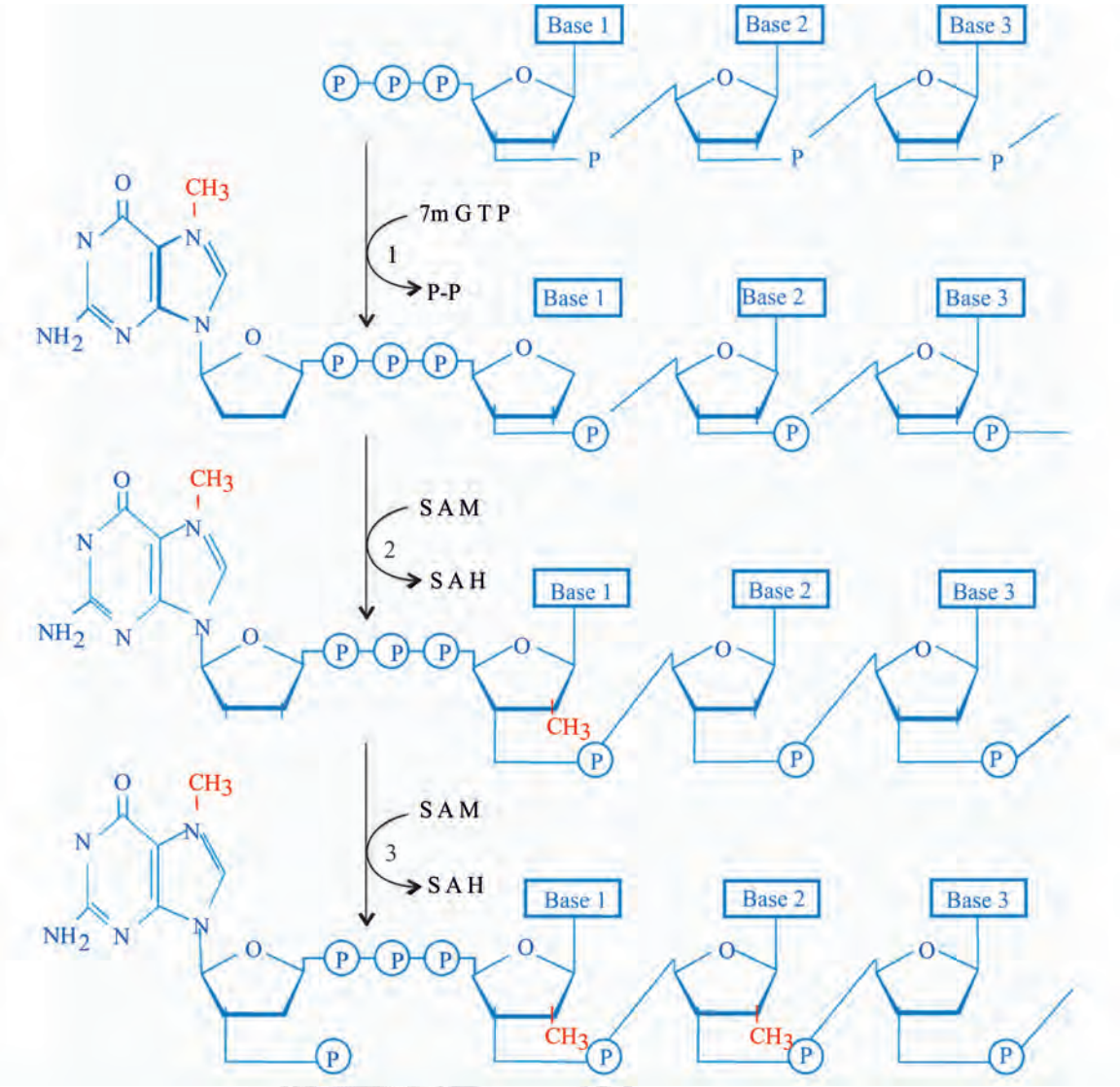


Fig. 27.19. Reacciones químicas de formación del casquete. Una quinasa específica transfiere un grupo7-metil-guanilato al extremo 5' del ARNm y se forma un enlace anhídrido fosfórico (1), así queda constituida la estructura del casquete 0. Una transmetilasa transfiere un grupo metilo de la S-adenosil-metionina (SAM) a la posición 2' del primer nucleótido y se origina la estructura casquete 1; una segunda metilación en la posición 2' del segundo nucleótido da origen al casquete 2. No todos los ARNm presentan la estructura completa.

Debido a que los genes humanos contienen típicamente múltiples intrones, el proceso de empalme del pre-ARNm es un paso esencial en la expresión de la mayoría de los genes. Las reacciones secuenciales de transesterificación, implicadas en el empalme, son catalizadas por un gran complejo de nucleoproteínas, denominado empalmosoma. Este complejo contiene más de 300 proteínas principales y cinco ARN nucleares cortos, ARNnc (U1, U2, U4, U5 y U6) y es el mayor complejo molecular existente en las células. A los complejos de ARNnc con proteínas se les conoce como partículas de ribonucleoproteínas (PRN) y se designan por el ARNnc que contienen, por ejemplo, U6-PRN.

Además de estos factores, proteínas reguladoras adicionales participan en el empalme de pre-ARNm específicos. Estas proteínas pertenecen a dos grandes familias, la SR, por ser ricas en serina y arginina, y las de las partículas de ARN nuclear heterogéneo (AR--Nnh-RNP). A diferencia de la transcripción o la traducción, el empalme se lleva a cabo mediante un empalmosoma que se forma de nuevo con cada pre-ARNm.

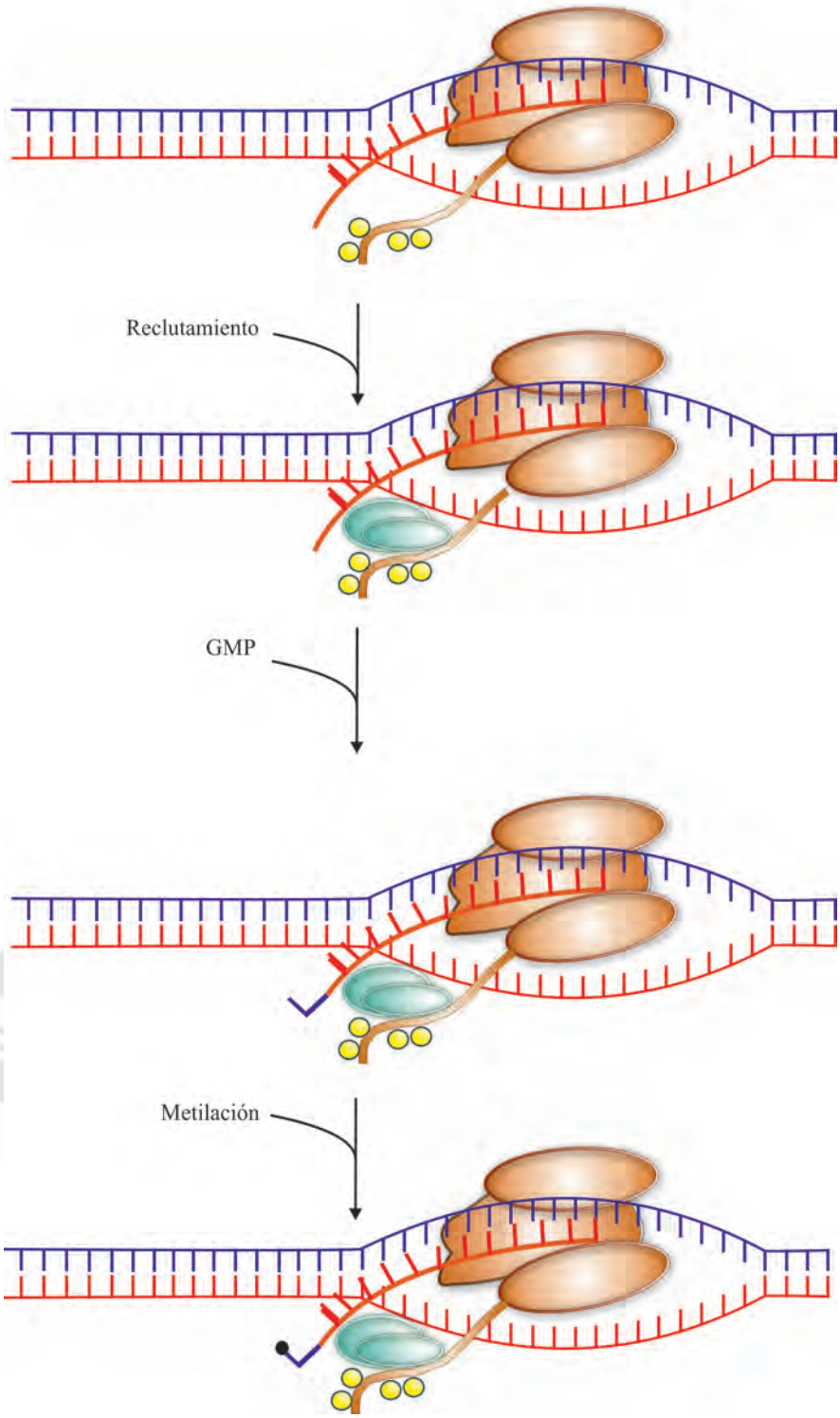


Fig. 27.20. Proceso de formación del casquete. El CTD fosforilado en S5 recluta las enzimas que participan en la adición del casquete. Primero la fosfatasa elimina el último fosfato del primer nucleótido, luego se transfiere el GMP a partir del GTP y por último la guanina es metilada en la posición 7. Todo esto ocurre simultáneamente con la elongación.

Se piensa que la mayoría de los procesos de empalme ocurren de manera cotranscripcional, con numerosas interacciones entre los factores de empalme y la maquinaria molecular de la transcripción.

Tres sitios participan en la reacción de empalme: el extremo 5´ del intrón (5´-si), el extremo 3´del intrón (3´-si) y el sitio de ramificación (SR), y por estar presentes en todos los intrones se les conoce como señales permanentes de empalme (ver capítulo 24).

Un gen humano típico contiene exones relativamente cortos (de 50 a 250 pb), separados por intrones mucho más largos que se encuentran aproximadamente en un rango de 100 a más de 700 000 nucleótidos en el genoma humano y representan, como promedio, más del 90 % del transcrito primario.

El empalme del pre-ARNm nuclear se realiza mediante un mecanismo químico, en dos etapas, en el cual ocurren dos reacciones de transesterificación sucesivas, que conducen a la formación del ARNm maduro y a la eliminación del intrón en forma de un lazo de vaquero, como productos finales.

Durante la formación del empalmosoma se reconoce primero el extemo 5´-si por U1-RNP en una reacción que no requiere de ATP. La unión se estabiliza por interacciones entre el ARNcn U1 y la secuencia del extremo 5´-si, además de la participación de otras proteínas que juntas se unen al sitio de ramificación. Estas dos proteínas se disocian con posterioridad y permiten la unión de U2-RNP al sitio de ramificación, en una reacción acoplada a la hidrólisis del ATP. A estas RNP se une el complejo triple U5-U4/U6-RNP y da lugar a la formación del complejo precatalítico que contiene el conjunto completo de RNP, esto es, U1, U2, U4, U5 y U6.

La incorporación de otras proteínas provoca un reordenamiento de los ARNnc. Se elimina la interacción entre U1-ARNcn y el extremo 5´-si y se disocia U1-ARNcn. A continuación se separan en U4-ARNcn y U6-ARNcn, que se encontraban unidos mediante apareamiento de las bases, y dan lugar a un complejo que sigue siendo precatalítico. Luego, U6-ARNcn se reordena y establece nuevos apareamientos con U2-ARNcn y con el extremo 5´-si, mientras que U5 se asocia con el extremo del exón por delante del 5´-si.

Estos cambios colocan en la posición adecuada el 2´-OH de la adenosina del sitio de ramificación y el extremo 5´-si. Se produce una transconformación del complejo que lo lleva a su estado catalítico; se realiza la primera reacción de transesterificación, en la cual el 2´-OH de la adenina realiza un ataque nucleofílico sobre el fosfato del extremo 5´-si, y el intrón adopta la forma de un lazo de vaquero.

Un nuevo cambio de conformación facilita la segunda reacción de transesterificación, ahora por el ataque nucleofílico del 3´-OH del exón precedente sobre el fosfato 5´ del exón siguiente. Al final del proceso, el pre-ARNm se libera del complejo, mientras que U2, U5 y U6 RNP quedan unidos al intrón y posteriormente se separan, de esta manera liberan las RNP para un nuevo proceso de empalme. El proceso de empalme se resume en la figura 27.21.

Para asegurar la formación de proteínas funcionales a partir del ARNm empalmado, este proceso debe ser muy preciso, con un nivel de resolución de un simple nucleótido, pues la inclusión o exclusión de un solo nucleótido alteraría el marco de lectura del ARNm y podría originar proteínas no funcionales. Sin embargo, la escasa información conservada en el intrón con efectos en cis, que se reduce al dinucleótido GU en el extremo 5´del intrón, la secuencia CURAY en el sitio de ramificación y el dinucleótido AG en el extremo 3´, representan un formidable inconveniente para realizar el proceso con la precisión requerida. Esto explicaría por qué el empalmosoma es tan complicado, tal vez problemas complejos demandan soluciones complejas.

Por su naturaleza y posición en la vía de expresión de los genes, el empalme transforma la información genética guardada en la cromatina, en un ARN cuya secuencia no se encuentra en el ADN.

Una vez terminado el proceso, cerca del sitio donde se produjo el empalme, se deposita un complejo multiproteínico, conocido como complejo de unión de los exones, EJC (del inglés, *exons junction complex*) que es necesario para el control de calidad del transcrito, el transporte hacia el citoplasma y la primera ronda de traducción.

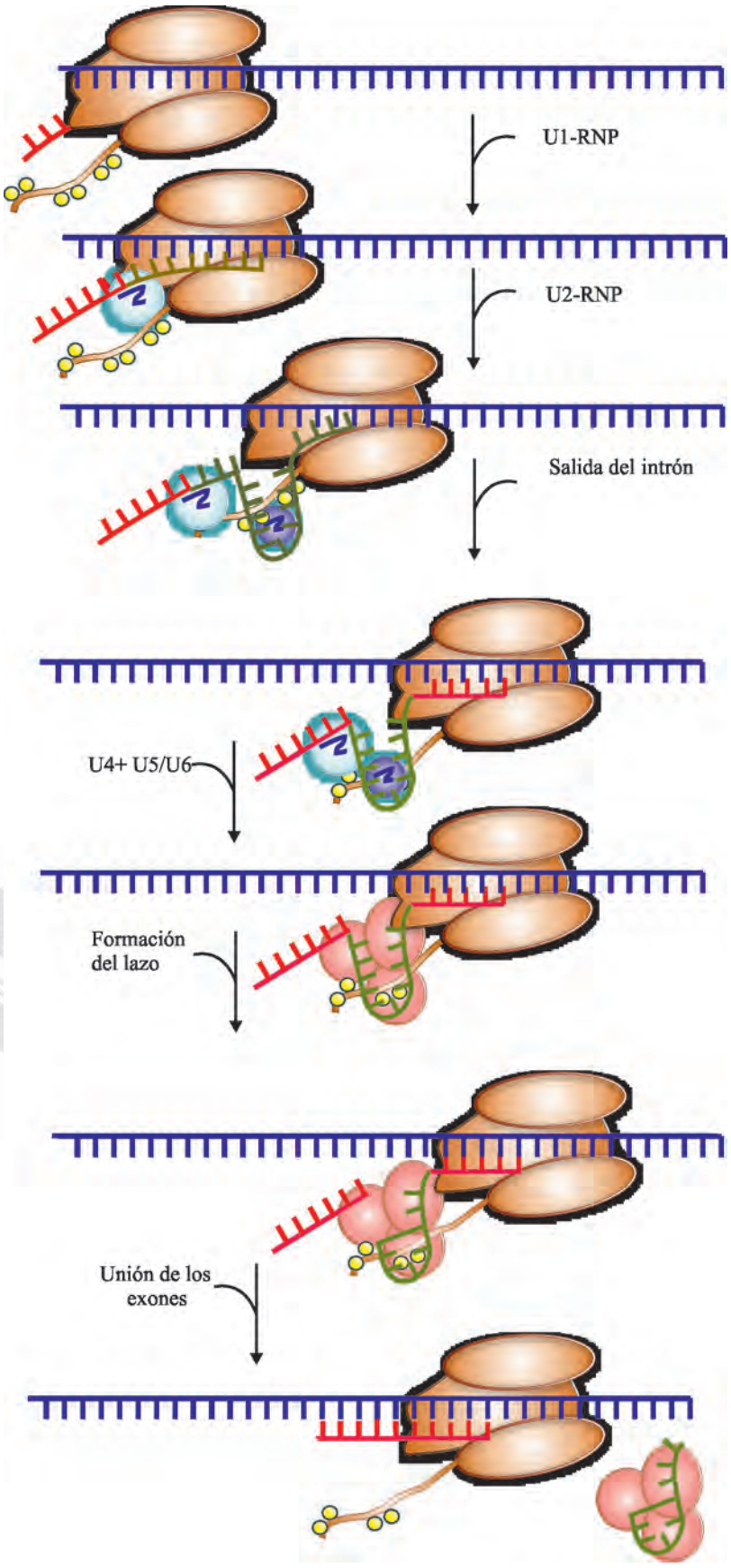


Fig. 27.21. Eliminación de los intrones. Primero U1 marca el extremo 5´del intrón y después U2, el sitio de ramificación. Cuando todo el intrón ha salido de la ARNPII, el complejo U4-U5-U6 sustituye a los anteriores y cataliza las dos reacciones de transesterificación que elimina al intrón y une a los exones.

La mayoría de los genes humanos experimentan el empalme alternativo, que consiste en tomar diferentes exones para formar el ARNm mensajero maduro. De esta manera, el mismo gen puede dar lugar a diferentes ARNm y, por ende, a diferentes proteínas, según los exones que se incluyan en cada caso. Este proceso es el fundamento molecular de las isoformas de proteínas que se sintetizan en diferentes tejidos. Sin embargo, se ha demostrado que un mismo tipo celular puede, en un momento, formar un mensajero, y en otro momento formar otro, en dependencia de las condiciones celulares, y que puede cambiar de uno a otro con extrema rapidez. Los mecanismos moleculares que determinan y controlan el empalme alterativo constituyen un intenso campo de investigación en la actualidad.

Terminación

La terminación de la transcripción por ARNPII es una etapa compleja, pues se encuentra acoplada a la modificación del extremo 3´ del transcrito primario. Como fue expresado, durante la elongación se originan cambios en el patrón de fosforilación del CTD, de manera que hacia el extremo 3´del gen predomina la forma con la S2 fosforilada. La S2 fosforilada ayuda a reclutar o estabilizar los complejos proteínicos que intervienen en esta fase del proceso.

En los mamíferos, la maquinaria molecular del procesamiento del extremo 3´ del pre-ARNm consta de más de 14 proteínas, con una masa molecular total de 1 MDa. El proceso ocurre a unos 10-30 nucleótidos por delante (hacia el extremo 3´) del hexanucleótido conservado AAUAAA y ~30 nucleótidos por detrás (hacia el extremo 5´) de una región rica en U o GU, que está menos conservada. El proceso consta de tres etapas: la hidrólisis o corte del pre-ARNm, la adición de poliadenina y la separación de la ARNPII del ADN.

A partir de células humanas se han purificado dos complejos multiproteínicos que intervienen en esta fase: el factor de especificidad del corte y la poliadenilación, CPSF (del inglés, *cleavage and polyadenylation specificity factor*) y el factor estimulante del corte, CstF (del inglés, *cleavage stimulatory factor*). En conjunto, estos complejos reconocen el AAUAAA y la región GU, y provocan el corte del transcrito entre ellas dos. Se ha demostrado que estos complejos reclutan la poliadenina polimerasa (PAP) hacia el extremo 3´del transcrito. También se ha evidenciado la participación de otras proteínas, denominadas factores de corte, CF (del inglés, *cleavage factors*) I y II.

El CPSF está formado por cinco subunidades y reconoce la señal AAUAAA, mientras que CstF, formado por tres subunidades, se asocia a la región GU. La hidrólisis del ARNm naciente es catalizada por una de las subunidades de CPSF, al tiempo que otra de las subunidades recluta a poli(A)-polimerasa, que adiciona uno a uno nucleótidos de adenina al extremo 3´ del transcrito, hasta alcanzar una cifra de aproximadamente 250. Una proteína de unión a poli(A) (PABP) se asocia a esta estructura en una proporción 1PABP por cada 10 adeninas y de esta forma protege al ARN de la acción de las exonucleasas, además de contribuir a su transporte hacia el citoplasma.

Mientras tanto, la ARNPII continúa asociada al ADN y forma un ARN, que se denomina residual, cuyo extremo 5´ presenta un solo grupo fosfato (5´-P). Una de las subunidades de CstF recluta hacia el 5´-P a una exorribonucleasa (Xrn2) que comienza la degradación del ARN residual. Mediante un mecanismo que se denomina "de torpedo", la Xrn2 avanza hacia la polimerasa que está unida al ADN. Al parecer, existe una secuencia de bases que determina una pausa en la polimerasa y en ese momento es alcanzada por la Xrn2. De esta manera la ARNPII se separa del ADN y termina la transcripción. Se desconoce si para la separación solamente es necesario el encuentro entre las dos proteínas o si requiere de la presencia de factores adicionales. La etapa de terminación se muestra en la figura 27.22.

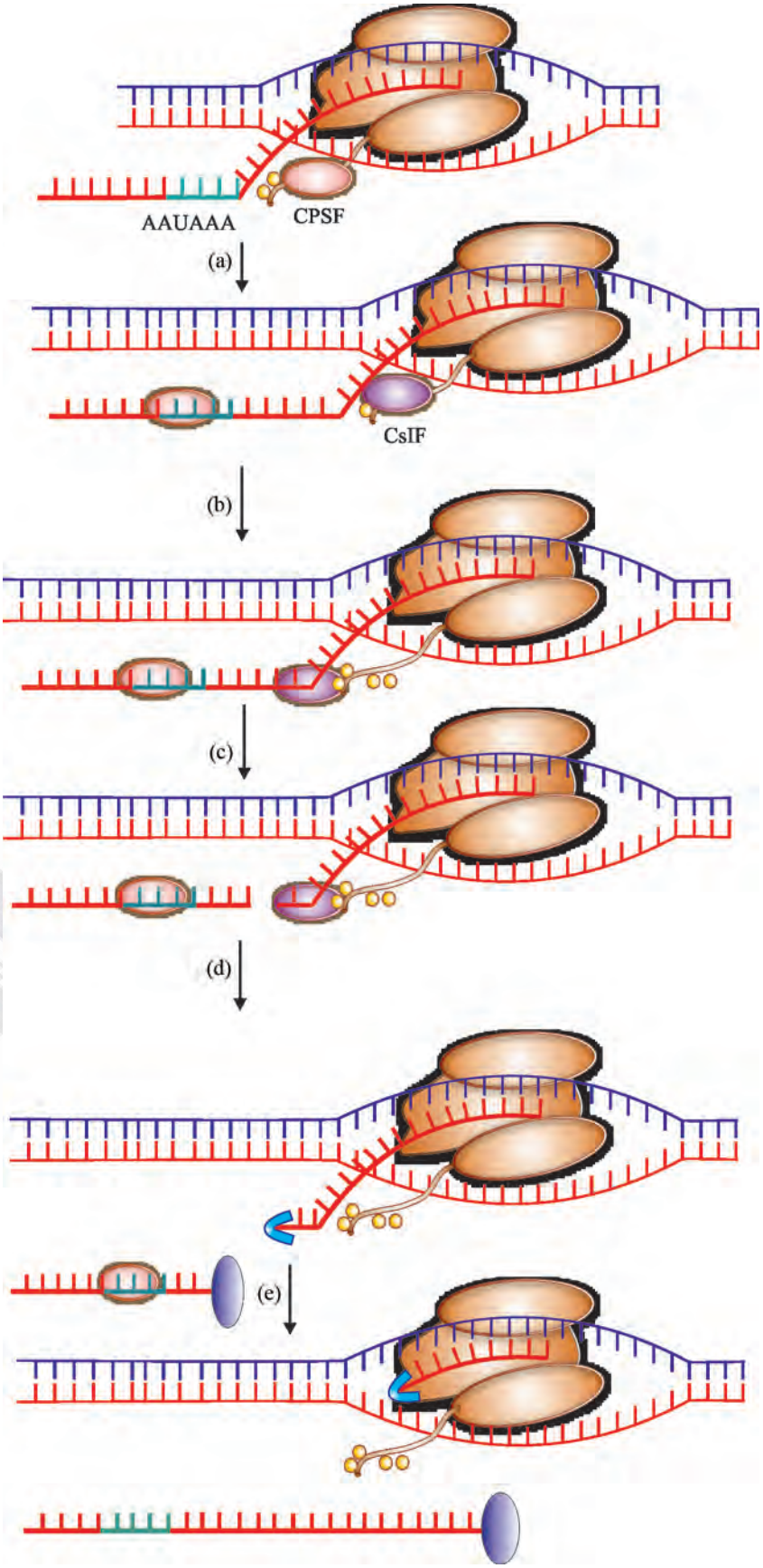


Fig. 27.22. Terminación de la transcripción por la ARNPII. (a) El complejo CPSF, que viaja con el CTD, reconoce la secuencia AAUAAA; (b) por su parte, CstF reconoce la zona rica en GU; (c) uno de los componentes de CPSF cataliza la hidrólisis del ARNm por detrás de la secuencia AAUAAA; (d) la poliA polimerasa se une al extremo 3´ del ARN y la exonucleasa al extremo 5´ del ARN residual; (e) la poliA polimerasa añade uno a uno nucleótidos de adenina al extremo 3´, mientras la exonucleasa va degradando al ARN residual hasta encontrarse con la ARNPII y desplazarla del ADN.

Una vez terminado el proceso, un complejo denominado TREX (*transcription and export*) transporta al ARNm maduro hacia el citoplasma. Este complejo realiza, además, un control de la calidad del ARN, pues si carece de casquete, de la cola de poli(A) o se ha producido una unión inadecuada de los exones, el ARN no es transportado y es sustrato de un complejo denominado exosoma, que la degrada. Si esto fallara, en el citoplasma se realiza un nuevo control de la calidad, como se verá en el capítulo 30.

Al concluir el proceso de maduración, la estructura final del ARNm desde el extremo 5' hasta el 3' queda de la manera siguiente: el casquete ocupa el extremo 5', seguido por una secuencia de nucleótidos de diferente longitud que no es traducible, y por eso se denomina región 5'-UTR (del inglés *untranslated region*). A continuación aparece la señal de iniciación de la traducción que contiene el codón AUG. Sigue toda la secuencia donde está codificada la proteína que finaliza con uno o varios codones de terminación. A continuación la región no traducible del extremo 3' (3'-UTR) y por último la cola de poli(A). Todos estos elementos estructurales tienen una función específica durante el proceso de traducción.

Unidades de transcripción

Al segmento de ADN que contiene la secuencia de bases que transcribe la ARN polimerasa II se le denomina unidad de transcripción. Estas unidades pueden ser simples, si dan origen a un solo tipo de ARNm, o complejas, si dan lugar a más de uno. Una unidad simple de transcripción típica contiene la zona del promotor por la cual se une la polimerasa II y un solo sitio de terminación.

Las unidades complejas son menos regulares y se pueden presentar las situaciones siguientes:

- Varios sitios de iniciación y uno de terminación, pero con procesamiento diferente del transcrito primario.
- Un sitio de iniciación y varios de terminación, con procesamiento diferente.
- Varios sitios de iniciación y terminación, pero con igual procesamiento.
- Un sitio de iniciación y uno de terminación, con diferente procesamiento.

Todas estas variantes amplifican considerablemente las capacidades codificadoras del genoma, pues a partir de un solo segmento de ADN se puede formar un número considerable de ARNm y, con ello, una cantidad superior de proteínas que el número de genes existentes. Las proteínas formadas a partir del mismo gen pueden ser muy similares, con solo pequeñas diferencias, pero pueden ser muy diferentes unas de otras. En la figura 27.23 se muestra un resumen de las posibles unidades complejas de transcripción.

De lo anterior se desprende que la transcripción por la ARNPII es un proceso de alta complejidad, en el cual participan cientos de proteínas desde el momento de reconocimiento del promotor hasta la salida del ARNm hacia el citoplasma. Esto pudiera explicarse por el hecho de que la formación del ARNm es el paso inicial para la síntesis de las proteínas, que son, por excelencia, las moléculas funcionales que poseen las células. Errores en la transcripción producirían proteínas defectuosas que a su vez alterarían funciones celulares específicas y serían una amenaza para la supervivencia de la célula y, en ocasiones, del organismo.

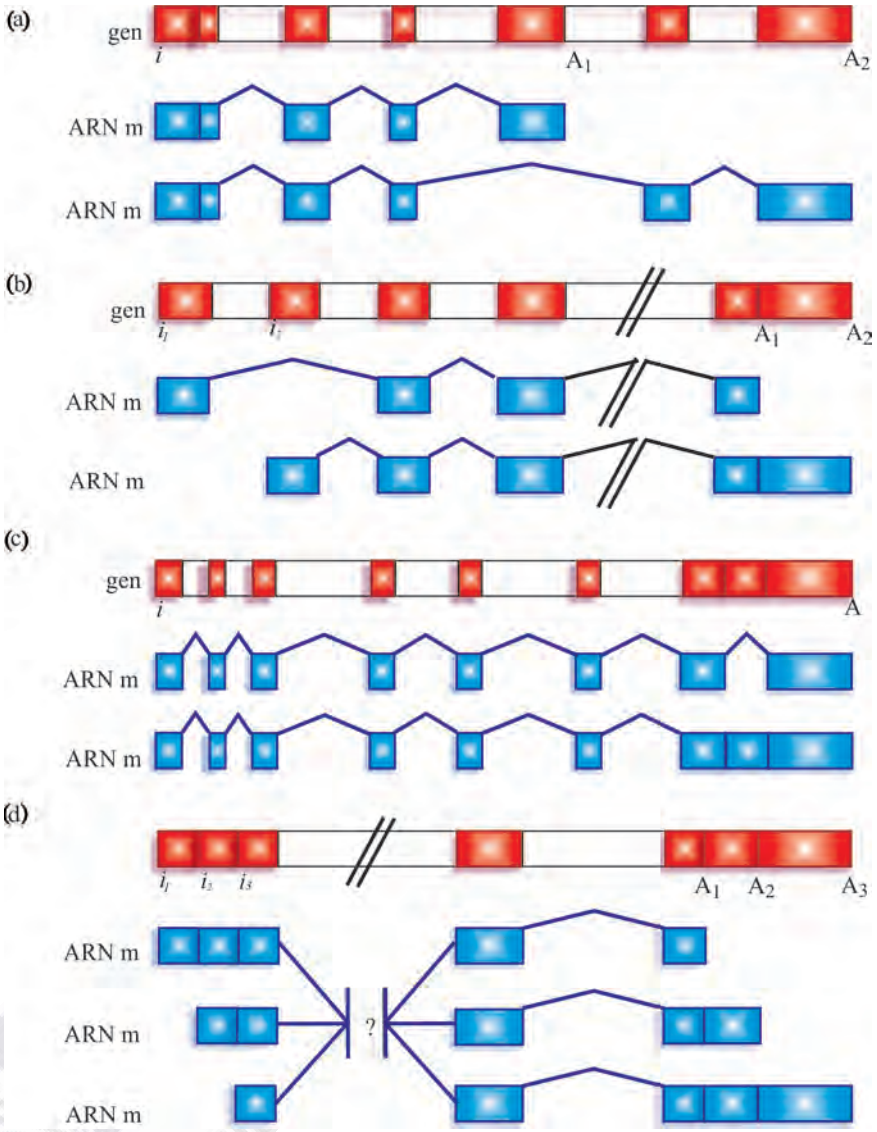


Fig. 27.23. Unidades transcripcionales complejas. (a) El gen de la calcitonina con un solo sitio de iniciación (i) y dos de poliadenilación (A) y maduración diferente que, según el primer caso, da origen a la calcitonina en la glándula tiroides y, en el segundo origina un péptido relacionado con la calcitonina, que aparece en el hipotálamo y en otras regiones del SNC; (b) unidades con varios sitios de iniciación y de poliadenilación, como sucede con el gen de la amilasa de ratón, que en el primer caso da lugar a la enzima salival y en el segundo, a la pancreática; (c) existe un solo sitio de iniciación y de poliadenilación, pero el procesamiento es diferente como los genes del gamma fibrinógeno de la rata que origina el tipo A, en el primer caso, y el tipo B, en el segundo; (d) presencia de varios sitios de iniciación y de poliadenilación, pero no existen diferencias en la maduración, como se observa en el gen que codifica diferentes formas de la enzima dihidrofolato reductasa de ratón. Estas diferentes variantes pueden dar lugar a proteínas disímiles que, sin embargo, están codificadas en el mismo segmento de ADN.

Transcripción por la ARN polimerasa III

La ARN polimerasa III (ARNPIII) transcribe una variedad de genes no codificantes cortos (100-150 pb), tanto nucleares como citoplasmáticos, se incluyen el ARNr de 5 S, el ARN pequeño nuclear U6 que forma parte del corpúsculo de empalme, los ARNt, los ARN que actúan como cofactores de las ARNasa P y MRP, el asociado a adenovirus (VA) y el 7SK. Sin embargo, los productos más abundantes de la ARNPIII son los ARNt y el ARNr de 5 S, generalmente codificados por cientos o miles de unidades de transcripción idénticas.

La ARNPIII es la mayor de las ARN polimerasas, con una masa molecular total de 700 kDa, que está formada por 17 subunidades. Nueve de las subunidades definen el núcleo estructural, relacionadas evolutivamente con los otras polimerasas y solo cinco específicas de ARNPIII. La ARNPIII es una polimerasa muy eficiente, no solo debido a lo corto de las unidades de transcripción, sino también porque se reasocia muy rápido al promotor de la misma unidad de transcripción. La ARNPIII puede realizar una terminación eficiente, aparentemente sin el concurso de otros factores. Como se señaló anteriormente, ella transcribe tres tipos de genes.

Los promotores de los genes de los ARNt constan de dos elementos internos (dentro de la zona de transcripción), denominados A y B. A estos elementos se une el TFIIIC y con posterioridad el TFIIIB, que recluta hacia ese sitio a la ARN polimerasa, que da comienzo a la transcripción. Los elementos A y B, una vez transcritos, representan los lazos conservados D y T de los ARNt maduros. Solo unos pocos pre-ARNt humanos presentan intrones, que son procesados de manera diferente a los del pre-ARNm. En la figura 27.24 se muestra un esquema de la formación de los ARNt.

Por su parte, los genes de los ARNr de 5 S solo contienen tres elementos internos, que se denominan elementos A, intermedio y C. El elemento C es reconocido por TFIIIA, mientras que los otros dos interactúan con TFIIIC y TFIIIB, y juntos reclutan a la ARN polimerasa. En la figura 27.25 se muestra la formación del ARNNr de 5 S.

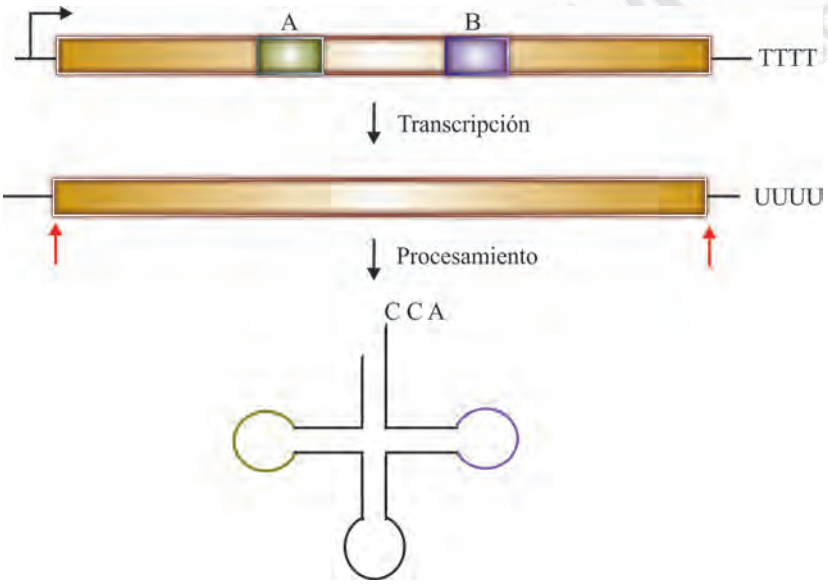


Fig. 27.24. Formación de los ARNt. El protomor presenta los elementos A y B de unión a los factores de transcripción que reclutan a la ARNPIII. Una vez realizada la transcripción, el pre-ARNt es procesado. Obsérvese que los elementos A y B representan las asas D y T del ARNt maduro.

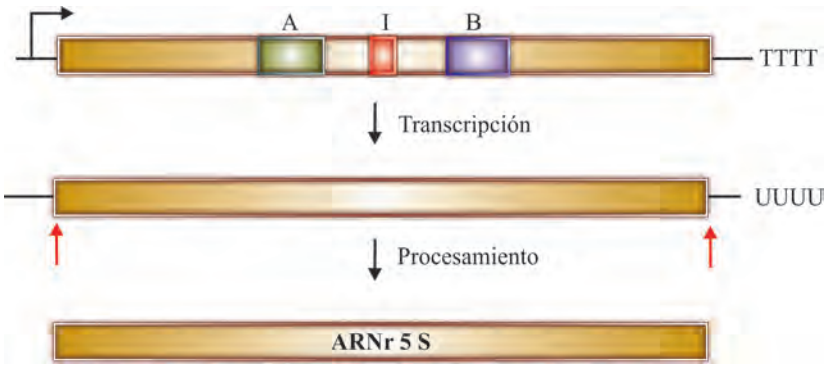


Fig. 27.25. Formación de los ARNt. El protomor presenta los elementos A y B de unión a los factores de transcripción que reclutan a la ARNPIII. Una vez realizada la transcripción, el pre-ARNt es procesado. Obsérvese que los elementos A y B representan las asas D y T del ARNt maduro.

Sin embargo, los promotores para los ARN pequeños son más complejos y solo se han identificado seis genes activos en los seres humanos. Están situados adyacentes al extremo 5' del gen y constan de tres elementos: la secuencia TATA (más próxima), luego el elemento de secuencia proximal PSE (del inglés *proximal sequence element*) y más alejado, el elemento distal, DSE (del inglés *distal sequence element*). A estos dos últimos se une el complejo SNAPC (por *snRNA activating protein complex*). A continuación se une a la secuencia TATA, una forma especial del TFIIIB, y trae hacia ese sitio a la ARN polimerasa. Todos los transcritos primarios de esta polimerasa son procesados hasta alcanzar una estructura totalmente funcional. Después son transportados hacia el citoplasma a través del complejo del poro nuclear. Un resumen de los procesos descritos se presenta en la figura 27.26.

La transcripción por la ARNPIII termina en una secuencia consenso común simple en el extremo 3' de los genes. La mayoría de las señales de terminación de la ARNPIII se localizan dentro de los primeros 40 pb, con posterioridad al extremo 3' del ARN maduro. En mamíferos, un grupo de cuatro T es el terminador más frecuente, y grupos mayores de cinco son raros. Como consecuencia, aparece una zona de poli(U) al final del transcrito primario que es eliminada por la acción de exonucleasas.

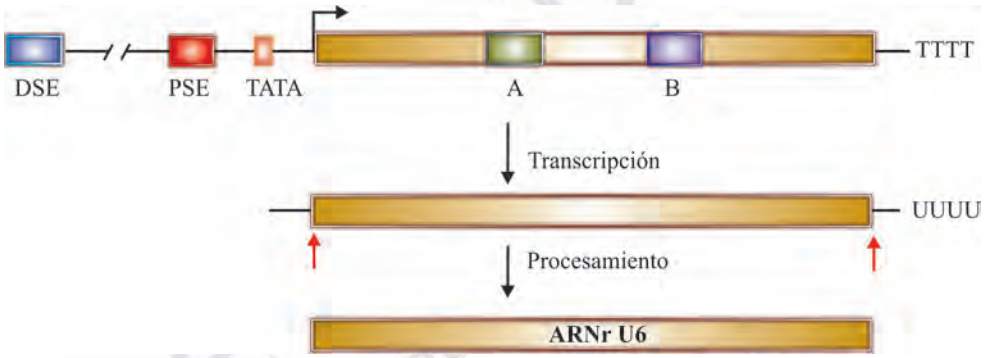


Fig. 27.26. Formación de los ARNt. El protomor presenta los elementos A y B de unión a los factores de transcripción que reclutan a la ARNPIII. Una vez realizada la transcripción, el pre-ARNt es procesado. Obsérvese que los elementos A y B representan las asas D y T del ARNt maduro.

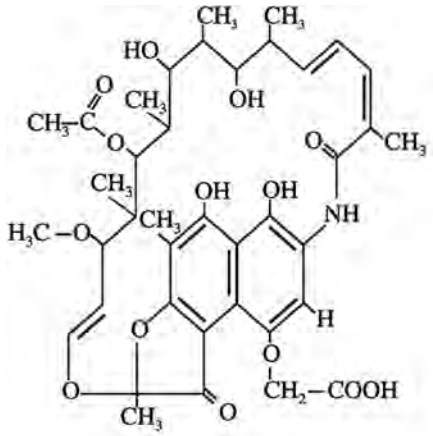
Inhibidores de la transcripción

Los inhibidores de la transcripción se emplean en procedimientos experimentales para el estudio del proceso y algunos sirven como antibióticos en la práctica médica. Las marcadas diferencias en este proceso entre bacterias y seres humanos proporciona el factor de selectividad y especificidad, necesarias en el uso de medicamentos antimicrobianos.

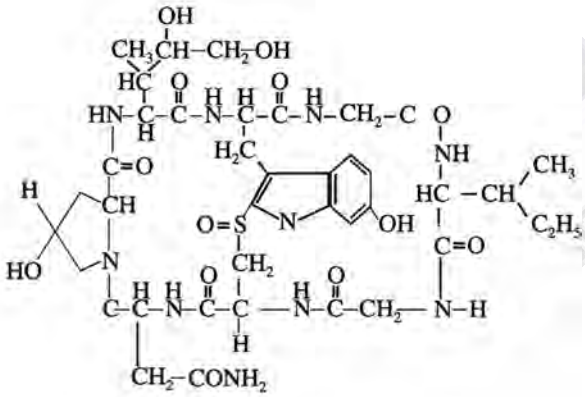
Se pudieran considerar dos tipos de inhibidores: los que impiden la separación de las cadenas del ADN, que por lo general también son inhibidores de la replicación, y los que actúan de forma directa sobre las polimerasas. Los primeros ya fueron tratados en el capítulo 26. Entre los segundos se encuentra el antibiótico rifampicina, que actúa sobre la ARN polimerasa e impide la fase de iniciación. Una sustancia conocida como α-amanitina inhibe la síntesis de ARN en eucariontes, por actuar sobre la ARN polimerasa II (Fig. 27.27).

Resumen

La transcripción es el proceso central en el crecimiento y desarrollo de la célula, en la cual la información genética contenida en el ADN se copia en un ARN específico. El desarrollo técnico alcanzado en los últimos años ha permitido obtener una visión comprensible, en principio, de este fenómeno. Los precursores de la transcripción son los nucleósidos trifosfatados que se unen mediante un enlace fosfodiéster 3'→5', por acción de la ARN polimerasa, según la secuencia de bases de una hebra del ADN.



Rifamicina B



α- Amanitina

Fig. 27.27. Inhibidores de la transcripción. En la figura se muestra la estructura química de la rifampicina B, uno de los inhibidores de la transcripción más empleado en las investigaciones relacionadas este tema. La α-amanitina permite diferenciar las tres polimerasas de eucariontes, ya que la I es resistente a su acción, la III se inhibe poco, pero la II es inhibida de manera intensa por esta sustancia.

En los procariontes –especialmente en la *E. coli*– una sola enzima es capaz de realizar todo el proceso. Esta es una proteína oligomérica a la cual se unen otras subunidades en diferentes fases del evento. Para comenzar la transcripción, la polimerasa se debe unir íntimamente al promotor y lograr la apertura de la doble hebra del ADN, en este paso la subunidad σ es fundamental; luego comienza la incorporación de los ribonucleósidos trifosfatados, cuyas bases son complementarias a las del ADN; la proteína NusA impide la terminación prematura de la cadena. La terminación se produce gracias a una señal específica en el ADN, aunque en ocasiones la proteína rho determina el cese de la síntesis, sin que al parecer existan señales para ello. Cuando termina la síntesis, comienza el proceso de maduración. Los ARNm no sufren modificaciones, pero los ARNr y ARNt se sintetizan en forma de precursores de gran tamaño, que deben ser acortados hasta alcanzar su forma definitiva.

En los eucariontes el proceso es más complejo, debido a la estructura de los genes, la existencia de la cromatina, la especialización de las polimerasas y por estar limitada al núcleo celular. Existen tres tipos de ARN polimerasa: la ARNPI es del nucléolo y realiza la síntesis de los ARNr de mayor tamaño; la ARNPII es del nucleoplasma y realiza la síntesis de varios tipos de ARN, especialmente del ARNm; la ARNPIII, también del nucleoplasma, lleva a cabo la síntesis de numerosos ARN cortos, entre ellos los ARNt y el ARNr de 5 S.

La transcripción por la ARNPI produce un transcrito primario de 45 S, que es procesado mediante cortes internos y externos, metilado en bases y ribosas de nucleótidos específicos, y acortado hasta formar los tres ARNr ribosomales mayores.

Los ARNm se sintetizan por la ARNPII, a partir de una unidad de transcripción, simple o compleja. El promotor se encuentra fuera del gen y en él existen varias secuencias necesarias para la transcripción. El proceso de copia incluye tanto los exones como los intrones. Todas las etapas del proceso requieren de la participación de proteínas específicas. La preiniciación utiliza los factores generales de transcripción y los génico-específicos; la elongación, los factores de elongación. La maduración o procesamiento se hace de forma simultánea con la elongación. Consiste en la modificación del extremo 5'P por un nucleótido de guanina metilada (casquete); la transformación del extremo 3'OH, en una larga cola de adenina –poli(A)– y el corte y empalme de la cadena para la eliminación de los intrones. Se ha comprobado que una misma unidad de transcripción puede originar varios tipos de ARNm maduros, por diferencias en la maduración.

La ARNPIII transcribe varios tipos de genes con promotores diferentes. En el caso del ARNr de 5 S y de los ARNt, la señal que promueve la transcripción es intragénica, mientras que el del ARNnc U6 es extragénica. Los transcritos primarios suelen ser más largos que los definitivos y experimentan un procesamiento. Solo algunos ARNt presentan intrones que se eliminan por un mecanismo diferente al que emplea el ARNm.

Ejercicios

1. Para hacer una experiencia de transcripción in vitro se sintetizan artificialmente tres polidesoxinucleótidos con la estructura siguiente:

   a) TGTTGACA 18 bases AATATTG
   b) TGTTGACA 16 bases TTTATAG
   c) TGTTGACA 17 bases TATAAAG

   ¿Puede usted determinar cuál de ellos funcionará como el promotor más fuerte y cuál como el más débil? Argumente su respuesta.
2. En una experiencia donde se pretendía investigar el proceso de transcripción, se añadió al sistema rifampicina y se observó que la iniciación quedaba bloqueada. Si se añadía estreptoligidina ocurría la iniciación, pero quedaba bloqueada la elongación ¿Cuáles serían las conclusiones que este experimento aporta sobre el mecanismo molecular de la transcripción?
3. En un experimento posterior se comprobó que la rifampicina se unía fuertemente a la subunidad β' de la polimerasa y que la estreptoligidina se asociaba con la subunidad β ¿Cuáles serían las conclusiones más importantes de estos experimentos con respecto al mecanismo de acción de la ARN polimerasa?
4. ¿Qué consecuencias traería para la transcripción una alteración de la proteína NusA que disminuyera su afinidad por el núcleo de la polimerasa?
5. ¿Cuál es la característica más sobresaliente de la transcripción realizada por la ARN polimerasa III?
6. La célula hepática sintetiza tres formas de una proteína con actividad de proteína quinasa: una es nuclear, otra mitocondrial y la tercera del citosol. La nuclear actúa

sobre la región C-terminal de sus sustratos, la citosólica sobre la región central y la mitocondrial sobre la región N-terminal. Se sabe que esas formas están codificadas en un gen único. Explique, utilizando un esquema de la transcripción, cómo un gen puede dar lugar a esas proteínas.

7. Una mutación provoca la alteración de la secuencia de bases en el extremo 5´ del segundo intrón de un gen. ¿Qué consecuencias pudiera traer esa mutación sobre la estructura de la proteína codificada?
8. La cordicepina inhibe la acción de la poli(A) polimerasa. ¿Qué consecuencias pudiera tener su acción sobre las células procariontes y eucariontes? Argumente su respuesta.

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Código genético

Uno de los problemas centrales de la genética molecular consiste en conocer cómo la información contenida en el ADN y transcrita en un ARNm puede dirigir la síntesis de una cadena polipeptídica específica, o sea, cuál es la relación entre la secuencia de bases del ARNm y la de los aminoácidos de una proteína; este es el contenido del problema del código genético.

El código genético surge como una necesidad natural, debido a las diferencias existentes entre la estructura de las moléculas que conservan la información (ADN) y aquellas que la expresan en funciones específicas (proteínas). Se acostumbra decir que esta información está en dos lenguajes diferentes: el primero, en forma de una secuencia de bases, y el segundo, de aminoácidos. Al pasar la información del ADN al ARNm se mantiene en el mismo lenguaje, por lo que el proceso se denomina transcripción. Pero al pasar del ARNm a las proteínas existe un cambio de lenguaje y, por tanto, es una traducción. Para traducir es necesario poseer la relación de equivalencia que existe entre los signos utilizados en un lenguaje y los empleados por el otro. En esto consiste la necesidad del código genético.

En la actualidad, la solución de este problema pudiera parecer muy sencilla, ya que bastaría con determinar la secuencia de bases de un gen y la de aminoácidos de la proteína por él codificada y correlacionarlas, pero esto no fue posible en los primeros años de la década de los 60, cuando se enfrentó la solución de este problema. Los métodos de determinación de la estructura primaria de las proteínas estaban ya establecidos desde el trabajo de Sanger con la insulina (1956), pero los procedimientos que permitieron hacer lo mismo con el ADN, con un elevado grado de fidelidad, no aparecieron hasta finales de la década de los 70, cuando el código ya había sido descifrado.

Este estudio comenzará por un esbozo de los trabajos fundamentales para descifrar el código genético y después se realizará un análisis y se destacarán sus características principales. Desde el punto de vista bioquímico el código se define como la relación de equivalencia entre la secuencia de bases del ARNm y la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Primeros pasos

El problema del código genético fue formulado por primera vez por George Gamow, en 1953, y en su solución participaron numerosos investigadores, empleando fundamentalmente métodos químicos y biológicos.

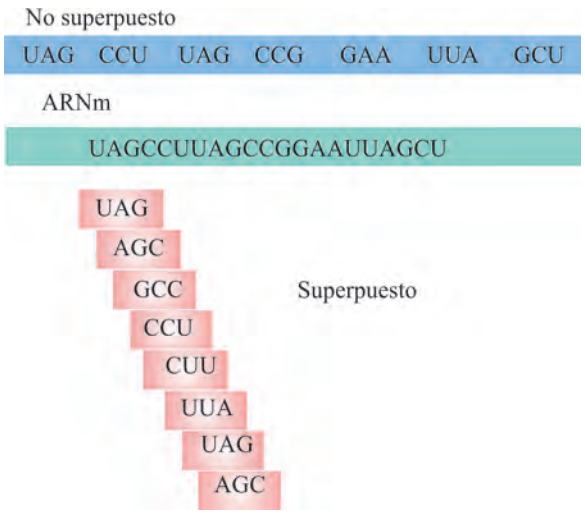
Gamow supuso que la cadena polipeptídica se forma directamente sobre la doble hélice del ADN, de manera que cada aminoácido se sitúa en un hueco entre cuatro nucleótidos; este hueco tendría aproximadamente la forma de un rombo. Dos nucleótidos pertenecían a una banda y dos a la otra. El "código de rombos rojos" de Gamow asegura precisamente las 20 letras, pues como utiliza cuatro bases, da origen a (4^4) 256 combinaciones; no obstante, esta forma de codificación directa imponía algunas limitaciones a la secuencia de aminoácidos de la proteína, lo que mostraba que una vez fijado un aminoácido, el siguiente no podía ser cualquiera de los 20, sino un número muy reducido de estos. Sin embargo, las investigaciones demostraron que tal limitación no existía en las proteínas, cuyas secuencias de aminoácidos eran conocidas.

El descubrimiento de que la síntesis de proteínas se realizaba en una estructura citoplasmática (los ribosomas) y la existencia de los ARNm, rechazaron definitivamente la hipótesis de Gamow.

Por razonamientos teóricos se estableció la relación de codificación –que se comprobó después experimentalmente–, o sea, cuántas bases son necesarias para codificar un aminoácido. Como el lenguaje del ARNm solo tiene cuatro letras (A, U, G y C) y el de las proteínas 20, la relación no podía ser 1:1, ya que las proteínas constarían de cuatro aminoácidos; si fueran combinaciones de dos bases, alcanzaría para ($4^2 = 16$) 16 aminoácidos; pero con tres bases ($4^3 = 64$), el número de combinaciones era mayor que el número de aminoácidos, por lo que quedó establecido que a cada aminoácido en la proteína le correspondían tres bases en el ARNm, y la relación de codificación es 3:1. Este triplete de bases, por ser la unidad de codificación, recibió el nombre de codón.

Teniendo en cuenta que son posibles 64 combinaciones de bases y que solo 20 aminoácidos diferentes se incorporan en la síntesis de proteínas, se deduce que al menos para algunos aminoácidos existe más de un codón, o sea, el código se degenera. Los codones que se traducen en el mismo aminoácido se denominan sinónimos.

Otra consideración importante se refiere a la forma en que el ARNm es traducido, si el código es o no superpuesto. Si el código no es superpuesto, cada base nitrogenada formará parte de un solo codón, mientras que si fuera superpuesto formaría parte de más de uno:



Esta alternativa se pudo resolver teniendo en cuenta que se conocía la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas. Si el código fuera superpuesto, un cambio en una base ocasionaría el cambio de más de un aminoácido continuo en la proteína. Sin embargo, eran conocidas algunas proteínas en las cuales solo se producía el cambio de un aminoácido por otro, lo que implica que el código no es superpuesto. Por ejemplo, en la drepanocitosis la cadena β de la hemoglobina muestra un cambio de glutámico por valina en la posición 6, pero el resto de los aminoácidos no están cambiados.

Por tanto, las tres primeras características del código fueron: que estaba formado por tripletes (codones), estos no eran superpuestos, y el código tenía carácter degenerado.

Descifrado del código

Los primeros experimentos encaminados a descifrar el código fueron realizados por Marshall Niremberg y Heinrich Mathei, en 1961. Ellos tuvieron un éxito inicial al conseguir un extracto celular estable que sintetizaba proteínas activamente, y lograron dirigir la síntesis de un polipéptido por traducción de un polirribonucleótido sintético que actuaba como ARNm (Fig. 28.1).

Este sistema fue útil no solo en dilucidar el código genético, sino también para esclarecer muchos aspectos relacionados con el mecanismo de síntesis de proteínas.

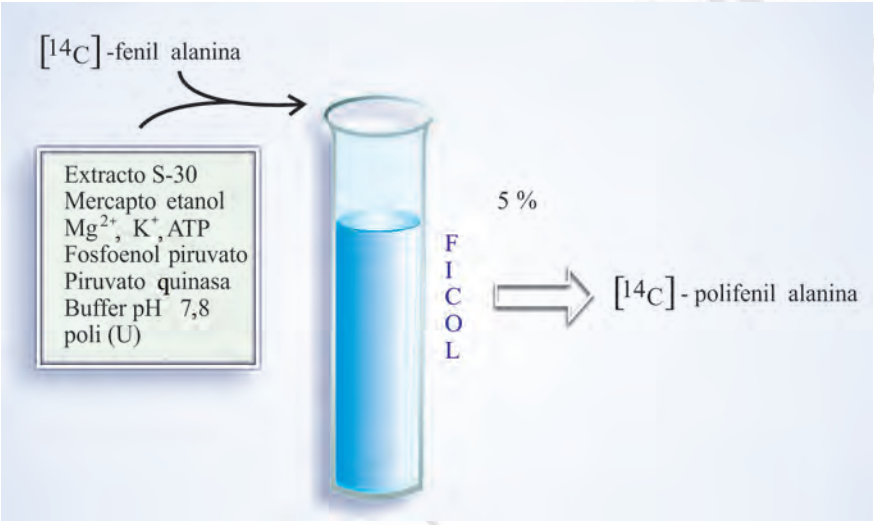


Fig. 28.1. Obtención de extractos celulares, sintetizadores de proteínas. Las bacterias son trituradas con alumina, como abrasivo, y se le añade desoxirribonucleasa que, al hidrolizar el ADN, evita que en el extracto pueda aparecer ARNm endógeno. Una primera centrifugación a baja velocidad elimina la alúmina y los restos celulares que no están bien homogenizados. Una segunda centrifugación a 30 000 g (esto es 30 000 veces el valor de la gravedad) sirve para eliminar membranas y paredes celulares, lo que deja un sobrenadante denominado S30 (sobrenadante de 30 000 g), con el que se realizaron los primeros experimentos. Una tercera centrifugación a 100 000 g permite separar los ribosomas y a partir del sobrenadante S100 se pueden obtener los ARNt y las enzimas activadoras. El preparado S100 se utilizó en experimentos posteriores.

El modelo experimental

Los polinucleótidos se sintetizaron utilizando una enzima –polinucleótido fosforilasa–, descubierta en 1955 por Marianne Grumberg Manago y Severo Ochoa. Esta enzima se diferencia notablemente de la ARN polimerasa, ya que utiliza como sustratos los nucleósidos difosfatados; como no libera pirofosfato, su acción no progresa acoplada a la hidrólisis de este, y lo más importante es que esta enzima no es dirigida por un molde de ADN, por lo que la secuencia del polinucleótido es dictada al azar por la proporción relativa de los diferentes nucleósidos difosfatos, presentes en la mezcla de reacción.

El procedimiento consistía en preparar un conjunto de tubos de ensayo, de composición similar, en cada uno de los cuales se añadía un aminoácido diferente, marcado con ^{14}C.

Composición de los codones

Cuando al sistema se le añadía poliuridina, se obtenía la formación de polifenilalanina. Se logró, de esta manera, descifrar la primera palabra del código: el codón UUU significa fenilalanina (Fen).

Por un procedimiento similar se pudieron asignar otras dos palabras: el CCC para la prolina (Pro) y el AAA para la lisina (Lis). Los polímeros de poliguanosina no pudieron emplearse porque forman una compleja estructura tricatenaria que no sirve de matriz para la traducción.

La etapa siguiente consistió en determinar la composición –no la secuencia– de los demás tripletes. Si la enzima polinucleótido fosforilasa se incuba con UDP, el resultado, por supuesto, es el poli U. Si se incuba con UDP y GDP, se obtiene un copolímero que contiene U y G. La secuencia de bases es azarosa, pero controlando la proporción de nucleótidos se puede calcular la frecuencia con que deben producirse cada uno de los codones. La tabla 28.1 muestra los resultados obtenidos en un polinucleótido, preparado a partir de una mezcla que contenía 76 % de U y 24 % de G.

Si se utiliza este polímero en un sistema como el descrito antes, con 20 tubos de ensayo que contengan los 20 aminoácidos, pero solo uno de estos marcado con ^{14}C, se puede medir la frecuencia con que cada aminoácido se incorpora al polipéptido que se sintetiza (Tabla 28.2).

Tabla 28.1. *Frecuencia relativa de tripletes de bases, obtenidas al controlar la proporción de cada una en la mezcla de reacción*

Triplete	Probabilidad	Frecuencia
UUU	0,76 × 0,76 × 0,76 = 0,439	100
UUG	0,76 × 0,76 × 0,24 = 0,139	31,6
UGU	0,76 × 0,24 × 0,76 = 0,139	31,6
GUU	0,24 × 0,76 × 0,76 = 0,139	31,6
UGG	0,76 × 0,24 × 0,24 = 0,043	10,0
GUG	0,24 × 0,76 × 0,24 = 0,043	10,0
GGU	0,24 × 0,24 × 0,76 = 0,043	10,0
GGG	0,24 × 0,24 × 0,24 = 0,012	3,1

Nota: aparecen cuatro clases de frecuencias para los ocho codones posibles.

Tabla 28.2. *Composición de los codones según la frecuencia de incorporación de los aminoácidos*

Aminoácido	Cantidad incorporada	Composición del codón
Fen	100	3 U
Val	37	2 U + 1 G
Leu	36	2 U + 1 G
CyS	35	2 U + 1 G
Trp	14	2 G + 1 U
Gli	12	2 G + 1 U

La comparación de los dos resultados sugiere que los codones correspondientes a la valina (Val), cisteína (Cis) y leucina (Leu) contienen dos U y una G, mientras que los del triptófano (Trp) y glicina (Gli) contienen dos G y una U.

Por variaciones en la composición del polímero se lograron otras combinaciones hasta determinar todos los codones que contenían U, después se procedió de igual forma

para los que contenían C y, por último, los que tenían A. Los de G no se determinaron por las razones expuestas.

Mediante este procedimiento se pudo conocer la composición (no la secuencia) aproximadamente de 50 codones.

Otros experimentos de gran relevancia fueron realizados para asignar los codones que faltaban y comprobar los existentes.

Orden de las bases en los codones

Una nueva línea experimental fue asumida por Niremberg y otros. En 1964 se conocía que algunos polinucleótidos sintéticos estimulaban la unión de los ARNt con sus aminoácidos correspondientes y los ribosomas, este complejo de tres componentes podía ser identificado por el método de ultracentrifugación, en un gradiente de densidad de sacarosa. Desafortunadamente, este método de análisis era demasiado laborioso, así, Niremberg y otros diseñaron una forma ingeniosa y rápida para aislar el aminoacil-ARNt unido al ribosoma y al ARNm, utilizando un filtro de nitrocelulosa. Los ribosomas quedaban adheridos al filtro, sin embargo, los aminoacil-ARNt pasaban por el filtro fácilmente, excepto si se encontraban unidos a los ribosomas. En particular Niremberg y Phillip Leder (1964) fueron capaces de inducir la unión de FenARNt al ribosoma, utilizando poli U sin otro homopolímero, el complejo formado fue retenido en el filtro de nitrocelulosa. La utilización de copolímeros como ARNm sintéticos, traía como resultado la adsorción de aminoacil-ARNt ribosoma, cuyo aminoácido coincidía con los resultados de los experimentos realizados en los sistemas libres de células. Estos experimentos también demostraron la existencia de un complejo formado por aminoacil-ARNt con el ARNm con el ribosoma, como intermediario durante la síntesis de proteínas.

Aún los trinucleótidos estimulaban la formación del complejo, dando una confirmación directa del carácter de tripletes del código genético. Niremberg se dio cuenta que era más fácil sintetizar trinucleótidos de secuencia conocida, que un ARNm; su trabajo, que comenzó con el triplete GUU correspondiente a Val, progresó rápidamente y alrededor de 50 de los 61 codones fueron asignados directa y convincentemente por este método.

Otra línea experimental diferente siguió Har Ghobind Khorana (1966), quien combinando procedimientos enzimáticos y de síntesis orgánica logró la síntesis de polinucleótidos de secuencia conocida, a partir de la polimerización de dinucleótidos; uno de estos fue el poli (AC) que produce ACACACACAC, el cual puede ser leído en grupos de tres bases como ACA|CAC|ACA|CAC, de manera que el polipéptido sintetizado, tomando este polímero como ARNm, constaría de dos aminoácidos alternantes, que fue el siguiente:

TreHisTreHisTreHis

Por los experimentos descritos antes, se sabía que la composición del codón de la treonina (Tre) era de dos A y una C, y el de His, de dos C y una A, por tanto ACA codifica para Tre y CAC para His.

La utilización del poli (UG) producía:

CisValCisValCisVal

con lo cual se comprobaba que UGU correspondía a Cis, y se asignó el GUG a Val.

Khorana logró también la polimerización de trinucleótidos, por ejemplo, el poli (UAC) que puede ser leído de tres formas diferentes:

UAC¦UAC¦UAC¦UAC¦UAC¦UAC¦UAC, que origina politirosina.
ACU¦ACU¦ACU¦ACU¦ACU¦ACU¦ACU, que codifica politreonina.
CUA¦CUA¦CUA¦CUA¦CUA¦CUA¦CUA, que forma polileucina.

Experimentos como estos permitieron no solo determinar la secuencia de muchos de los codones de composición conocida, sino, además, corroborar los que habían sido asignados por otros métodos. En 1968, Robert W. Holley, Har Gobind Khorana y Marshall W. Nirenberg, fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina, por su interpretación del código genético y la función de este en la síntesis de proteínas.

Codones de terminación

El carácter continuo de la secuencia de bases del ARNm y su lectura de tres en tres bases, es decir, por codones, hace necesario que en el mensajero exista una señal que indique dónde comenzar y dónde terminar la síntesis de la proteína. Esas señales no podían ser otras que codones o combinaciones de estos. Para que la síntesis concluya en un codón determinado, este no puede codificar a ningún aminoácido, lo cual es posible, pues el número de codones es más de tres veces el número de aminoácidos.

Si se utilizaba el poli (UAUC), la traducción podía comenzar en cuatro sitios diferentes:

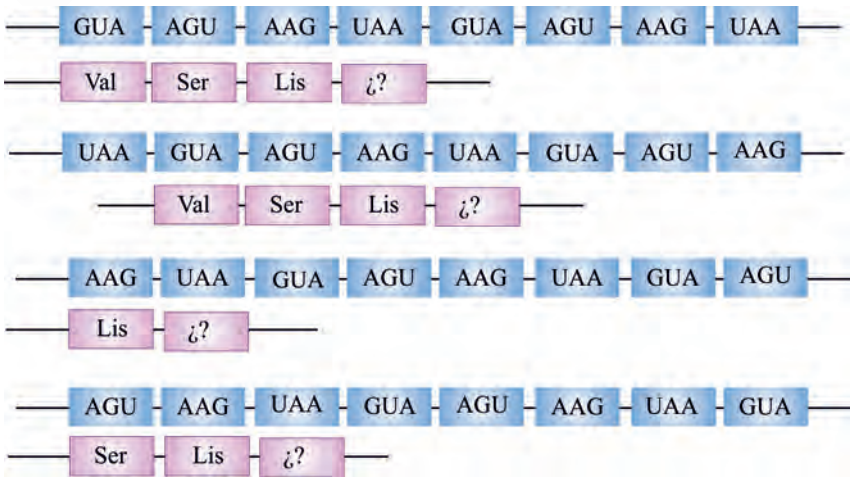
1. UAU|CUA|UCU|AUC|UAU|CUA|UCU|AUC|
2. AUC|UAU|CUA|UCU|AUC|UAU|CUA|UCU|
3. UCU|AUC|UAU|CUA|UCU|AUC|UAU|CUA|
4. CUA|UCU|AUC|UAU|CUA|UCU|AUC|UAU|

De esta manera se originan solo cuatro codones diferentes (UAU, AUC, UCU y CUA), producidos por la secuencia alternante TirLeuSerIle, que puede comenzar con cualquiera de estos. Esta situación se repetía con muchos polinucleótidos del tipo poli (MNPQ).

Cuando se ensayó el poli (GUAA), se esperaba encontrar un resultado similar, ya que este debe producir también cuatro codones y, por tanto, un tetrapéptido repetido:

1. GUA|AGU|AAG|UAA|GUA|AGU|AAG|UAA|
2. UAA|GUA|AGU|AAG|UAA|GUA|AGU|AAG|
3. AAG|UAA|GUA|AGU|AAG|UAA|GUA|AGU|
4. AGU|AAG|UAA|GUA|AGU|AAG|UAA|GUA|

Sin embargo, se encontró que no se producían largos polipéptidos, sino que se formaban solo dos productos: el tripéptido ValSerLis y el dipéptido SerLis. A partir de los codones ya asignados (Val=GUA, Ser=AGU y Lis=AGG) se pueden alinear los péptidos con los distintos tipos de secuencia y se obtienen los resultados siguientes:



Los resultados mostraron que la síntesis se detenía en el codón anterior al UAA y esto indicaba que UAA debía una señal de terminación.

Experimentos similares mostraron que el poli (AUAG) producía solo el tripéptido IleAspArg y el dipéptido AspArg, probando que UAG era otro codón de terminación. Por último, con poli (UGA) solo se formaban polimetionina y poliaspártico, lo que llevó a la conclusión que UGA era también un codón de terminación.

Como resultado de una broma de laboratorio a estos tres codones se les dieron nombres propios –ámbar para el UAG, ocre al UAA y ópalo al UGA– y estos se utilizan corrientemente en la literatura científica.

Codón de iniciación

En los sistemas in vitro la síntesis de proteínas comienza en cualquiera de las bases del polinucleótido sintético utilizado. La síntesis de proteínas in vivo requiere un triplete específico de bases, conocido como codón de iniciación. Por experimentos *in vitro* se ha podido determinar que el más utilizado para ello es el AUG, aunque en muy pocos casos también el GUG; esto fue corroborado más tarde en numerosos estudios de secuencias de ADN. Estos codones tienen además la función de codificar aminoácidos específicos –el AUG metionina y el GUG valina– para incorporarlos dentro de la cadena polipeptídica. En el capítulo 30 se explicará cómo la célula puede diferenciar una de otra.

Como resultado de todos estos trabajos, a finales de 1966 el código genético había sido descifrado completamente. El total de codones y su significado se muestra en la figura 28.2.

Segunda letra

Primera letra (5')	U	C	A	G	Tercera letra (3')
U	Fen	Ser	Tir	Cys	U
	Fen	Ser	Tir	Cys	C
	Leu	Ser	Ter	Ter	A
	Leu	Ser	Ter	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	GlN	Arg	A
	Leu	Pro	GlN	Arg	G
A	Ile	Tre	AsN	Ser	U
	Ile	Tre	AsN	Ser	C
	Ile	Tre	Lis	Arg	A
	Met/Ini	Tre	Lis	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gli	U
	Val	Ala	Asp	Gli	C
	Val	Ala	Glu	Gli	A
	Val	Ala	Glu	Gli	G

Fig. 28.2. Código genético quasiuniversal. Estructura actual del código genético. Nótese que en la mitad izquierda predominan los aminoácidos apolares y en la derecha, los polares; estas dos mitades difieren en que la segunda base sea pirimidínica a la izquierda, o purínica a la derecha. Ocho de las 16 casillas están ocupadas por el mismo aminoácido, lo que significa que la tercera base es redundante. Solo dos aminoácidos están codificados por un codón cada uno. INI se refiere al codón de iniciación y TER a los de terminación.

Aunque el código fue descifrado por experimentos in vitro, la exactitud de la asignación de cada codón ha sido confirmada por análisis genéticos y bioquímicos. La reciente tecnología de secuenciación del ADN ha dado la confirmación definitiva a este problema, que parecía un sueño casi imposible, cuando fue postulado en 1953 y que poco más de 10 años después quedaba totalmente resuelto.

Universalidad del código

Otro hecho importante, ocurrido en la década de los 60, fue la demostración del carácter universal del código genético. En 1967, Marshall y sus colaboradores encontraron que aminoacil-ARNt procedentes de roedores, anfibios y *E. coli* eran reconocidos por el mismo codón. El desciframiento del código y su carácter universal representan dos de los descubrimientos más importantes en biología y han tenido un efecto profundo en el desarrollo de la ciencia.

Sin embargo, estudios posteriores mostraron que existían variaciones del código, tanto en diferentes organismos como en el mismo organismo, entre el genoma nuclear y el de las mitocondrias.

El codón AUG actúa como iniciador en la traducción y para la incorporación de metionina en el interior de la proteína. Sin embargo, la presencia de AUG no es suficiente para iniciar la traducción, pues se requiere de proteínas iniciadoras y secuencias de nucleótidos en la vecindad de AUG. Se han identificado zonas de iniciación en ARNm de muchos organismos que carecen de AUG. Algunos procariontes como *E. coli* utilizan, además, los codones GUG y UUG como iniciadores y curiosamente en todos los casos el aminoácido incorporado es N-formil-metionina. El mecanismo discriminador que asegura una iniciación adecuada requiere que el AUG se encuentre formando parte de una secuencia óptima, que en eucariontes está representada por la secuencia consenso de Kozak (la secuencia óptima es GCC(A/G)CC**AUG**G), pero algunas variaciones existen sin modificar su función.

Las diferencias entre el genoma nuclear y el mitocondrial, en la mayoría de los casos, solo representan una nueva asignación del significado del codón universal. Por ejemplo, los codones AAG y AAA que en el código nuclear significan lisina, en el mitocondrial lo hacen para asparagina.

Estudios más recientes han identificado la selenocisteína y la pirrolisina como los aminoácidos 21 y 22 presentes en las proteínas. Estos aminoácidos están codificados por los codones UGA y UAG respectivamente, es decir, por codones de terminación.

La selenocisteína (Sec) se forma a partir del Ser-ARNt. Primero se produce la fosforilación de la serina y después el fosfato es desplazado por el selenio. La incorporación de Sec necesita que el codón UGA se encuentre ubicado en una zona en forma de asa y de proteínas accesorias, incluyendo un factor de elongación específico. La prirrolisina no se tratará en este capítulo, pues no se han descubierto proteínas en eucariontes con ese aminoácido.

Estructura del código

La estructura del código genético ha llevado a la solución de muchas incógnitas acerca de la existencia y la evolución de los seres vivos. Mucho se ha escrito y especulado acerca de la forma de organización del código, tratando de descubrir cuáles son las leyes que subyacen en su organización. Aunque este objetivo no parece haberse alcanzado totalmente, se han podido señalar algunas de sus regularidades más sobresalientes.

El punto central de la atención ha sido el carácter degenerado del código. Para 32, o sea, la mitad de los codones, se tiene una degeneración completa de la tercera base, el aminoácido queda codificado totalmente por las dos primeras bases (por ejemplo, UC codifica Ser); para los demás (con la excepción de las parejas UGA/UGG y AUA/AUG) la degeneración es casi completa, pues solo requiere el carácter purínico o pirimidínico de la tercera base. De esta manera los codones del tipo XYU y XYC siempre son sinónimos, al igual que los del tipo XYA y XYG, con las excepciones mencionadas (Tabla 28.3).

Teniendo esto presente, se pueden agrupar los codones solo por las dos primeras bases, en dos grupos de ocho cada uno: en el primer grupo los pares XY, que codifican los aminoácidos con independencia total de Z y, en el segundo, los que varían según Z sea purínica (Pu) o pirimidínica (Pi).

La columna N indica el número de puentes de hidrógeno que puede formar la pareja XY al unirse a un par complementario (X'Y'). El valor N pudiera llamarse grado de complementariedad, que en el primer grupo es 6 y 5 (promedio 5,5) y en el segundo 5 y 4 (promedio 4,5). Se puede pensar que mientras mayor sea N, menor valor tendrá la interacción ZZ', ya que la unión XYX'Y' es suficientemente estable. El valor de la tercera base será discutido nuevamente en el siguiente acápite. Estas características han hecho suponer que el código primitivo era solo de dos letras y que ha evolucionado hacia su estado actual de tres letras (Tabla 28.4).

Tabla 28.3. *Grupo I de codones, donde las dos primeras bases son suficientes para la codificación del aminoácido*

X	Y	N	Aminoácido
G	G	6	Gli
G	C	6	Ala
C	G	6	Arg
C	C	6	Pro
C	U	5	Leu
G	U	5	Val
A	C	5	Tre
U	C	5	Ser

Nota: grupo I. Para el codón XYZ. Z = (A, G, C, U).

Tabla 28.4. *Grupo II de codones, donde la tercera base tiene una función determinante*

X	Y	N	Aminoácido	
			Z=Pu	Z=Pi
G	A	5	Glu	Asp
A	G	5	Arg	Ser
U	G	5	Trp/Ter	CyS
C	A	5	GlN	His
A	A	4	Lis	AsN
A	U	4	Ile/Met	Ile
U	A	4	Ter	Tir
U	U	4	Leu	Fen

Nota: grupo II. Para el codón XYZ.

La secuencia de bases del ARNm codifica solo la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, como fue estudiado en la sección de biomoléculas, la estructura tridimensional de las proteínas está determinada, en gran parte, por la secuencia de aminoácidos. A su vez, la estructura tridimensional determina la función de la proteína. Por lo tanto, alteraciones en la secuencia pueden ocasionar alteraciones de la conformación y de la función. Recordemos que en la estructura tridimensional o conformación influye

notablemente la polaridad de la cadena R de los aminoácidos, los de carácter apolar son los determinantes en el plegamiento de la cadena.

Tomando como referencia el código genético (Fig. 28.2) se puede llegar a las siguientes conclusiones: en general, el movimiento desde arriba hacia abajo, es decir, cambios en la primera base de los codones, no modifica sensiblemente la característica de polaridad de los aminoácidos. En la primera columna se agrupan los aminoácidos apolares (fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina). La segunda columna es más heterogénea, pues contiene aminoácidos polares (serina y treonina) y apolares (prolina y alanina). En la tercera columna todos son polares, iónicos o no, con la excepción de los dos codones de terminación. En la cuarta predominan los polares, con la única excepción de la glicina y un codón de terminación. Por lo tanto, los cambios de la primera base en un codón repercuten en menor medida sobre la estructura de la proteína.

No sucede así con los cambios en la segunda base. Al cambiar la segunda base se produce un desplazamiento del aminoácido de una columna a otra; anteriormente se vio que las columnas se distinguen por la polaridad de los aminoácidos que contienen. Así, por ejemplo, el cambio X-A-Y por X-U-Y resulta en el cambio de un aminoácido polar iónico por uno apolar. Es el cambio presente en la drepanocitosis, donde uno de los codones GAA o GAG (ácido glutámico) es cambiado por GUA o GUG (valina).

Los cambios menos nocivos son de la tercera base, debido a lo explicado en párrafos anteriores.

Tomando como referencia la figura 28.3, en esta se muestran todos los cambios posibles para el codón GUG (valina). Se puede observar que de nueve combinaciones posibles, solo en un caso, donde se cambia la segunda base, hay una modificación considerable de la polaridad (GUG=valina por GAG=glutámico) y este podría influir notablemente en la estructura de la proteína. En codones de otros aminoácidos apolares esto es menos evidente, pero en general dos de cada tres cambios no provocan alteraciones en el carácter apolar del residuo de aminoácido.

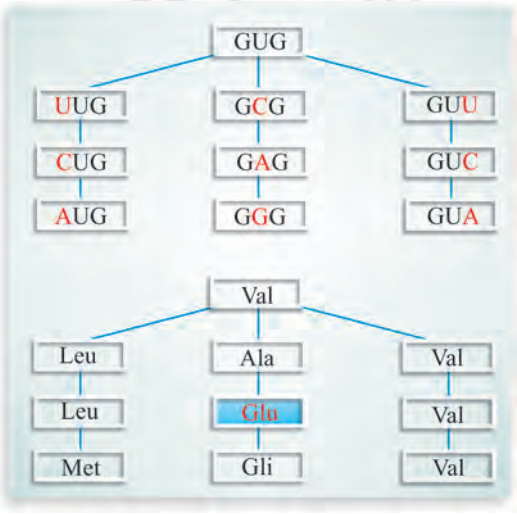


Fig. 28.3. Importancia del carácter degenerado. A partir del codón GUG se pueden obtener nuevos codones, cambiando una sola base cada vez. Sin embargo, en tres ocasiones el significado del codón no cambia y de las nueve posibilidades solo en un caso se altera el carácter polar del aminoácido codificado.

No obstante lo expresado anteriormente, en ocasiones existen aminoácidos que son tan valiosos en la estructura de la proteína, que no admiten ser cambiados por ningún otro, aunque este sea muy semejante, por ejemplo, un aminoácido cuya cadena R aporte el grupo catalítico al centro activo de una enzima; la glicina que se encuentra en los giros no puede ser sustituida por otro aminoácido, por una razón de espacio, pues donde puede alojarse el átomo de hidrógeno de la cadena R de la glicina no es posible acomodar a ningún otro aminoácido.

Descodificación

La descodificación de un código consiste en poder pasar del lenguaje codificado a otro lenguaje. Una vez conocido el código genético, o sea, la relación entre la secuencia de bases del ARNm y la de aminoácidos de las proteínas, es necesario conocer cómo se realiza el proceso de descodificación y cómo se logra la conversión de un lenguaje a otro. Al estudio detallado de los mecanismos de este proceso está dedicado el capítulo 30. Ahora solo se estudiará brevemente el fundamento del proceso de descodificación.

Para poder descifrar el código hace falta otro tipo de ARN, el de transferencia, cuya estructura fue estudiada en la sección de biomoléculas. Es necesario recordar que en estas moléculas existen dos sitios bien definidos que ocupan los extremos de la estructura de la "L". En uno de ellos (el extremo 3'OH) se encuentra el triplete 5'CCA3' a cuyo 3'OH se une un aminoácido específico; en el otro extremo se encuentra el asa anticodón con su secuencia característica 5'PiUXYZ—Pu (modificada)3', donde XYZ representa el anticodón. Este triplete es el que se une al codón del ARNm durante la traducción, por la formación de pares de bases complementarias. Por ejemplo, si el anticodón tiene la secuencia 5' AAA3', su codón complementario será el UUU. A este tipo de ARNt se unirá por el extremo 3'OH el aminoácido fenilalanina. Si el anticodón fuera 5'GGG3', se complementaría con el codón 5'CCC3' y el ARNt llevaría en el extremo 3'OH a la prolina. La reacción de unión del aminoácido al ARNt correspondiente se estudiará con más detalles en el capítulo 30.

Teniendo en cuenta que existen 61 codones que codifican aminoácidos, cabría suponer la existencia de 61 tipos de ARNt con sus anticodones correspondientes a cada uno de los codones del ARNm. Esta idea fue sustentada inicialmente al hallar que cuando se purificaba ARNt de la leucina (leuARNt) y se examinaba en un sistema artificial de síntesis de proteínas, existía una especie (leuARNt$_{I}$) que incorporaba el aminoácido cuando se utilizaba poli (UC), pero no al emplear poli (UG), mientras otra especie (leuARNt$_{II}$) lo hacía con el segundo, pero no con el primero, esto significa que el leu ARNt$_{I}$ lee el codón CUU y el leuARNt$_{II}$, el GUU.

Sin embargo, la idea de un codón para un ARNt no prosperó mucho tiempo, debido a los experimentos de Holley, quien logró establecer la secuencia completa de bases del alaARNt de levadura. Esta molécula lee tres (GCU, GCC y GCA) de los cuatro codones de la alanina. El examen de la secuencia de las zonas no apareadas mostró que en un solo sitio había una secuencia 5' GC3', por lo que esta pareja debía ser parte del anticodón (se debe recordar que por convención, las secuencias de los ácidos nucleicos se escriben del extremo 5' al 3' y el apareamiento se realiza en sentido antiparalelo, por lo que el codón 5' AUC3' debe tener un anticodón 5'GAU3').

Esto implicaba que el anticodón fuera la secuencia 5'IGC 3', en la cual I simboliza el nucleótido raro de inosina. Como el alaARNt reconoce los tres codones (GCU, GCC y GCA), entonces la inosina no forma puentes de hidrógeno o puede formarlos con U, C y A. Si fuera la primera situación, también leería el codón GCC, lo cual no sucedía, por tanto, I puede formar puentes de hidrógeno, aunque no sea en la forma de los pares habituales UA y GC (Fig. 28.4).

La presentación de la inosina en el anticodón se debe a que siempre que en la primera posición aparezca A en el transcrito primario, esta es desaminada enzimáticamente y produce hipoxantina, que es la base que forma parte de la inosina.

La explicación a este fenómeno fue propuesta por Francis Crick (1965), con la idea del acoplamiento vacilante *(wobble)*. Hasta ese momento se creía que apareamientos diferentes de AU, AT y GC no aparecían en los ácidos nucleicos. Esto es cierto en el ADN, por las características estructurales de la molécula, como se estudió en la sección de biomoléculas. Sin embargo, como el apareamiento del codón con el anticodón se produce entre dos moléculas de ARN, no es necesario conservar la estructura regular de la doble hélice.

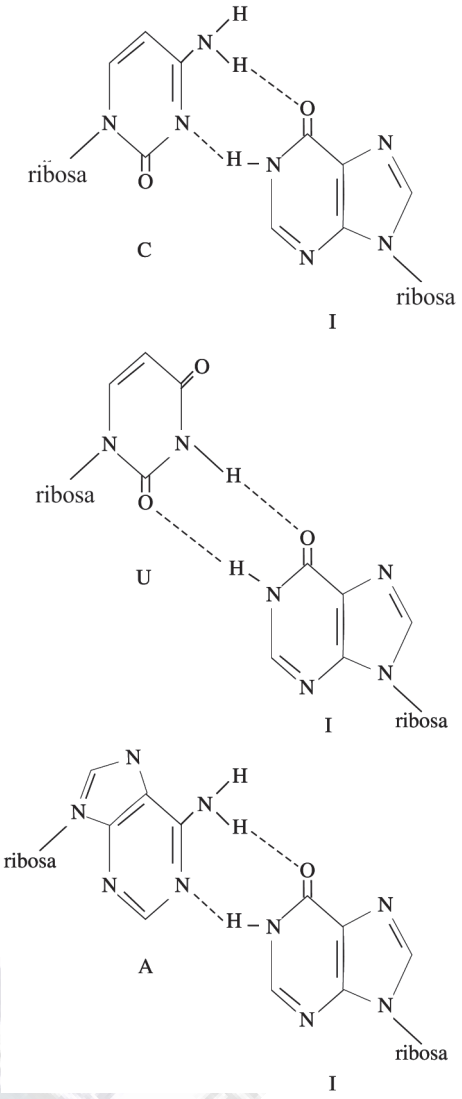


Fig. 28.4. La inosina como formadora de pares de bases. La inosina (I) puede formar pares de bases con la citosina (arriba), uracilo (centro) y adenina (abajo), por lo cual su aparición en el anticodón del ARNt no impide el apareamiento con el codón del ARNm. La aparición de la inosina en la primera posición del anticodón permite que varios codones sean leídos por el mismo ARNt.

Crick demostró que pueden existir otros apareamientos en la interacción de codones y anticodones, pero que esto requería, en primer lugar, que las dos primeras bases formaran apareamientos típicos, para que se garantizara una estabilidad máxima y, en segundo lugar, que el tercer par de bases no produjera mucha distorsión, como ocurre habitualmente entre dos purinas, identificando como posibles los apareamientos que se muestran en la figura 28.5.

La posibilidad de formar los cuatro pares adicionales de bases (AI, UI, CI y GU) explica cómo una sola molécula de ARNt se puede aparear con varios codones.

Ahora es comprensible el caso de los alaARNt de levadura. Uno de estos, estudiado por Holley, que tiene el anticodón IGC, puede formar pares de bases con tres de los codones (GCU, GCC y GCA), pues la inosina se puede aparear con U, C y A. El otro –denominado alaARNtII– solo acopla con el codón GCG, para lo cual serían posibles dos anticodones –el CGC y el UGC–, ya que G puede formar pares de bases con C y U. Si fuera el UGC, entonces debía leer también GCG y GCA, pero como este no es el caso, el anticodón es CGC.

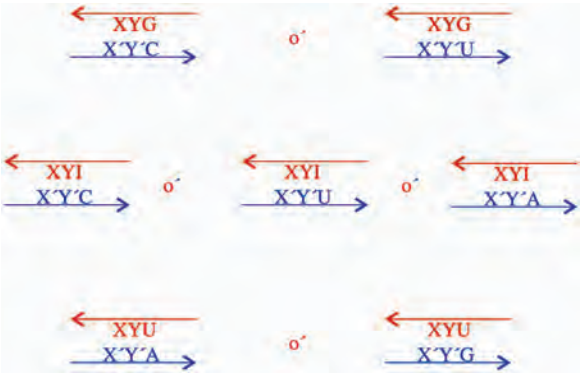


Fig. 28.5. Modelo de acoplamiento vacilante. Según la hipótesis del acoplamiento vacilante, en la union del codón con el anticodón pueden aparecer pares de bases que no se encuentran normalmente en el ADN. En cada caso el anticodón está en rojo y el codón, en azul. La flecha indica la direccion 5' → 3'. En todos los casos solo se representa la tercera base. Obsérvese que los codones que aparecen en la misma horizontal siempre son sinónimos.

Aunque en solución los trinucleótidos se aparean mal, pues su tamaño no les permite estabilizarse por las interacciones de apilamiento de bases, en el proceso de traducción estas interacciones entre el codón y el anticodón se estabilizan debido a varios factores:

- Tanto el codón como el anticodón forman parte de moléculas mayores, lo cual permite que la unión entre estos se pueda estabilizar por apilamiento de bases.
- Hacia el lado 5' del anticodón siempre hay una U, lo que sugiere que debe tener alguna participación en la estabilización de la unión del codón con el anticodón.
- El apareamiento se produce normalmente cuando ambos (ARNt y ARNm) están unidos a los ribosomas. Es posible que esa unión haga que el codón y el anticodón adopten una posición tal que la estabilidad de la unión sea máxima.

La posibilidad de un ARNt de leer varios codones limita el número de estos, necesarios para la traducción. Si cada ARNt leyera solamente un codón, harían falta 61 ARNt, sin embargo, en los seres humanos solo existen 51 moléculas de este tipo, una evidencia más de que las células operan según el principio de la máxima economía.

Resumen

Desde el punto de vista bioquímico el código genético es la relación de equivalencia entre la secuencia de bases nitrogenadas de los ARNm y la secuencia de aminoácidos de las proteínas. El codón es la unidad de codificación y está formado por tres bases, por lo que la relación de codificación es 3:1. Cada base nitrogenada del ARNm forma parte de un solo codón, lo que quiere decir que el código no es superpuesto. Por lo general cada aminoácido es codificado por más de un codón, lo que significa que el código es degenerado.

El descifrado del código fue posible gracias a dos grupos de trabajo, principalmente el de Niremberg y el de Khorana. El primero, mediante un sistema libre de células y polinucleótidos sintéticos, como inicio, y trinucleótidos de secuencia conocida, después, logró establecer la estructura de numerosos codones. El segundo, mediante el uso de polinucleótidos de secuencia conocida, confirmó las asignaciones hechas por Niremberg y estableció la secuencia de otros codones, entre estos los de terminación. A finales de 1966 el código estaba totalmente descifrado.

En general todas las bacterias, virus, hongos, vegetales y animales, utilizan el mismo código, aunque existen variaciones entre organismos y dentro del mismo organismo entre

el genoma nuclear y el mitocondrial, por ello en la actualidad se considera que el código tiene carácter *quasiuniversal*.

Los análisis de la estructura del código llevan a la idea de que su forma actual es resultado de un proceso evolutivo, en el cual se ha ido ganando en seguridad. El carácter degenerado posibilita amplias variaciones en la secuencia de bases del ADN, y, por tanto, del ARNm, sin modificar esencialmente la estructura primaria de las proteínas.

El proceso de descodificación se lleva a cabo en los ribosomas con la participación de los ARNt, que contienen el triplete anticodón, que al aparearse con el codón facilitan que cada aminoácido ocupe una posición precisa en la cadena polipeptídica. El apareamiento se produce con mayor fuerza en las dos primeras bases que en la tercera, lo cual explica que un mismo ARNt pueda leer varios codones.

Ejercicios

1. Como se observa en la figura 28.2 existen seis codones para Leu, Ser y Arg. ¿Cuál será el número mínimo de LeuARNt, SerARNt y ArgARNt que debe tener una célula para sintetizar proteínas eficientemente, si todos los codones son utilizados con la misma frecuencia?
2. El codón UAC codifica Tir y el UAG es un codón de terminación. ¿Podría un tirARNt aparearse al UAG y provocar que la síntesis de la proteína continuara más allá de su límite normal?
3. El codón de iniciación preferencial es el AUG, pero se ha comprobado que también puede emplearse el GUG y en ambos casos se incorpora Met. ¿Pudiera explicarse esta situación, suponiendo que un mismo ARNt pueda leer los dos codones?
4. Los ácidos aspártico y glutámico ocupan la misma casilla del código, difieren solo en la tercera base. ¿Cuáles deben ser los anticodones del aspARNt y el gluARNt para que en la cadena polipeptídica no pueda incorporarse uno de estos en vez del otro?
5. Un bioquímico afirmó haber establecido la secuencia de bases de un TirARNt, cuyo anticodón tenía la secuencia 5' ICA3', pero este hallazgo se puso en duda por todos sus colegas ¿Cuáles serían las razones que hicieron poner en duda el hallazgo anunciado?
6. Un ARNm es modificado artificialmente, incluyéndole una G entre los codones 15 y 16, y se observa que el polipéptido sintetizado difiere del original en la secuencia de aminoácidos, a partir del 16; después se hace una segunda modificación al ARNm y se observa que ahora la secuencia de aminoácidos del polipéptido solo difiere del original en los aminoácidos 16, 17 y 18. ¿En qué consistió la segunda modificación? ¿Cómo se pueden explicar los dos resultados obtenidos?

Ribosomas

Una vez esclarecido el aspecto informacional, empleado en el proceso general de expresión de la información genética, se tratarán los aspectos estructurales y funcionales de las partículas donde ocurre el fenómeno de descodificación, cuyo resultado es la síntesis de una molécula de proteína.

Los ribosomas fueron observados por primera vez con la ayuda del microscopio electrónico, por George Palade, en 1955, de manera que algunos autores aún los siguen denominando gránulos de Palade. Más tarde, se ha podido demostrar la presencia de estos en el citoplasma de todas las células animales y vegetales, hongos y bacterias, así como en algunos organelos citoplasmáticos, especialmente los cloroplastos de las células vegetales y las mitocondrias.

Los ribosomas son los componentes celulares más abundantes. En una bacteria en fase de crecimiento activo se pueden encontrar cerca de 20 000 ribosomas, los cuales contienen aproximadamente 10 % de las proteínas y 80 % de ARN celular. En eucariontes la proporción de proteínas es menor, pero mayor su número absoluto, y contienen la mayor parte del ARN celular.

Los ribosomas bacterianos se encuentran unidos al ARNm, que a su vez está unido al ADN. En el citoplasma de los eucariontes los ribosomas están comúnmente asociados con el citoesqueleto y en ocasiones con membranas del retículo endoplasmático; todo esto significa que durante la traducción no están libres en las células, sino asociados directa o indirectamente con alguna de las estructuras celulares.

El interés en el estudio de los ribosomas no radica solo en su participación en la síntesis de proteínas, sino, además, en el proceso de su propia formación a partir de sus componentes moleculares. También es de interés la interrelación funcional que se establece entre sus componentes, que se manifiesta en que estos, por separado, no pueden dar cuenta de ninguno de los principales eventos que suceden cuando todos están organizados en la forma adecuada.

Los avances tecnológicos alcanzados entre mediados de la década de los 60 hasta nuestros días, han permitido comenzar a desentrañar la estructura molecular de los ribosomas, la organización tridimensional y la biogénesis, así como han posibilitado una primera aproximación a la relación estructura-función de estos organelos.

Este capítulo comenzará por el estudio de los ribosomas bacterianos, especialmente los de la *E. coli*, lo que servirá de referencia para la comparación con los de otro origen.

Los aspectos funcionales de estas partículas, sin embargo, solo serán completamente comprensibles después del estudio del capítulo 30.

Primeros indicios

La historia del conocimiento de los ribosomas se remonta a los primeros años de la década de los 50. En aquellos momentos se descubrió que la capacidad de diversos tipos celulares para sintetizar proteínas, se relacionaba con el contenido celular de ARN y que la mayor proporción de este aparecía en forma de pequeñas partículas (que entonces denominaron microsomas) en el citoplasma celular; esto sugería que las partículas debían intervenir de alguna forma en la síntesis de proteínas, pero la importancia real de los ribosomas solo se puso de manifiesto después de algunos años de intensa investigación bioquímica.

El trabajo principal fue desarrollado por Paul C. Zamecnik y otros, quienes añadían a homogenatos de hígado de rata, aminoácidos marcados con ^{14}C y ATP como fuente de energía para lograr detectar la formación de pequeñas cantidades de proteínas. Mediante un proceso de eliminación llegaron a establecer que varios organitos celulares, entre estos el núcleo y las mitocondrias, no eran necesarios para la síntesis de proteínas, pero que los ribosomas eran esenciales. También lograron identificar otros componentes esenciales para la síntesis de proteínas, entre estos los ARNt y la enzima que une los aminoácidos a los ARNt correspondientes. Estos sistemas, sin embargo, producían una escasa cantidad de proteínas. Los avances posteriores se llevaron a cabo con los trabajos presentados por Marshall W. Niremberg y J. Heinrich Matthaei, acerca de los sistemas libres de células, descritos en el capítulo 28.

A partir de ese momento se comenzó el estudio intensivo de los ribosomas, la separación y la caracterización de sus componentes, la función de cada uno de estos en la traducción, el ensamblaje de la partícula y su regulación, que son los aspectos que se tratan a continuación. Por sus estudios sobre la estructura y la función de los ribosomas, Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath recibieron el Premio Nobel de Química, en el año 2009.

Composición molecular

Los ribosomas de todos los organismos están formados por varias moléculas de ARN, de ahí su denominacion ribosomal (ARNr), y numerosas proteínas.

Ribosomas de procariontes

Los ribosomas de la *E. coli* se han estudiado con mayor intensidad que los de cualquier otro organismo; al ser analizados en la ultracentrífuga presentan un coeficiente de sedimentación de 70 S, con una masa de partícula de 2 520 kD, y están constituidos por 66 % de ARN y 34 % de proteínas.

Esta partícula puede ser disociada en dos subunidades de tamaño desigual. La menor presenta un coeficiente de sedimentación de 30 S, se le conoce como subunidad 30 S, con una masa de 930 kD; está formada por una molécula de ARN de 16 S que tiene un total de 1 541 nucleótidos, para una masa molecular de 560 kD, lo que representa 60 % de la masa de la subunidad; el 40 % restante lo constituyen 21 proteínas, con una masa total de 370 kD, que se han designado S1 a S21 para indicar que pertenecen a la subunidad menor (*small*, pequeño) del ribosoma.

La subunidad mayor presenta un coeficiente de sedimentación de 50 S, se le conoce como subunidad 50 S, con una masa de partícula de 1 590 kD; está formada por dos moléculas de ARN, una de 23 S que contiene 2 904 nucleótidos y otra de 5 S que contiene 120 nucleótidos, que en total representan 70 % de la masa de la partícula; el 30 % restante lo constituyen 31 proteínas, designadas L1 a L34 (*large*, grande). Aunque se considera que hubo un error en la asignación inicial de los números a las proteínas, aún se sigue usando la numeración del 1 al 34. En la tabla 29.1 se resumen los aspectos principales de la composición de los ribosomas procariontes.

Tabla 29.1. *Composición molecular de los ribosomas de procariontes y eucariontes*

Propiedad	Procariontes	Eucariontes
Subunidad menor		
Masa de la partícula	$0{,}9 \times 10^6$	$1{,}44 \times 10^6$
ARN	16 S	18 S
Masa molecular	$0{,}51 \times 10^6$	$0{,}7 \times 10^6$
Proteínas	21	33
Masa molecular	8 300 - 25 800	11 200 - 41 500
Masa total de proteínas	$0{,}39 \times 10^6$	$0{,}74 \times 10^6$
Sedimentación	30 S	40 S
Subunidad mayor		
Masa molecular	$1{,}8 \times 10^6$	$2{,}8 \times 10^6$
ARN tipo/masa	5 S/40 000	5 S/39 000
	23 S/$0{,}98 \times 10^6$	5,8 S/51 000
		28 S/$1{,}7 \times 10^6$
Masa total de ARN	$1{,}02 \times 10^6$	$1{,}79 \times 10^6$
Proteínas	32	46
Masa molecular	5 300 - 24 600	11 500 - 41 800
Masa total de proteínas	$0{,}78 \times 10^6$	$1{,}05 \times 10^6$
Sedimentación	50 S	60 S

Se ha podido establecer tanto la secuencia de bases de los tres ARNr como la de aminoácidos de las 52 proteínas ribosomales. Por análisis de secuencia de ARNr de diferentes orígenes se han elaborado los modelos correspondientes de estructura secundaria de cada uno de los ARNr de la *E. coli*. En general se observa una gran conservación en la secuencia y la organización consiste en zonas pequeñas apareadas que alternan con regiones no apareadas (Fig. 29.1).

En cuanto a las proteínas no parecen presentar relación estructural alguna, según su secuencia de aminoácidos y sus propiedades inmunológicas. Existen dos excepciones: la S20 es idéntica a la L26 y en 80 % de los casos se aísla asociada con la subunidad menor, pero en algunos aparece en la mayor, lo que refleja, posiblemente, que se localiza en la zona de unión entre las dos subunidades. La L7 difiere de la L12 solo por presentar un grupo acetilo unido al grupo amino terminal. Esta proteína, designada L7/L12, forma dímeros en solución, por lo que existen dos dímeros por ribosoma. Todas las demás proteínas están presentes en una copia por ribosoma, lo cual significa que todos los ribosomas de una bacteria tienen exactamente la misma composición.

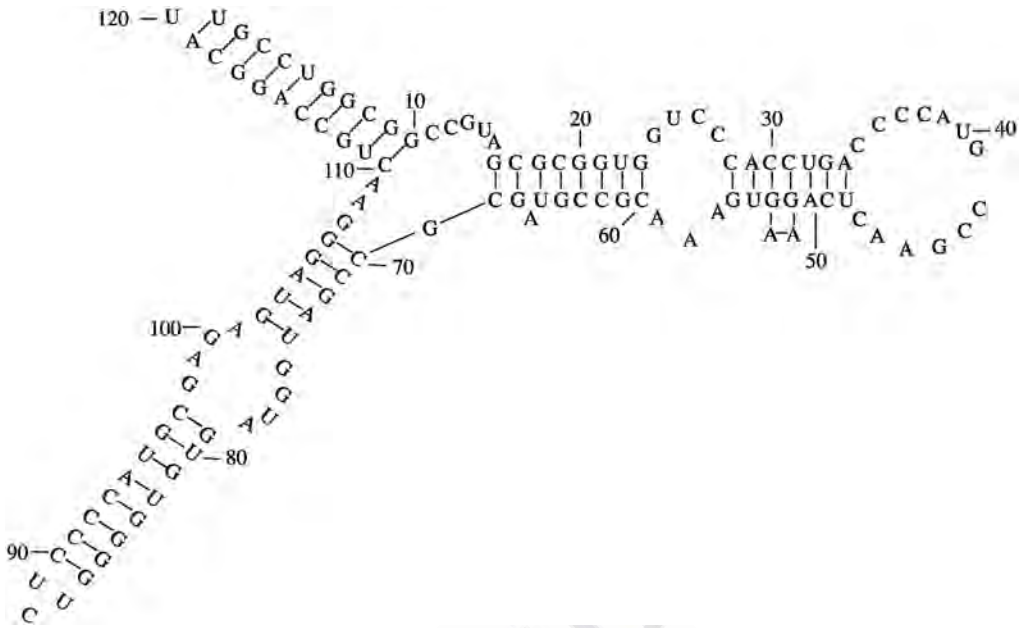


Fig. 29.1. Estructura secundaria del ARNr de 5 S, donde se muestra, como en los demás ARNs, una estructura que se caracteriza por la alternancia de zonas cortas de apareamiento y zonas de no apareamiento, también cortas.

Ribosomas de eucariontes

Los ribosomas del citoplasma de los eucariontes son más complejos que sus similares de procariontes. Presentan mayor tamaño, con un coeficiente de sedimentación de 80 S y una masa de partícula de 4 420 kD; están constituidos por 60 % de ARNr y 40 % de proteínas.

En los seres humanos la subunidad menor presenta un coeficiente de sedimentación de 40 S, con una masa de 1 400 kD, y está formada por una molécula de ARN de 18 S, que contiene 1 900 nucleótidos, con una masa total de 700 kD que representa 50 % de la partícula; 50 % restante corresponde a 33 proteínas, con un peso total de 700 kD, denominadas RPS (del inglés *ribosomal protein of small subunit*).

La subunidad mayor –de 60 S y masa de 2 820 kD– presenta en su composición tres moléculas diferentes de ARNr: una de 28 S, con 4 700 nucleótidos; otra de 5,8 S, con 160 nucleótidos, y la tercera de 5 S, con 120 nucleótidos; estos tres constituyen el 65 % del peso de la partícula, que incluye, además, 46 proteínas, denominadas RPL (del inglés *ribosomal protein of large subunit*). En la tabla 29.1 se muestran los aspectos principales de la composición molecular de los ribosomas eucariontes.

Además, los eucariontes presentan ribosomas en las mitocondrias, también formados por ARNr y proteínas que presentan un coeficiente de sedimentación de 55 S, con una masa de partícula de 2,7 MDa y una relación ARN/proteínas de ½. La subunidad menor o de 28 S contiene un ARNr de 12 S, con 950 nucleótidos más 29 proteínas. La subunidad mayor o de 39 S está formada por un ARNr de 16 S, con 1 560 nucleótidos y 50 proteínas. En estos ribosomas se realiza la traducción de los ARNm formados por transcripción del ADN mitocondrial.

Estructura tridimensional

Los ribosomas presentan una estructura tridimensional compleja, de acuerdo con la función relevante que realizan. El modelo asimétrico es el más aceptado como conformación general del ribosoma, en el cual la subunidad mayor aparece más o menos redondeada, con un diámetro aproximado de 23 nm.

La subunidad menor es una partícula asimétrica alargada hacia los polos en forma de letra "Y", con dimensiones aproximadas de 23 × 11 nm, esta se divide en dos partes desiguales por una especie de depresión: la menor se denomina cabeza y ocupa el tercio superior; la mayor se designa como base, de la cual sobresale una pequeña porción denominada plataforma, que está separada de la cabeza por una hendidura. La distribución del ARN y las proteínas es aproximadamente concéntrica, pero no homogénea, ya que las proteínas están hacia la periferia, y el ARN, que tiene una disposición en forma de V, está hacia el centro. Este modelo, que se representa en la figura 29.2 (a), ha sido confirmado con numerosas pruebas experimentales.

En contraste con la subunidad menor, la mayor se presenta como un bloque monolítico compacto, de aproximadamente 25 nm de diámetro, con una distribución más equitativa de su masa. Tiene tres protuberancias que difieren en su forma y tamaño: una protuberancia central redondeada y dos laterales: una de estas tiene forma de varilla y se extiende de 8 a 12 nm hacia un lado de la partícula; la protuberancia del lado opuesto es más bien redondeada. En una proyección perpendicular a la protuberancia aparece una muesca o depresión en la superficie de la partícula. La distribución de los ARN (hacia dentro) y las proteínas (hacia afuera) es más homogénea que en la subunidad 30 S; sus rasgos esenciales se muestran en la figura 29.2 (b).

La cara de la subunidad mayor que entra en contacto con la menor carece de detalles estructurales destacados, con la excepción de una extensa depresión flanqueada por una cresta de ARN. Esta cresta está formada por un dominio del ARNr y muestra mucha menos flexibilidad durante la traducción que la que muestra el ARNr de la subunidad menor. La depresión es lo suficientemente grande para acomodar el lazo aceptor hacia el extremo 3´-OH de tres ARNt y contiene el sitio activo para la formación del enlace peptídico.

Las posiciones donde se pueden encontrar los tres ARNt definen los tres sitios funcionales del ribosoma durante la traducción. Estos sitios se forman al unirse las dos subunidades ribosomales. El sitio P es donde se ubica el ARNt unido a la cadena polipeptídica (la denominación P por peptidil) en crecimiento después de la formación del enlace peptídico. El sitio A ubica al aminoacil-ARNt que entra al ribosoma de acuerdo con el codón del ARNm (el nombre A por aminoacil). Por último, el sitio E es el lugar que ocupa el ARNt después que el aminoácido que portaba ha sido incorporado a la cadena polipeptídica (el nombre E deriva de la palabra inglesa *exit*, que significa salida).

La subunidad menor está colocada asimétricamente sobre la mayor, lo cual permite que la plataforma de la menor entre en contacto con la subunidad mayor, ya que la depresión entre la cabeza y la base de la subunidad menor queda alineada con la muesca de la subunidad mayor, como se representa en la figura 29.2 (c).

La forma global de cada subunidad está determinada principalmente por la estructura de los ARNr, los cuales contribuyen a la mayor parte de la masa del organito. Las proteínas ribosomales se agrupan a los lados de los ARNr expuestos al solvente y en la periferia de la interfase entre las dos subunidades. Tanto la interfase entre las subunidades, como muchos sitios con un significado funcional, parecen estar carentes de proteínas. En la actualidad, la idea prevaleciente es que la función de las proteínas ribosomales es la de estabilizar las estructuras altamente compactas de los ARNr. Para eso, las proteínas están íntimamente entrelazadas con los ARNr, generan extensas interacciones con dominios de los ARNr, sobre todo en la subunidad mayor que es la más rígida. Muchas proteínas tienen extensiones largas, estrechas y básicas, que se enrollan alrededor del ARNr y penetran profundamente en la estructura del ribosoma.

Las proteínas ribosomales también interactúan con numerosas proteínas no ribosomales durante el proceso de la traducción. Además, algunas experimentan modificaciones postraduccionales reversibles, lo que hace pensar que están implicadas en mecanismos de regulación.

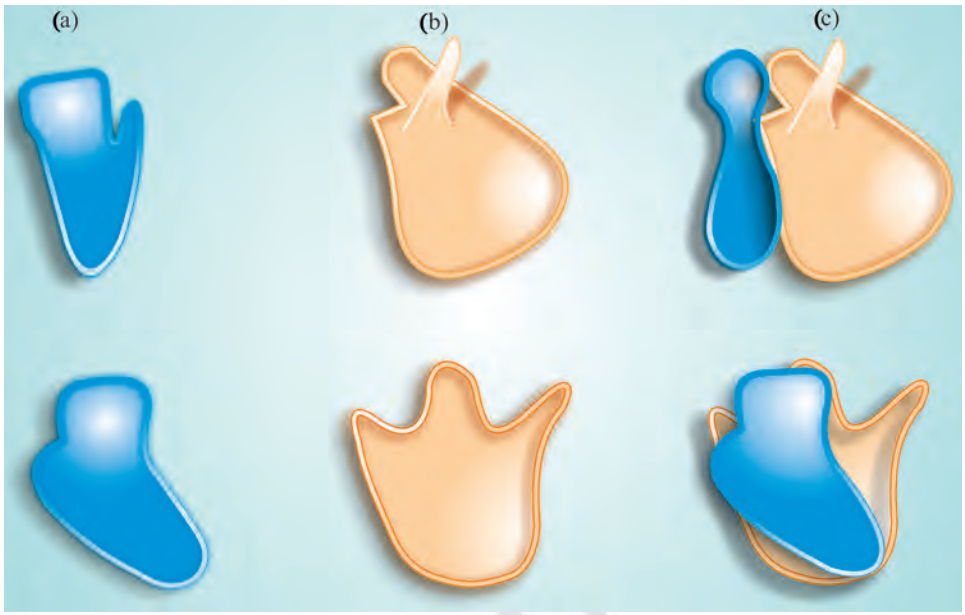


Fig. 29.2. Modelo asimétrico del ribosoma. Se muestra una vista frontal y otra lateral de la subunidad menor (a); mayor (b) y el ribosoma funcional (c), según el modelo asimétrico construido a partir de numerosos datos experimentales. En el texto se presenta la descripción detallada del modelo.

Localización de los componentes

Muchas de las proteínas y algunas zonas de los ARNr que componen los ribosomas han sido localizadas mediante diferentes procedimientos, entre estos, los de mejor resultado han sido los métodos inmunológicos asociados con la microscopia electrónica, la dispersión neutrónica y la formación de enlaces cruzados. A continuación se expone una versión simplificada de cada uno de estos, sus especificaciones, así como algunos de los resultados obtenidos.

Para el primero se procede de la forma siguiente: se obtienen las proteínas ribosomales, se aíslan y purifican; después cada una de estas, por separado, se utiliza, mediante métodos de inmunización, para obtener anticuerpos específicos para cada una de las proteínas ribosomales. A una suspensión de ribosomas se le añade un anticuerpo específico contra una de sus proteínas y después de dejar que la reacción antígeno-anticuerpo se lleve a cabo, la muestra se prepara para su observación por microscopio electrónico. Las microfotografías muestran la posición del anticuerpo sobre la superficie del ribosoma, detectando la posición que en él ocupa la proteína en estudio. La experiencia se repite utilizando otras proteínas y con los resultados se va creando una especie de mapa de localización de los componentes ribosomales. Es posible también formar anticuerpos específicos contra determinadas zonas de los ARNr y ubicarlas de forma parecida a las proteínas. Con este procedimiento se ha podido determinar la posición de varias proteínas, tanto en la subunidad menor como en la mayor (Fig. 29.3). Su limitación consiste en que solo es totalmente fiable cuando el componente a estudiar se localiza sobre la superficie de la partícula.

El método de dispersión neutrónica permite estudiar la estructura interna del ribosoma. Si una bacteria se hace crecer en un medio que contenga agua pesada (que contiene deuterio, isótopo pesado del hidrógeno y D_2O), sus proteínas (las ribosomales) contendrán el isótopo. Se procede entonces a realizar la reconstrucción del ribosoma, utilizando proteínas ligeras (que contienen hidrógeno), combinadas con dos proteínas pesadas (que contienen deuterio). Una vez reconstruidos los ribosomas, se les hace incidir un haz de neutrones que al atravesar la partícula se dispersa. El ángulo de dispersión es diferente para el hidrógeno y para el deuterio; si se mide, se puede determinar a qué distancia están las proteínas pesadas dentro del ribosoma. Repitiendo la experiencia con otras proteínas se puede ir ubicando la posición relativa de cada una de estas (Fig. 29.4).

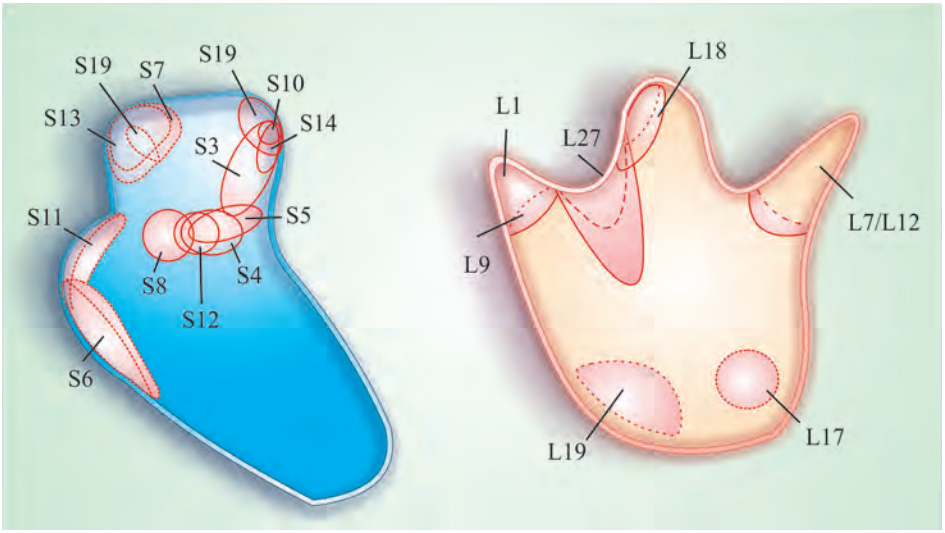


Fig. 29.3. Localización de proteínas ribosomales. Por diferentes procedimientos se ha podido determinar la posición que ocupan diferentes proteínas en la subunidad menor (izquierda) y mayor (derecha) en el ribosoma de la *E. coli*. En los ribosomas eucariontes, las proteínas homólogas ocupan posiciones similares.

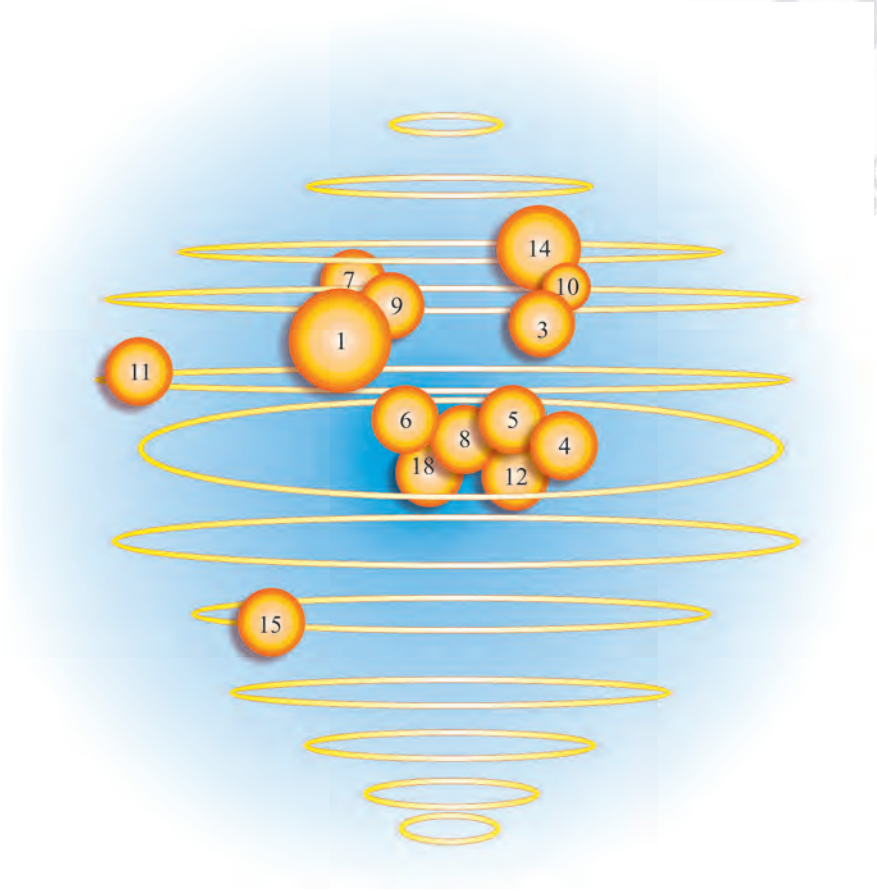


Fig. 29.4. Resultados de la dispersión neutrónica. Se muestran los resultados del método de dispersión neutrónica, aplicado a la subunidad 30 S del ribosoma de la *E. coli*.

La formación de enlaces cruzados se realiza tratando los ribosomas con algún reactivo que pueda formar enlaces covalentes entre grupos cercanos (el más empleado es el 2-iminotiolano); más tarde las partículas se disocian en sus componentes y por métodos electroforéticos se identifican los componentes que resultaron unidos por el agente entrecruzador. Este método permite conocer las moléculas que están más próximas unas a otras. Variando las características del reactivo se puede aumentar la distancia entre las proteínas que resultan unidas. Por métodos similares se puede conocer la disposición de

diferentes sectores de los ARNr; este procedimiento ha sido de suma importancia para conocer las moléculas que se encuentran ubicadas en la superficie de contacto entre las dos subunidades (Fig. 29.5).

Mediante el empleo de estos tres procedimientos en el estudio de los ribosomas de *E. coli* se ha podido localizar la posición de muchas proteínas en las dos subunidades y, además, algunos sitios funcionales, así, las proteínas S3, S7, S10, S14 y S19 se encuentran en la zona de la cabeza; S4, S5, S8 y S12, en la depresión que separa la cabeza de la base, y S6 y S11, en la plataforma. La protuberancia central contiene la L18 y los dos extremos del ARN 5 S; las cuatro moléculas de L7/L12 están en la rama de la derecha y la L1 y L9, en la cresta de la izquierda.

Por procedimientos diferentes se han podido conocer algunas de las zonas de interacción entre los ARNr y las proteínas (Fig. 29.6).

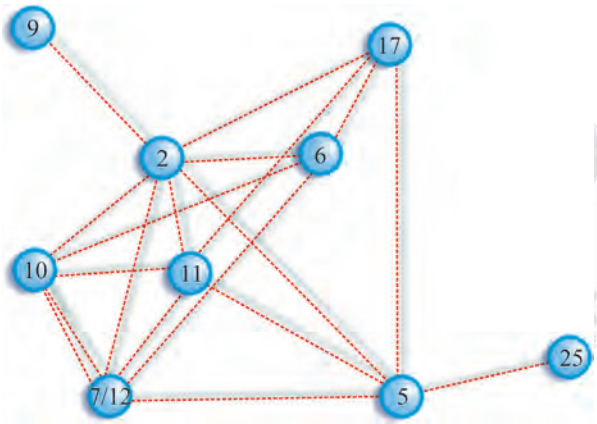


Fig. 29.5. Resultado de los experimentos de entrecruzamiento. A partir de los resultados obtenidos con los reactivos de entrecruzamiento, se ha construido este esquema de la subunidad mayor del ribosoma de la *E. coli*. Nótense las amplias relaciones estructurales de la proteína L2 y las escasas de L9 y L25.

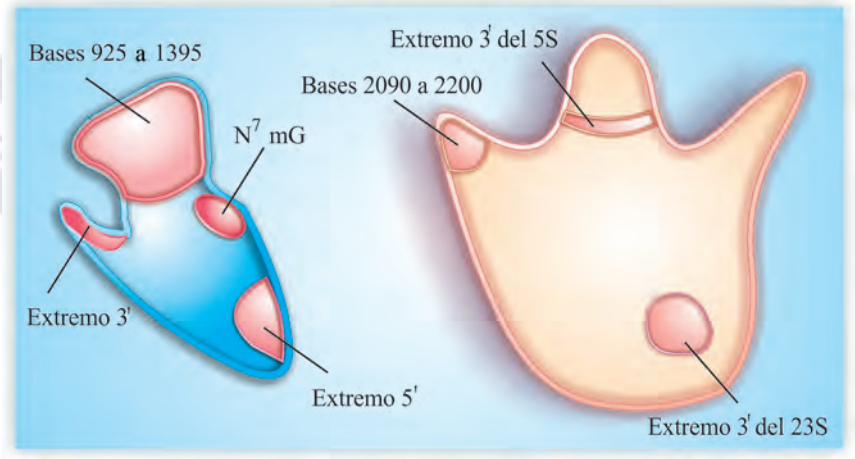


Fig. 29.6. Localización de los ARNr. Se muestran algunos sectores de los ARNr que se han localizado por diferentes procedimientos en la subunidad menor (izquierda) y la mayor (derecha) del ribosoma de la *E. coli*. En ribosomas eucariontes los detalles estructurales de los ARN ocupan posiciones similares.

Dominios funcionales

Los ribosomas de todos los organismos presentan en general dos regiones funcionales: la traduccional y la de salida o secreción, ubicadas en zonas opuestas. El dominio traduccional incluye la cabeza y la plataforma de la subunidad menor, así como la protuberancia central y las laterales de la subunidad mayor; es en este dominio donde han sido localizados varios sitios funcionales (Fig. 29.7).

Durante la traducción existe una especialización funcional de las dos subunidades, mientras en la de 30 S se produce el reconocimiento codón-anticodón, en la subunidad

50 S es donde se produce el enlace peptídico que unirá los aminoácidos durante la síntesis de las proteínas. Para la actividad ribosomal es necesario que las dos subunidades se encuentren unidas, debido a que dicha unión permite la formación de los sitios funcionales del ribosoma, como el P o peptidil, el A o aminoacil y el E o de salida. La función de estos sitios en la síntesis de proteínas se estudiará en el capítulo 30.

El sitio de unión de los aminoacil-ARNt se localiza en la zona de la cabeza de la subunidad menor y en esta misma zona es donde se unen otras proteínas que son necesarias durante el proceso de traducción (capítulo 30), también se encuentran los sitios de unión a los factores de iniciación y los factores de elongación (Fig. 29.8).

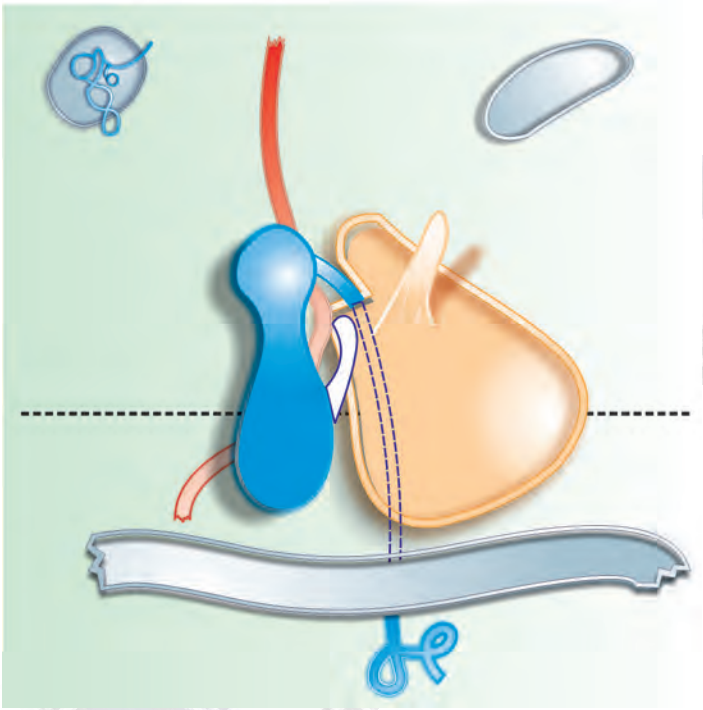


Fig. 29.7. Dominios en el ribosoma. Los ribosomas presentan dos dominios distinguibles: el traduccional, que aparece en la parte superior de la línea discontinua, y el de salida o secreción, que aparece en la inferior. Se muestra la unión al dominio traduccional de los ARNt y proteínas que intervienen en la traducción, así como el dominio de secreción unido a membranas celulares hacia donde está saliendo el polipéptido recién sintetizado. Obsérvese la existencia del túnel que recorre la subunidad mayor desde el sitio de formación del enlace peptídico hasta la salida. El ARNm se representa en rojo.

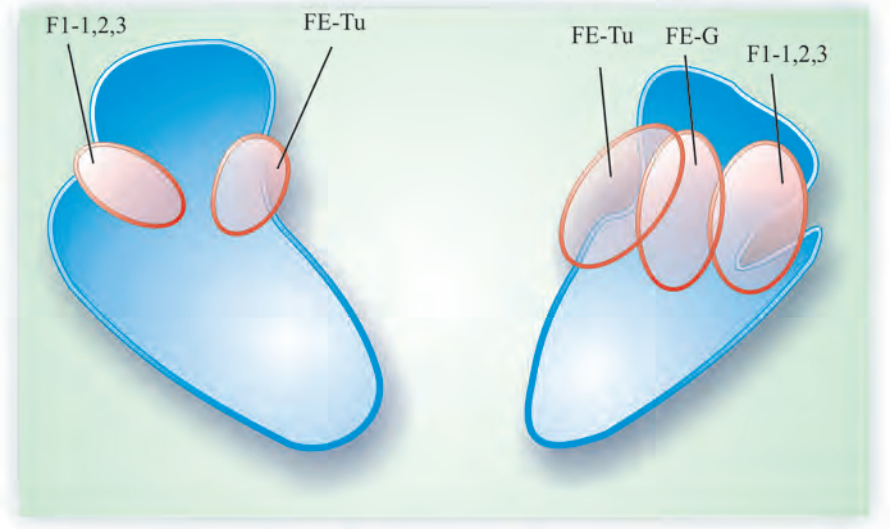


Fig. 29.8. Localización de interacción con proteínas no ribosomales. Se representa la zona de interacción de la subunidad menor con algunas proteínas no ribosomales que participan en la iniciación de la traducción. Para una explicación más detallada, consultar el capítulo 30.

Diferentes experimentos indican que el reconocimiento codón-anticodón ocurre en la plataforma que es sitio al cual se asocia el ARNm y el aminoacil-ARNt durante la síntesis de proteínas. La protuberancia derecha de la subunidad mayor está implicada en la hidrólisis de GTP, a la cual se encuentra acoplado el proceso de traducción.

La otra función de los ribosomas es la formación del enlace peptídico. La idea de que los ARNr pudieran ser el principal elemento funcional de los ribosomas no es nueva, pero ha sido confirmada por el hallazgo de que el sitio de formación del enlace peptídico está totalmente rodeado por ARN.

Se piensa que una adenina funciona como una base general con su N3 removiendo un protón del grupo α-amino del aminoacil-ARNt, lo cual facilita su ataque al peptidil-ARNt y devuelve, con posterioridad, el protón, estabilizando el grupo saliente después de la transferencia del peptidilo. La catálisis ácido-básica está muy bien establecida como mecanismo de las enzimas (Fig. 29.9).

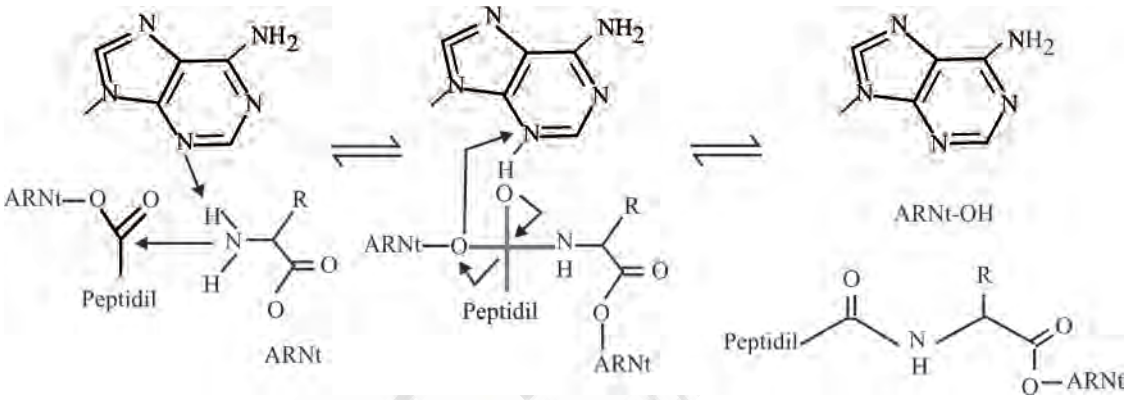


Fig. 29.9. Reacción catalizada por el centro de peptidil-transferasa. Una adenina del ARNr de 28 S realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo amino del aminoacil-ARNt. Por corrimiento de electrones se forma un intermediario inestable que conduce a la transferencia del grupo peptidilo del peptidil-ARNt hacia el grupo amino del aminoacil-ARNt, con liberación del ARNt que estaba unido al grupo peptidilo.

Si el dominio traduccional está bastante bien conocido, todo lo contrario sucede con el de salida o secreción. Pocas proteínas han sido localizadas en esta zona, por donde la cadena polipeptídica recién formada abandona el ribosoma.

En estudios realizados con microscopia electrónica se ha demostrado que en los ribosomas existe un túnel que sirve para la salida de la proteína. Este túnel tiene 12-10 Å de diámetro; se extiende desde el centro del lado interno de la subunidad mayor, donde radica la actividad de peptidil-transferasa, hasta el lado opuesto, alejado unos 80 Å, y termina en el dominio de salida.

Este túnel se va ensanchando a medida que se aleja del centro de actividad de la peptidil-transferasa y su extremo es lo suficientemente ancho para permitir la formación de α-hélices en las proteínas en proceso de síntesis.

En los eucariontes el dominio de salida está muy próximo al dominio de unión a membranas. De esta manera, cuando los ribosomas se unen al retículo endoplásmico, las proteínas van saliendo del ribosoma –muy próximas al sitio de unión a la membrana– y se descargan fácilmente a través de estas, hacia el lumen del retículo.

Biogénesis de los ribosomas

Para la formación de los ribosomas es necesaria la presencia simultánea de todos sus componentes, tanto los ARNr como las 52 proteínas.

En *E. coli* los genes que codifican los ARNr se localizan en forma continua y se transcriben al unísono en un precursor de gran tamaño, que es procesado hasta que cada uno alcanza su forma definitiva. La *E. coli* tiene siete copias de estos genes. También los genes que codifican proteínas ribosomales se encuentran organizados en grupos (operones) y varias de estas proteínas se transcriben en un solo ARNm policistrónico. Estos grupos de genes se encuentran localizados en diferentes sitios del cromosoma bacteriano; se han descrito siete operones que controlan la síntesis de las proteínas ribosomales (Fig. 29.10).

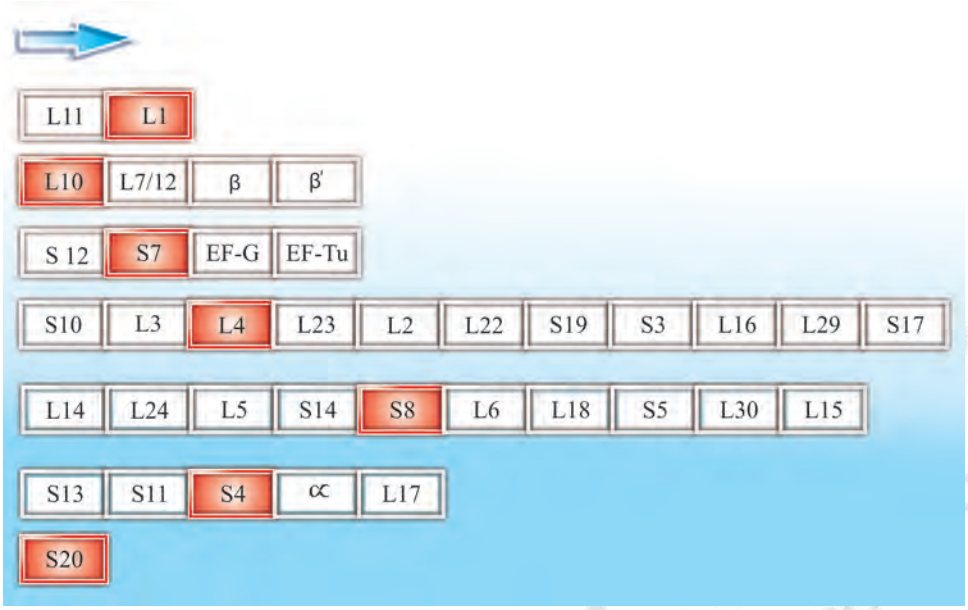


Fig. 29.10. Operones de las proteínas ribosomales. Las proteínas ribosomales están codificadas en siete segmentos de ADN, de longitud variable. Cada uno de estos se transcribe en un solo ARNm que se traduce de manera secuencial. A, B y B' representan subunidades α, β y β´, respectivamente, de la ARN polimerasa. EF-G y EF-Tu representan proteínas no ribosomales, indispensables para la traducción. En rojo aparecen las proteínas que controlan la expresión de cada uno de los fragmentos (operones).

Las subunidades ribosomales se han podido reconstruir a partir de sus componentes purificados, con lo cual se pretende conocer el orden exacto en que cada uno de los componentes es integrado en la formación de la partícula.

Todo el sistema de síntesis de los ribosomas está sometido a un fino y complejo control que será analizado detenidamente en el capítulo 34.

La formación de los ribosomas en eucariontes requiere de la participación de las tres ARN polimerasas. Los genes de los ARNr de 28 S, 18 S y 5,8 S forman una unidad de transcripción que está repetida cientos de veces en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 y son transcritos por la ARN polimerasa I. Los genes de las proteínas ribosomales están dispersos en todo el genoma y son transcritos por la ARN polimerasa II. Mientras tanto, los genes del ARNr de 5 S se encuentran repetidos en el cromosoma 1 y son transcritos por la ARN polimerasa III. La formación de las subunidades ribosomales ocurre en el nucléolo.

Desde el punto de vista evolutivo, la formación de los ribosomas es un proceso muy conservado. En la mayoría de los organismos, los ARNr maduros se generan por un proceso postranscripcional de un pre-ARNr policistrónico. Los pasos claves en la biogénesis de los ribosomas son los siguientes:

- Transcripción del pre-ARNr.
- Modificación covalente de regiones del ARNr maduro del pre-ARNr.
- Procesamiento del pre-ARNr hasta formar el ARNr maduro.
- Transporte de las proteínas ribosomales desde el citoplasma hasta el núcleo.
- Asociación de los ARNr con las proteínas.
- Transporte de las subunidades ribosomales desde el núcleo hasta el citoplasma.

El procesamiento del pre-ARNr comienza con la acción sucesiva de endonucleasas; acortamiento del extremo 3´ del transcrito primario; acortamiento del extremo 5´; separación del pre-ARNr de 18 S y formación de su extremo 3´; separación del pre-ARNr de 5,8 S. Posteriormente las exonucleasas se encargan de reducir los productos intermedios hasta obtener la forma madura de los tres ARNr. Durante este proceso los pre-ARNr también experimentan modificaciones covalentes extensas.

Durante la transcripción y el procesamiento del pre-ARNr muchas de las proteínas ribosomales se asocian con zonas pertenecientes a los ARNr maduros. Un resumen del proceso se muestra en la figura 29.11

En el proceso de maduración, las partículas prerribosomales se liberan de su asociación con estructuras nucleolares y difunden hacia el complejo del poro nuclear. El paso hacia el citoplasma parece implicar la separación de algunas proteínas que se vuelven a unir en el citoplasma, donde concluye dicho proceso (Fig. 29.12)

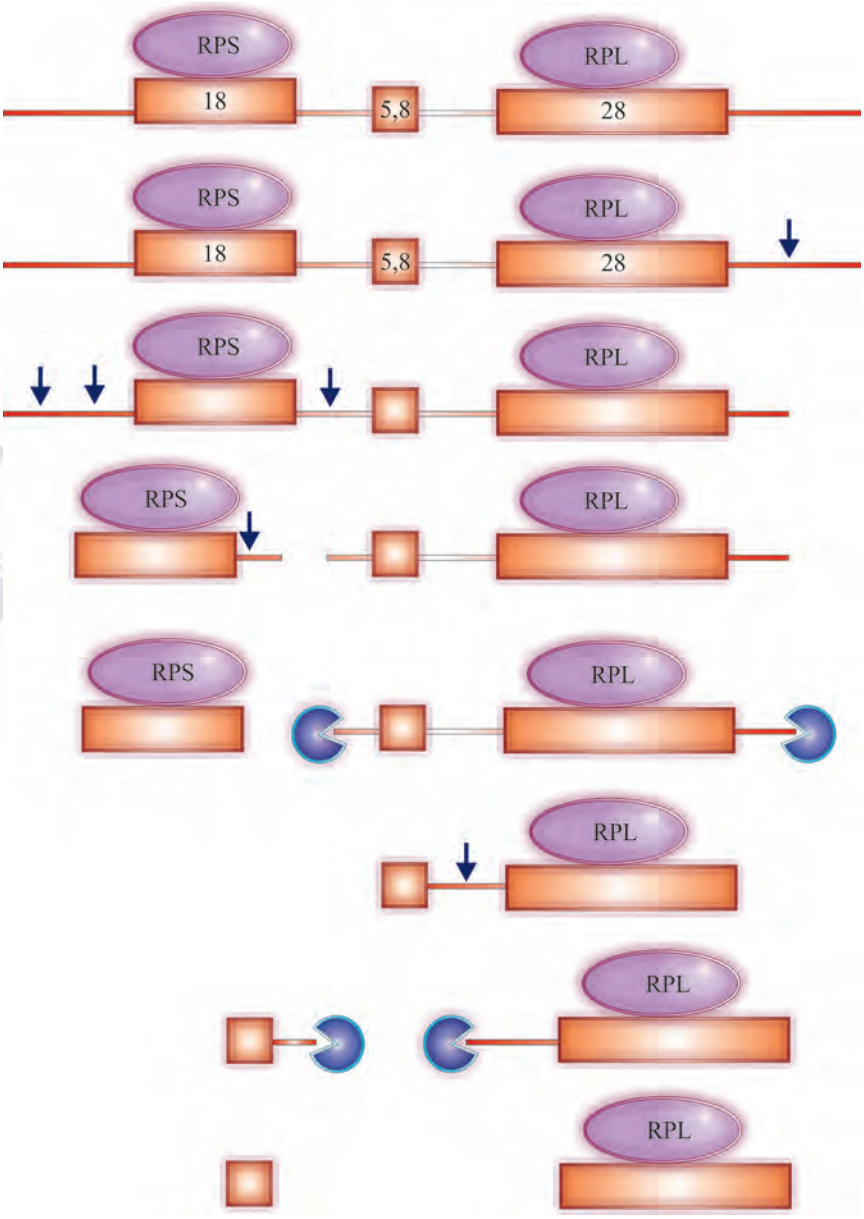


Fig. 29.11. Maduración de los ARNr. Al ARNr transcrito primario se unen proteínas en secuencias que formarán parte de los ARN maduros. Luego, la acción coordinada de endonucleasas y exonucleasas corta el ARN hasta darle su tamaño definitivo. También se producen metilaciones y la formación de seudouridina, que no se muestran en la figura.

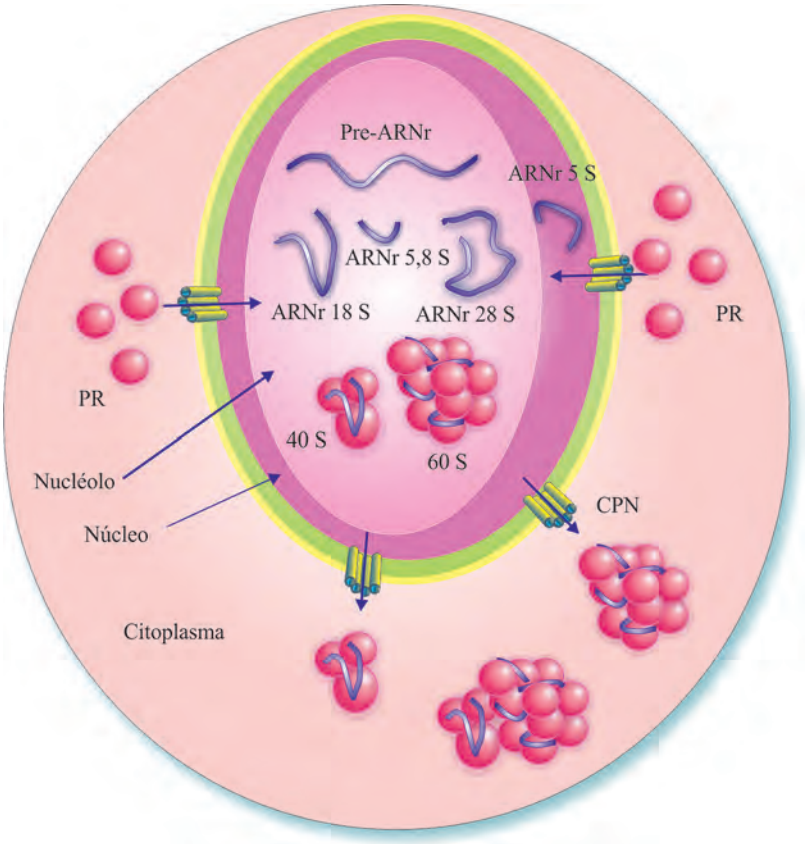


Fig. 29.12. Biogénesis de los ribosomas. Después de la transcripción de los genes que codifican los ARNr y las proteínas, estos componentes se asocian en el nucléolo. Las partículas ribosomales son transportadas a través del complejo del poro nuclear hacia el citoplasma, donde se forma el ribosoma funcional de 80 S.

Polirribosomas

En los procariontes varios ribosomas se unen a un mismo ARNm para formar los polirribosomas o polisomas, estos pueden estar libres en el citoplasma o unidos a la membrana plasmática.

En los eucariontes la mayoría de los ribosomas se encuentra en forma de polisomas y solo una pequeña fracción se halla como ribosomas libres. Es fácil distinguir dos tipos de polisomas: los que aparentemente están libres en el citoplasma y los que se encuentran unidos a las membranas del retículo endoplasmático y en la membrana externa de la envoltura nuclear.

Los polisomas adheridos forman modelos característicos, como asas, rosetas, círculos, espirales e hileras dobles, en los que participa un número variable de ribosomas (de 5 a más de 20). En algunos tipos celulares predomina un solo modelo, por ejemplo, espirales en los plasmocitos e hileras dobles en los fibroblastos, mientras que en otros existen mezclas variadas.

Los polisomas libres sintetizan principalmente proteínas para el uso de la célula, en tanto los adheridos lo hacen para la secreción, membranas u organitos membranosos, pero no existen diferencias estructurales entre estos. La proporción de ribosomas libres y adheridos puede variar notablemente durante la vida celular, una célula exocrina, por ejemplo, comienza su proceso de diferenciación con una población predominante de polisomas libres, que elaboran las proteínas necesarias para su crecimiento y reproducción, pero al estar completamente diferenciada, presenta casi todos sus polisomas adheridos y solo una fracción muy pequeña en forma libre.

Resumen

Los ribosomas son los organitos especializados en la síntesis de las proteínas y constituyen un componente universal de todos los organismos celulares.

Los ribosomas están formados por dos subunidades de tamaño diferente. En procariontes la menor o de 30 S tiene un ARNr de 16 S y 21 proteínas; su función fundamental consiste en el reconocimiento codón-anticodón. La mayor o de 50 S presenta dos tipos de ARNr, el de 23 S y el de 5 S y 31 proteínas, su función específica fundamental es la formación del enlace peptídico. La partícula funcional o de 70 S es la que funciona durante la traducción.

Los ribosomas eucariontes son mayores y más complejos. La subunidad menor o de 40 S presenta un ARNr de 18 S y unas 32 proteínas. La mayor o de 60 S tiene tres ARNr de 28; 5,8 y 5 S, y alrededor de 46 proteínas; juntas forman la partícula funcional de 80 S. La cantidad de proteínas de cada subunidad varía entre las especies.

Su estructura tridimensional se define a partir del modelo asimétrico. La subunidad de menor presenta forma de letra "Y" con una cabeza, una base y una plataforma, y la mayor tiene forma de un cuerpo hemisférico con tres protuberancias y una muesca. Una depresión en la cara que da hacia la subunidad menor permite la acomodación de los tres ARNt necesarios para la traducción. En el ribosoma funcional la unión de las dos subunidades conserva el carácter asimétrico.

Empleando técnicas inmunológicas, asociadas con la microscopia electrónica, la dispersión neutrónica y la formación de enlaces cruzados, se han podido determinar la posición de varios componentes ribosomales, así como algunos de sus sitios funcionales. La mayoría de las localizaciones se han realizado en el dominio traduccional y muy pocas en el de salida o secretor.

La formación de los ribosomas es un proceso complejo que requiere la participación simultánea de todos sus componentes, para lo cual es necesaria la síntesis tanto de los ARNr como de las proteínas. Algo se ha avanzado en los últimos años en la reconstrucción *in vitro* de los ribosomas.

La estructura de los ribosomas de organitos (mitocondrias y cloroplastos) es mucho menos conocida.

En las células, los ribosomas se agrupan formando polisomas que pueden estar aparentemente libres en el citoplasma, o unidos a membranas formando figuras características. Los polisomas libres elaboran proteínas citoplasmáticas, en tanto los adheridos sintetizan proteínas de secreción o de componentes membranosos.

Ejercicios

1. ¿Cómo se evidencia en la estructuración de los ribosomas el principio de organización de las macromoléculas?
2. ¿Cómo procedería usted para determinar la posición de alguna de las proteínas que forman parte de los ribosomas?
3. ¿Cuáles son las principales diferencias entre los ribosomas procariontes y los eucariontes?
4. ¿Existen algunas diferencias entre los polisomas libres y los unidos a membranas en los eucariontes?
5. En el ciclo celular de los eucariontes existe una etapa en que cesa la biogénesis de los ribosomas. ¿Puede usted deducir en cuál y por qué?

6. Desde hace tiempo se sabe que la estreptomicina es un inhibidor de la iniciación de la traducción en procariontes y por eso se emplea en el tratamiento de enfermedades bacterianas. Más tarde se demostró que este antibiótico se une fuertemente a la proteína S12. ¿Cuáles son las posibles conclusiones que pueden derivarse de estos dos hechos?
7. ¿Cómo es posible que inhibidores de la síntesis de proteínas en bacterias puedan ser empleados como antibióticos, sin afectar las células humanas?
8. ¿Cómo se puede relacionar la existencia de los polisomas con el principio de máxima economía?

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Traducción

La traducción constituye la etapa crucial en el mecanismo de expresión de la información genética. En este proceso ocurre la síntesis de la proteína específica que ha de cumplir una función determinada en la célula o el organismo, con lo cual la información contenida en los genes quedará totalmente expresada. En la traducción se realiza el tránsito de genotipo a fenotipo.

La explicación de la biosíntesis de proteínas en términos moleculares constituye un problema central de la biología molecular. En 1961 se obtuvieron los primeros progresos significativos en el estudio de este proceso, a partir de extractos bacterianos que sintetizaban proteínas activamente. Estudios más recientes en eucariontes permiten afirmar que, en general, el proceso ocurre de forma similar en todos los organismos vivos y que las mayores diferencias radican en sus mecanismos de control.

El estudio de la traducción incluye tres aspectos: el informacional o del código, estudiado en el capítulo 28; el topográfico o de la estructuración del sistema sintetizador de proteínas, en el capítulo 29, y el químico, o sea, el problema concreto de la síntesis de las proteínas, es decir, la iniciación de la síntesis, la unión de los aminoácidos en el orden correcto, la liberación de la cadena polipeptídica neoformada, la adquisición de su conformación y, en ocasiones, las modificaciones que ocurren simultáneamente o después de la síntesis. A este último aspecto está dedicado el contenido del presente capítulo.

Como en capítulos anteriores, se hará una somera descripción del proceso en los organismos procariontes, para luego hacer un estudio más detallado en los eucariontes. Antes se tratarán aquellos aspectos que son comunes a ambos tipos de organismos.

Primeros aportes

El descubrimiento de los mecanismos moleculares de la síntesis de proteínas implicó el esfuerzo de muchos investigadores durante años. A mediados de la década de los 50 Crick propuso la hipótesis de que no existía una interacción directa entre los aminoácidos y los ácidos nucleicos que los codificaban y que era necesaria una molécula adaptadora, sin poder precisar nada acerca de esta. Dicha idea fue corroborada pocos años después cuando en 1957, Hoagland descubrió un tipo de ARN capaz de unirse específicamente con aminoácidos y que se denominó soluble, pero que más tarde se nombró de transferencia (ARNt).

Un aspecto interesante del problema fue resuelto en una experiencia realizada por Howard Dintzis, quien determinó la dirección en la cual se produce la síntesis. Para ello se utilizaron reticulocitos que sintetizaban hemoglobina de manera activa. Las células se exponían a aminoácidos marcados con ^{3}H durante diferentes periodos, que siempre eran menores que el requerido para la síntesis de la proteína. La hemoglobina se extraía y se separaban las cadenas α y β que eran entonces tratadas con tripsina. A los péptidos resultantes se les medía la radiactividad y se comprobaba que esta era mayor hacia el extremo carboxílico. De hecho, había un gradiente de incremento de radiactividad desde el extremo N terminal hacia el C terminal, por tanto, esa era la dirección de la síntesis. Los experimentos para dilucidar el código genético ya habían mostrado que el ARNm se leía en el sentido 5'→3'. A esta relación entre la dirección de lectura del ARNm y la de síntesis de la cadena polipeptídica se le denomina colinealidad.

Otro hecho sobresaliente fue puesto al descubierto en el laboratorio de Frederick Sanger, quien dejó establecido que existe un codón específico para la iniciación y que este es leído por un ARNt específico que difiere estructuralmente del resto de las moléculas del mismo tipo.

Sanger también pudo determinar que este ARNt era cargado con la metionina y que a esta se unía un grupo formilo, que constituía la formilmetionina, primer aminoácido que era incorporado a la síntesis de proteínas.

El interés por los mecanismos de síntesis de proteínas es tal, que son muchos los hombres y los laboratorios que han realizado aportes al esclarecimiento del proceso hasta el nivel en que se encuentra en la actualidad.

Características generales

La síntesis de proteínas ocurre en los ribosomas, de manera unidireccional, acoplada a la hidrólisis de nucleósidos trifosfatados y dirigida por la lectura colineal del ARNm. La traducción ocurre en un organito citoplasmático específico (los ribosomas) y se produce de forma unidireccional desde el extremo N terminal hacia el C terminal, colinealmente a la lectura del ARNm (Fig. 30.1). Tiene carácter gradual y repetitivo, ya que los aminoácidos se van incorporando uno a uno mediante el mismo mecanismo. También posee carácter acoplado, pues la energía necesaria para el proceso proviene de la hidrólisis de nucleósidos trifosfatados, y carácter dirigido, ya que el orden que ocupan los aminoácidos en la cadena polipeptídica está determinado por el orden de los codones en el ARNm.

Para la realización de la traducción se requieren más de 200 macromoléculas y transcurre a una velocidad promedio de 10 aminoácidos incorporados por segundo.

En el estudio de la traducción se considerarán de manera secuencial las mismas etapas que en los procesos anteriores, o sea, los eventos previos a la iniciación, la iniciación, la elongación, la terminación y los eventos posteriores a la terminación.

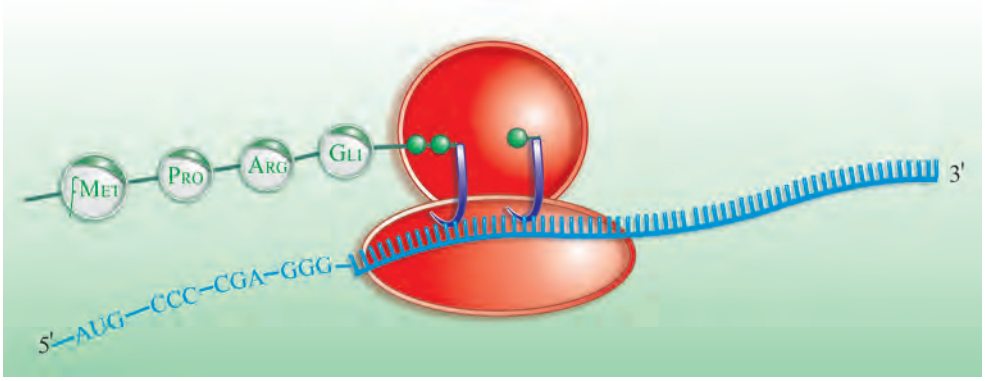


Fig. 30.1. Colinealidad ARNm proteína. A medida que el ARNm se va leyendo en el sentido 5'→3', la cadena polipeptídica se va sintetizando desde el extremo N terminal hacia el extremo C terminal; de esta forma la posición de los aminoácidos en la cadena polipeptídica queda determinada por la posición de los codones correspondientes en el ARNm.

Factores de traducción

Además de los ribosomas, en la síntesis de proteínas intervienen numerosas proteínas no ribosomales, conocidas como factores de traducción. Existen factores de iniciación, de elongación y de terminación, estos últimos se denominan factores de liberación. Así FI-1 se refiere al factor de iniciación 1 y FE-1 al factor de elongación 1. Cuando se hace referencia a un factor de eucariontes, se escribe una letra "e" minúscula delante de la abreviatura del factor, de manera que eFI-1 es el factor de iniciación 1 de eucariontes.

Varios de los factores de traducción pertenecen a la superfamilia de proteínas G, denominadas así porque se caracterizan por estar unidas a nucleótidos de guanina. Estas proteínas presentan dos estados con diferente actividad; son activas cuando están unidas a GTP e inactivas cuando lo están a GDP. Para pasar de un estado a otro requieren de proteínas adicionales. Aunque las proteínas G tienen una actividad de GTPasa, es decir, catalizan la hidrólisis del GTP a GDP y fosfato, esta actividad es muy débil, de apenas un nucleótido por minuto.

Una proteína activadora de GTPasa, GAP (del inglés, *GTPase activating protein*) interactúa con la proteína G unida a GTP (forma activa) y estimula la actividad de GTPasa en varios órdenes de magnitud. Al producirse la hidrólisis el GDP queda unido a la proteína (forma inactiva), por lo que las GAP actúan como inactivadoras de las proteínas G. Estas tienen mayor afinidad por el GDP que por el GTP, por lo que permanecen inactivas mucho tiempo. Otra proteína adicional, denominada intercambiador de nucleótidos, NEF (del inglés, *nucleotide exchange factor*) estimula la liberación del GDP. Como la concentración intracelular de GTP es 10 veces mayor que la de GDP, cuando el sitio de unión de nucleótidos queda desocupado, el GTP se asocia rápidamente y con ello la proteína se activa, por lo tanto NEF actúa como un activador. Un resumen de la forma de actuar de las proteínas G se presenta en la figura 30.2.

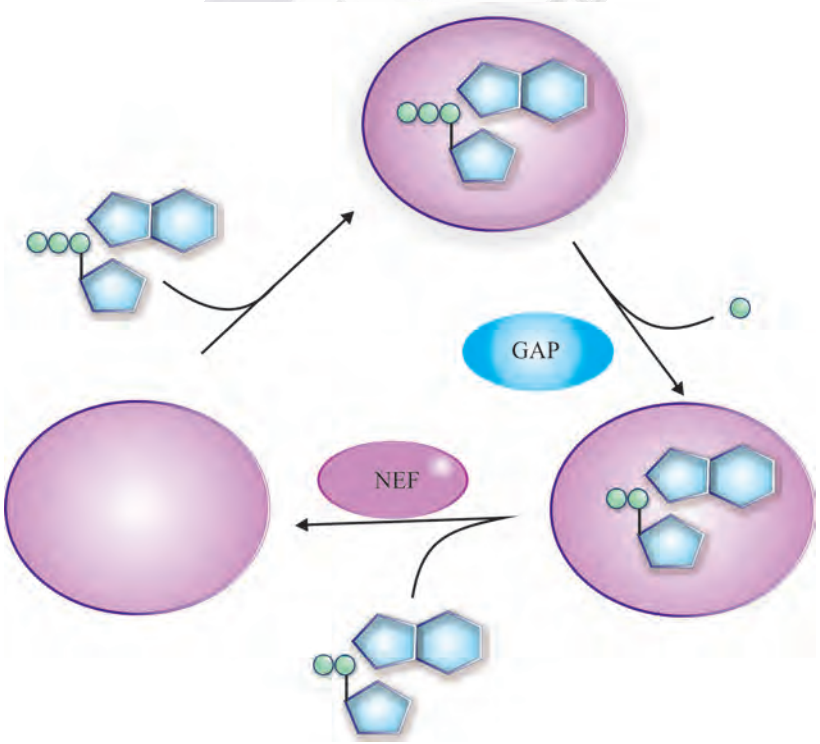


Fig. 30.2. Ciclo de acción de las proteínas G. En su forma activa la proteína G está unida al GTP. Una proteína activadora de GTPasa (GAP) estimula la hidrólisis del GTP liberando fosfato y GDP unido a la proteína que ahora está inactiva. Un factor intercambiador de nucleótidos (NEF) propicia la disociación del GDP. Al quedar vacío el sitio de unión a nucleótidos este es ocupado por el GTP y la proteína vuelve a ser activa.

Activación de los aminoácidos

La formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro es termodinámicamente desfavorable. Además, los aminoácidos no pueden interactuar directamente con los codones sobre el ARNm y ordenarse en la forma adecuada, estos dos obstáculos se resuelven mediante la reacción de activación.

La primera enzima que cataliza esta reacción fue aislada por primera vez a finales de la década de los 50, a partir de extractos de hígado de rata, y ha ido recibiendo diferentes denominaciones hasta la actualidad, en que se conoce con el nombre genérico de aminoacil-ARNt sintetasa. Desde entonces se han ido descubriendo una tras otra las enzimas específicas para cada aminoácido, que forman una gran familia de proteínas.

Todos los organismos poseen, al menos, 20 de estas enzimas, las cuales constituyen hasta 10 % de las proteínas celulares, lo que equivale de 1 000 a 5 000 moléculas por célula con sus variaciones, de acuerdo con el estado de la actividad celular.

Las aminoacil-ARNt sintetasas constituyen una familia de enzimas que estructuralmente se pueden clasificar en tres grupos:

- Tipo I: consiste en enzimas monoméricas formadas por una sola cadena polipeptídica.
- Tipo II: formadas por dos subunidades idénticas.
- Tipo III: formadas por cuatro subunidades iguales (dos a dos).

Todas estas catalizan la esterificación de un aminoácido al ARNt correspondiente, lo cual se conoce generalmente como "cargar" el ARNt. Para simbolizar el ARNt específico para un aminoácido, por ejemplo para la alanina, se escribe $ARNt^{ala}$ y para señalar con cuál aminoácido está cargado, se escribirá Ala-ARNt, por lo que la escritura completa sería Ala-$ARNt^{ala}$. El estudiante debe recordar esta notación, ya que en ocasiones se utilizan con fines experimentales ARNt cargados con un aminoácido diferente al que le corresponde y la notación ayudará a distinguir de qué se trata en cada caso.

Los estudios sobre el mecanismo de reacción hacen posible su separación en dos etapas: la primera, llamada de activación, propiamente dicha, y la segunda, de transferencia, ambas etapas son reversibles (Fig. 30.3).

En la primera etapa la enzima en presencia de iones Mg^{2+} transfiere el aminoácido por su grupo carboxilo al fosfato más interno del ATP, formándose un enlace anhídrido mixto de alta energía, lo cual implica la formación de pirofosfato que abandona la enzima y un aminoaciladenilato que permanece unido al centro activo de la sintetasa. La hidrólisis del pirofosfato favorece la reacción en el sentido de la síntesis.

En la etapa de transferencia el grupo aminoacilo del aminoaciladenilato se transfiere al resto de ribosa del extremo 3'-OH del ARNt correspondiente, formándose el aminoacil-ARNt y AMP. Existen dos familias de enzimas que se diferencian en que una de estas transfiere el aminoácido hacia el 3'-OH y la otra hacia el 2'-OH, lo cual depende de la forma en que se produce la unión enzima-sustrato. De todas formas el grupo aminoacilo puede migrar del 3' al 2', y viceversa, unas 10 000 veces por segundo. Como ya fue expresado, la reacción general es reversible y presenta una constante de equilibrio que varía entre 0,3 y 0,7, en dependencia del aminoácido, de lo que se deduce que el enlace éster del aminoacil-ARNt tiene un contenido energético comparable con el del enlace anhídrido de ácido del ATP.

Del mecanismo expuesto se infiere que las sintetasas poseen doble especificidad, ya que por una parte deben reconocer al aminoácido específico y por otra el ARNt que le corresponde. La traducción correcta del mensaje genético depende en elevado grado de la especificidad de esta reacción, ya que no se conoce un mecanismo de rectificación como el de la replicación. De las dos etapas, la de mayor especificidad es la segunda. Este hecho se pudo comprobar cuando se utilizó la sintetasa específica para la isoleucina, e incubándola

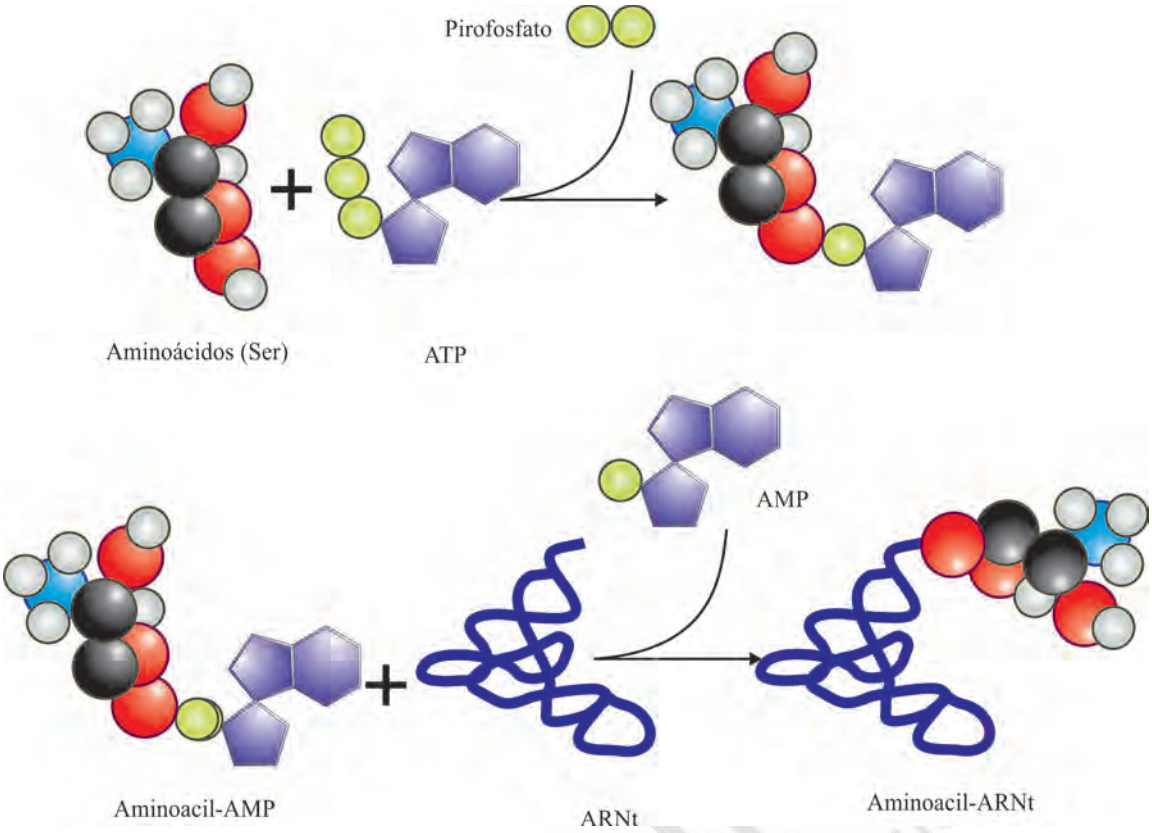


Fig. 30.3. Activación de los aminoácidos. Los aminoácidos se unen en una primera etapa al fosfato a del ATP, formando un aminoacil-AMP que en una segunda etapa reacciona con el ARNt correspondiente, transfiriéndole su grupo aminoacilo; ambas etapas de la reacción son reversibles y catalizadas por las aminoacil-ARNt sintetasas.

con valina se logró la formación del valil-AMP, pero al añadir el $ARNt^{val}$ en vez de producirse la transferencia del grupo valilo al ARNt, se estimuló la hidrólisis del valil-AMP.

Varios estudios encaminados a dilucidar el mecanismo por el cual la enzima reconoce a su ARNt específico han llevado al descubrimiento del "conjunto de identificación", esto es, el grupo de detalles estructurales de los ARNt que determinan el reconocimiento. Formando parte de este conjunto de identidad se encuentran el nucleótido que ocupa la posición 73 (N73), el brazo aceptor y el anticodón. También se han observado importantes interacciones con el brazo variable, el brazo D, el interior de la forma Γ del ARNt y el eje fosfato ribosa. El reconocimiento no se produce por interacciones aisladas con estos elementos, sino más bien en una forma cooperativa y secuencial de todos ellos. En algunas enzimas específicas otros detalles estructurales son de gran significación. El mecanismo de reconocimiento molecular es tan preciso que estas enzimas tienen un índice de error de 1 en 10 000.

Casi todos los aminoácidos, una vez unidos a su ARNt correspondiente, están en condiciones de unirse a los ribosomas para la síntesis de proteínas, no obstante, existe una notable excepción. Se trata de aquel que va a servir para la iniciación.

Como ya se estudió en el capítulo 28, el codón de iniciación es el AUG (y en algunos organismos el GUG), que además codifica la metionina. Frederick Sanger descubrió que existen dos tipos de $ARNt^{Met}$, uno que se emplea en la iniciación, el $ARNt_i^{Met}$, y otro para las posiciones interiores –el $ARNt_m^{Met}$.

En procariontes la misma sintetasa cataliza la unión de los dos ARNt a la metionina, pero el $MetARNt_i^{Met}$ es modificado luego por la acción de una transformilasa específica que utiliza como donante activado de formilo el N^{10}formiltetrahidrofolato (FH_4), como se representa en la figura 30.4. El producto de la reacción se denomina N-formilmetionil-ARNt

(fmet-ARNt$_i^{Met}$). Esta enzima solo reconoce al ARNt$_i$ y no al ARNt$_m$, lo cual hace suponer la existencia de diferencias estructurales entre los dos ARNt^{Met}. La adición del formilo a la metionina en el ARNt$_i$ es esencial para la iniciación de la síntesis de proteínas. La traducción de ARNm virales añadidos a extractos bacterianos es bloqueada por la adición de trimetiprima, un potente inhibidor de la dihidrofolato reductasa, sin embargo, la inhibición es suprimida por la adición de N^{10}formilFH$_4$ o de fmet-ARNt$_i$. En eucariontes la metionina utilizada en la iniciación no se modifica.

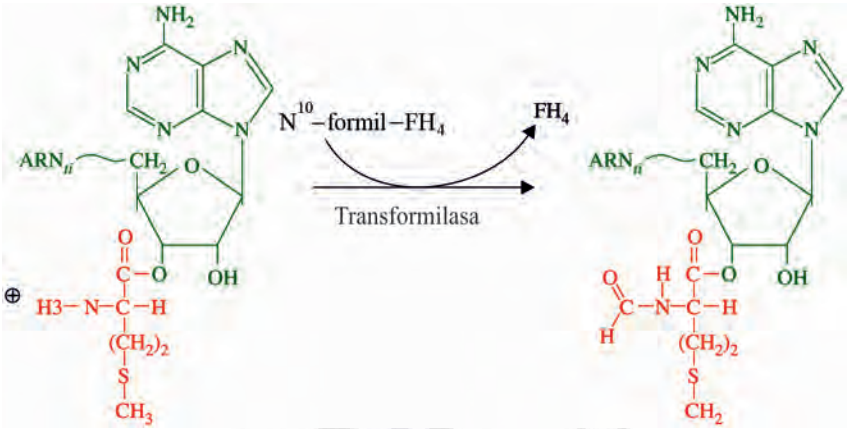


Fig. 30.4. Reacción de formilación del metionil ARNt iniciador. Una enzima transformilasa, que utiliza como donante de formilo al N^{10}formiltetrahidrofolato, modifica el grupo amino de la metionina unida al ARNt$_i$. Esta reacción es indispensable para la iniciación de la traducción en procariontes.

Traducción en procariontes

La traducción comienza con la formación de un complejo de iniciación 70 S. Los componentes que interactúan son las dos subunidades del ribosoma, ARNm, fmetARNt$_i^{Met}$ y GTP. Se requiere, además, la participación de tres proteínas, denominadas factores de iniciación e identificadas simbólicamente como FI-1, FI-2 y FI-3. A continuación se describe la secuencia de eventos que llevan a la formación de este complejo. Para lograr una mejor comprensión se ha dividido en cuatro fases (Fig. 30.5).

Formación del complejo de preiniciación

En las bacterias los ribosomas se encuentran, en parte, asociados como partículas 70 S y disociados en un equilibrio dinámico. En concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} casi todos los N^{10}-formil-FH$_4$ están asociados. La disociación de los ribosomas sucede por la acción combinada de FI-1 y FI-3. El FI-1 aumenta la velocidad de disociación de los ribosomas, con lo cual se incrementa el número de subunidades 30 S libres, a las cuales se une entonces el FI-3 que impide su reasociación con las subunidades mayores. Como el complejo 30 S-FI-3 es incapaz de unirse a la 50 S, de hecho desplaza el equilibrio hacia la disociación, lo que permite la unión de más FI-3. El FI-2 ligado a GTP realiza una unión altamente estabilizada por FI-1 y FI-3. Por su parte, la unión del FI-1 se estabiliza por FI-2 y FI-3. En experimentos *in vitro* se ha comprobado que cada factor, por separado, puede unirse a la 30 S, pero la presencia de los dos restantes estabiliza la unión.

Los tres factores se unen contiguamente y muy cerca del extremo 3'-OH del ARNr de 16 S y adyacentes a la zona de unión de la 50 S. A la estructura así formada se le denomina complejo de preiniciación.

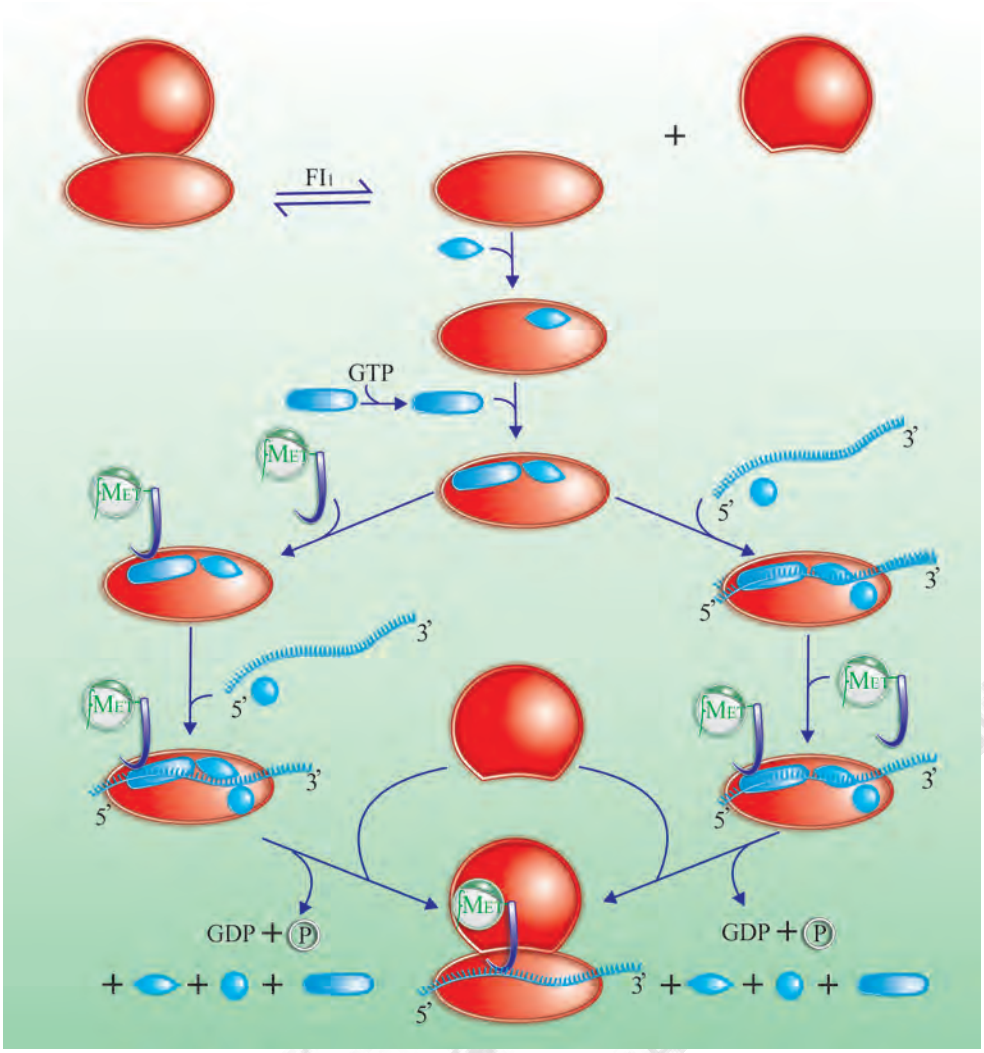


Fig. 30.5. Etapa de iniciación. Al disociarse los ribosomas estimulados por FI-1, este se une a la subunidad menor e impide su reasociación con la mayor. El resto de los factores también quedan incorporados a la subunidad menor; entonces puede ocurrir que el IF2:GTP incorpore al fmet-ARNt$_i$ o que el FI-3 incorpore al ARNm. El paso siguiente completa la incorporación de todos los componentes y la fase se completa al reincorporarse la subunidad mayor.

Incorporación del fmet-ARNt$_i$

La incorporación del fmet-ARNt$_i$ requiere de su unión con el complejo formado por el FI-2 unido al GTP, que da lugar al complejo ternario fmet-ARNt$_i$-FI-2-GTP. Solo FI-2 es capaz de incorporar al fmet-ARNt$_i$ como fue comprobado en experiencias *in vitro*, donde era el único capaz de lograr la incorporación del ARNt$_i$ a los ribosomas, utilizando el trinucleótido AUG como ARNm. El FI-2 es incapaz de unirse a la formilmetionina libre o unida a polinucleótidos, pero lo hace fuertemente a cualquier ARNt cargado con metionina que tenga bloqueado el grupo amino. La incorporación del fmet-ARNt$_i$ determina la salida del FI-3 del complejo. Este evento puede ocurrir antes o después del que se describirá a continuación.

Incorporación del ARNm

La incorporación del ARNm se produce por la intervención del FI-3. El ARNm tiene un sitio de unión al ribosoma, determinado por la secuencia 5'-AGGAGGU3' o parecida (secuencia de Shine y Dalgarno) en una posición similar hacia el lado 5'-P del

codón de iniciación; esta se aparea con una zona rica en pirimidinas del extremo 3'OH del ARNr de 16 S, la 5'GAUCACCUCCUA3'. Dicho apareamiento posiciona el codón AUG, de forma que pueda aparearse con el anticodón del fmet-ARNt$_i$. La zona de unión al ribosoma está compuesta por las proteínas S7, S1, S11, S12, S18 y S21.

Normalmente la zona del extremo 3'-OH del ARNr de 16 S tiene la forma de una horquilla, determinada por el apareamiento intracatenario de las bases que no permiten la unión con el ARNm. La acción combinada del FI-3 y de la proteína S1 logra separar las bandas de la horquilla y permite la interacción por apareamiento de bases entre el ARNm y el ARNr de 16 S.

Formación del complejo de iniciación 70 S

La subunidad 50 S se une ahora y provoca la hidrólisis del GTP unido al FI-2, con lo cual FI-1, FI-2, FI-3, GDP y Pi abandonan el ribosoma y el fmet-ARNt$_i$ deviene activo para la formación del enlace peptídico.

El GTP actúa como un modulador alostérico. Si se emplea GDPCP que no es hidrolizable (Fig. 30.6) este se une al FI-2 y el complejo FI-2-GDPCP se une al ribosoma, pero no se separa de él al incorporarse la 50 S. Si previamente se remueve el GDPCP, se forma una 70 S totalmente funcional, o sea, la hidrólisis del GTP no es imprescindible para la ubicación del fmet-ARNt$_i$, solo para cambiar el efector de GTP a GDP y con ello variar la conformación del FI-2. Se ha postulado que esto produce a su vez una transconformación del fmet-ARNt$_i$ que le permite interactuar con la peptidil-transferasa. Este paso se denomina acomodación.

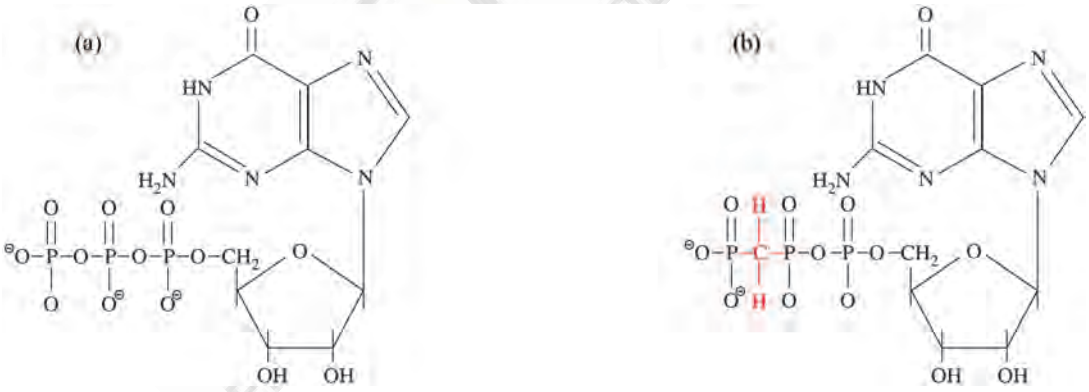


Fig. 30.6. Estructura del GDPCP. La figura muestra las estructuras del GTP (a) y del GDPCP (b) que presenta cómo, en este último, el grupo fosfato más externo está unido al resto de la molécula por un grupo metileno, por lo cual este compuesto no es hidrolizable como el GTP y resulta de gran utilidad como su análogo.

Para liberar al FI-2 se requiere la participación del FI-1, en cuya ausencia la hidrólisis del GTP no permite la liberación del FI-2, ni la incorporación de la 50 S. Parece ser que al hidrolizarse el GTP, el FI-2 queda unido al GDP que debe intercambiar con el FI-1 para abandonar el ribosoma.

Las proteínas L11 y L7/L12 están involucradas en la hidrólisis del GTP. El contacto entre FI-2:GTP y la prominencia L7/L12 produce en esta última una transconformación que activa la GTPasa unida el ribosoma.

La etapa de iniciación es la más compleja de todas, pero se debe tener presente que de la adecuada ubicación del codón de iniciación depende que el resto del proceso se lleve a cabo con la fidelidad requerida.

Elongación

Una vez que se ha formado el complejo de iniciación de 70 S al nivel del codón de iniciación, comienza un proceso de carácter repetitivo, en el que cada aminoacil-ARNt se incorpora al sitio A del ribosoma, cuyo sitio P está ocupado por la fmet-ARNt$_i$; se produce la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos activados y el movimiento del ribosoma hacia un nuevo codón del ARNm, con lo cual se vuelve a iniciar el ciclo, esta es la etapa de elongación. También en la elongación se requiere la participación de proteínas específicas no ribosomales, que se conocen como factores de elongación y se simbolizan como FETu, FETs y FE-G. Su estudio se realizará por fases, como en el caso anterior (Fig. 30.7).

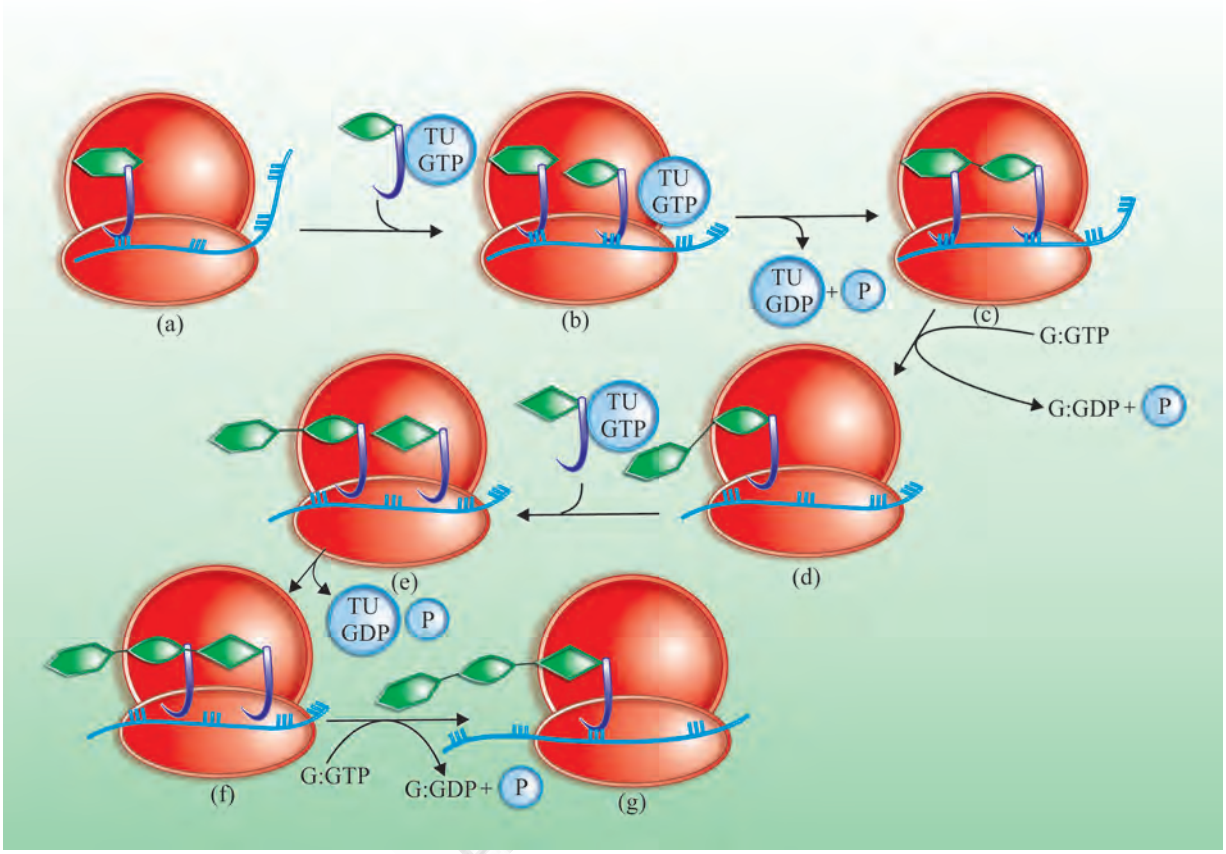


Fig. 30.7. Elongación. Las tres etapas fundamentales de la elongación se repiten de manera continua tantas veces como aminoácidos tiene la proteína, por eso esta etapa tiene carácter reiterativo. (a) El complejo, como queda al final de la iniciación; (b) se ha incorporado el aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma, que en el paso siguiente (c) queda unido al aminoacil que ocupaba el sitio P. Se produce la translocación (d) y comienza un nuevo ciclo de elongación.

Incorporación del aminoacil-ARNt

Los aminoacil-ARNt se incorporan al sitio A del ribosoma por la acción de un factor de elongación y el GTP. Al producirse el complejo de iniciación de 70 S, un segmento de aproximadamente 30 nucleótidos del ARNm queda cubierto por el ribosoma, pero solo dos moléculas de aminoacil-ARNt pueden estar en contacto con el ribosoma al mismo tiempo, de ahí que en la síntesis de proteínas solo intervienen simultáneamente dos de los 10 codones cubiertos por los ribosomas; cada uno de los aminoacil-ARNt ocupan sitios diferentes en el ribosoma. El único sitio que puede ser ocupado por el aminoacil-ARNt entrante es el sitio A (de aminoacil) o de entrada. Previo a la entrada del aminoacil-ARNt,

el sitio expone el codón que corresponde al aminoácido siguiente que debe ser incorporado a la cadena polipeptídica.

El codón que representa el último aminoácido que ha sido añadido a la cadena ocupa el sitio P (de peptidil) o donador, donde se localiza el polipéptido que ha sido sintetizado hasta ese momento, o el fmet-ARNt$_i$ al inicio del proceso.

El factor que interviene en la incorporación del aminoacil-ARNt al sitio A se obtuvo originalmente como una fracción única, a partir de extractos de *E. coli* y se le denominó factor T, que más tarde fue separado en dos componentes: uno que era estable al calor y por ello se le llamó FETs (la s por *stable*) y otro que era inestable y se nombró FETu (la u por *unstable*).

El FETu es una proteína G y su forma activa es FETu-GTP y es así como puede unirse al aminoacil-ARNt y formar un complejo ternario, por lo que es probable que la función del nucleótido de guanina sea la de garantizar la conformación adecuada del factor. Como sucede en la iniciación, la hidrólisis del GTP constituye el mecanismo para variar el efector y con ello su conformación.

La forma activa del FETu puede ser regenerada por FETs, que actúa como NEF y reacciona con el complejo FETu:GDP y desplaza al GDP, al tiempo que se forma un complejo entre los dos factores FETu:FETs (este fue el que inicialmente se denominó factor T); el FETs es a su vez desplazado por el GTP, formándose el complejo FETu:GTP, que puede unirse a un nuevo aminoacil-ARNt y el FETs que puede reciclarse (Fig. 30.8).

Las interacciones entre FETu, FETs y GTP son reversibles *in vitro,* no así la unión con el aminoacil-ARNt, esto es lo que dirige la reacción en un solo sentido.

La cantidad del FETs es aproximadamente igual al número de ribosomas, lo cual implica que la mayor parte del FETu se encuentra en forma de complejos binarios o ternarios.

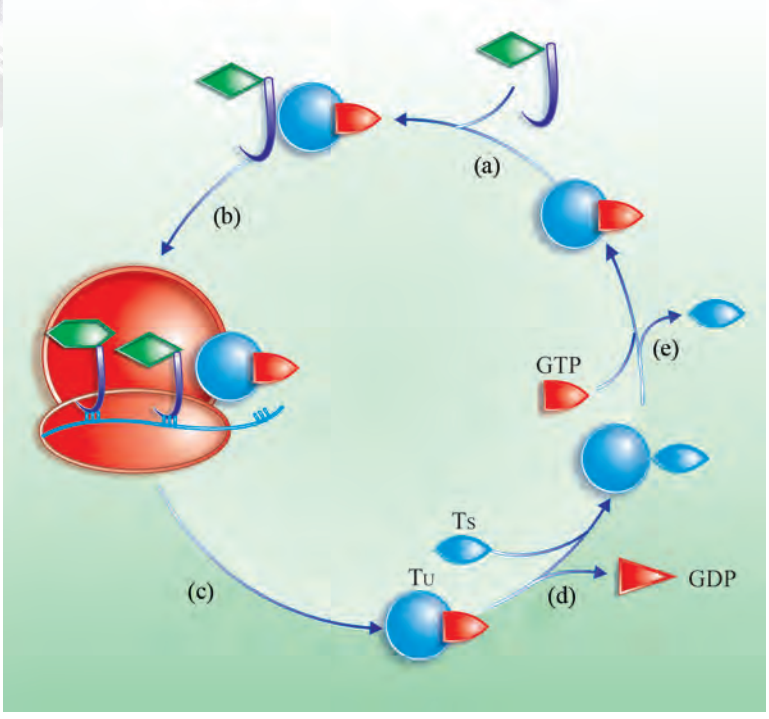


Fig. 30.8. Ciclo del factor de elongación T. (a) El FETu (en azul) se une al GTP (en rojo) y reacciona con el aminoacil-ARNt; (b) el complejo formado se incorpora al ribosoma; (c) el GTP es hidrolizado a GDP y el complejo Tu:GDP abandona el ribosoma; (d) en ese momento interviene el FETs que se une al FETu y desplaza al GDP; (e) con posterioridad el GTP desplaza al FETs, con lo cual el factor queda en condiciones para recomenzar el ciclo.

En la formación del complejo ternario con el FETu:GTP, la característica estructural más importante del aminoacil-ARNt parece ser el brazo aceptor, aquel donde se une el aminoácido. Los cambios en el nucleótido final de adenina impiden el reconocimiento del aminoacil-ARNt. El único aminoacil-ARNt que no puede ser reconocido por el complejo FETu:GTP es el fmet-$ARNt_i$, lo que excluye la posibilidad que la fmet pueda ser incorporada como respuesta a un codón AUG interno. Una razón de este comportamiento pudiera ser la estructura del brazo aceptor del $ARNt_i$ el cual delante del ACC-aminoacil contiene un C:A no apareado, en vez del par presente en todos los demás ARNt. Otro hecho sería la presencia del grupo amino bloqueado, ya que se ha comprobado que el bloqueo del grupo amino en otros aminoacil-ARNt impide su unión con el complejo FETu:GTP.

Estudios con GDPCP han demostrado que la hidrólisis del GTP ocurre después de la incorporación del complejo aminoacil-ARNt-FETu-GTP al ribosoma, pero antes de la formación del enlace peptídico. Se produce la hidrólisis de un GTP por cada aminoacil-ARNt que es incorporado.

Formación del enlace peptídico

El enlace peptídico se forma en una reacción en la cual se transfiere el grupo unido al ARNt que ocupa el sitio P (sea un péptido o el fmet) hacia el grupo amino del aminoácido unido al ARNt que ocupa el sitio A, catalizada por una actividad de peptidil-transferasa presente en la subunidad 50 S del ribosoma. La reacción de formación del enlace peptídico se estudió en el capítulo 29.

Aunque el sitio activo se localiza completamente en la subunidad mayor, la actividad puede ser detectada solo en el ribosoma completo. La necesidad de la subunidad menor suele entenderse como un mecanismo de seguridad que evita la unión azarosa de aminoacil-ARNt solo por la subunidad mayor.

Uno de los problemas aún no resueltos de la síntesis de proteínas es la explicación de cómo es posible que dos ARNt ligados a codones contiguos puedan localizar sus brazos aceptores suficientemente cerca uno de otro para permitir la formación del enlace peptídico, teniendo en cuenta la estructura tridimensional de los aminoacil-ARNt.

Translocalización

El ciclo de elongación se completa con la translocación, en la cual el ribosoma avanza tres nucleótidos a lo largo del ARNm. Al formarse el enlace peptídico, el ribosoma porta un ARNt descargado en el sitio P y un peptidil-ARNt en el sitio A. Como parte de un mismo mecanismo, en la translocación el ARNt del sitio P se mueve hacia el sitio E y de manera simultánea el peptidil-ARNt se desplaza del sitio A hacia el sitio P. El ribosoma presenta un sitio A no ocupado, que permitirá la entrada del siguiente aminoacil-ARNt. En esta fase interviene el FEG (la G alude a que liga nucleótidos de guanina).

Como en los casos anteriores, se debe formar un complejo FEG-GTP que garantiza la conformación adecuada para la unión al ribosoma y después la hidrólisis del GTP no solo proporciona la energía necesaria para el movimiento, sino que, además, cambia la conformación de la proteína y le permite abandonar el ribosoma.

Los ribosomas no pueden unirse simultáneamente al FETu y al FEG, por lo que la síntesis de proteínas sigue un ciclo en el cual estos factores son alternativamente unidos a, o liberados de, los ribosomas.

Este ciclo de elongación se repite tantas veces como aminoácidos sean necesarios incorporar a las proteínas, por lo cual constituye el periodo de mayor duración de todo el proceso.

Terminación

La terminación de la síntesis de proteínas implica un fenómeno poco frecuente, ya que se trata de la interacción de un codón directamente con una proteína.

Se han caracterizado tres proteínas que intervienen en la terminación y se denominan factores de liberación (FL). El FL-1 reconoce los codones UAA y UAG, en tanto FL-2, UGA y UAA requieren que el peptidil-ARNt se encuentre en el sitio P. Parece ser que los factores de liberación realizan su acción en el sitio A, ya que algunos ARNt mutantes, capaces de reconocer codones de terminación, compiten con estos por entrar al ribosoma. El FL-3 estimula la acción de los dos restantes.

La actividad de los factores de liberación implica la separación de la cadena polipeptídica neoformada y el desensamblaje de todo el aparato biosintetizador (Fig. 30.9).

Traducción en eucariontes

En eucariontes el proceso transcurre de forma similar, solamente la etapa de iniciación muestra grandes diferencias con la misma etapa en procariontes. En esta fase ocurre un grupo de eventos que pueden ser sucesivos o simultáneos. En la siguiente descripción se

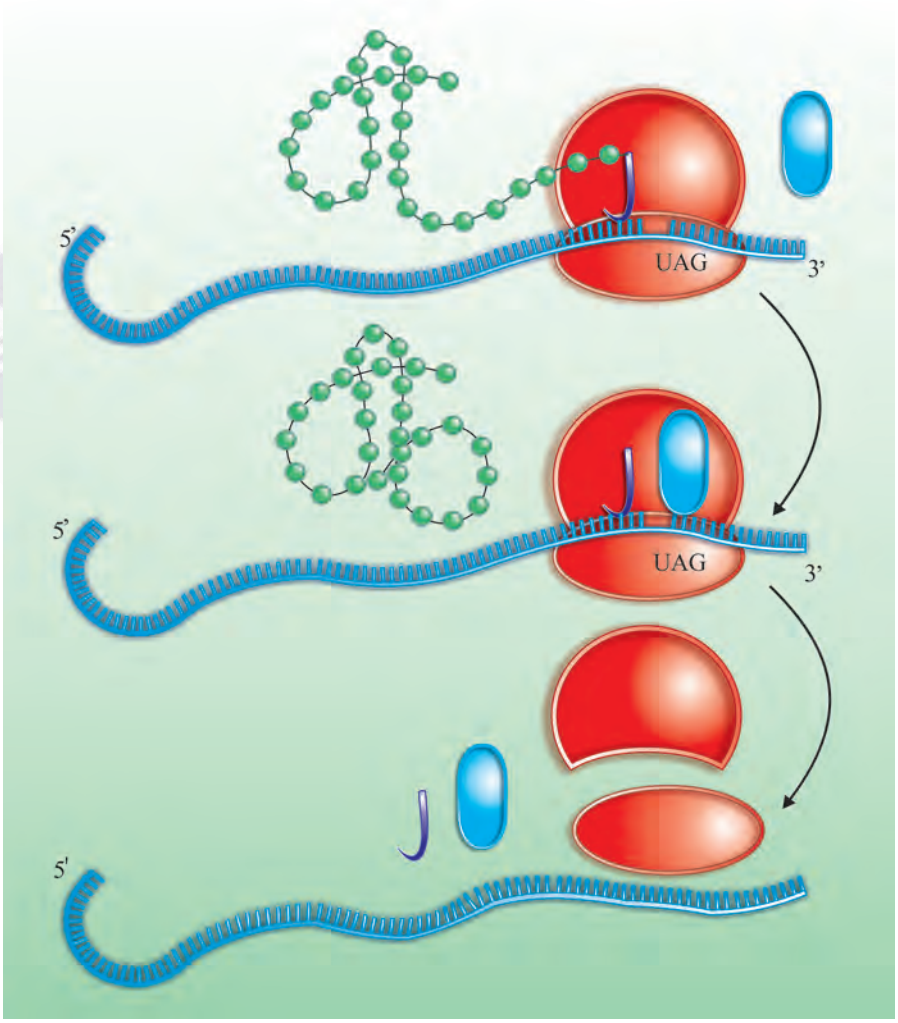


Fig. 30.9. Terminación. Al aparecer en el sitio A el codón de terminación, el factor de liberación interacciona directamente con el ARNm y determina no solo la separación de la proteína neoformada, sino, además, la desorganización de todo el sistema sintetizador.

ha preferido darle un orden lógico, pero sin olvidar que mientras se está describiendo un paso del proceso puede estar ocurriendo otro que se describirá posteriormente por razones obvias. En esta fase se considerarán tres aspectos: la preparación del metionil-ARNt$_i$, la preparación del ARNm y la formación del ribosoma funcional de 80 S.

Preparación del metionil-ARNt$_i$. Esta fase es similar a lo que ocurre en procariontes. Una vez formado el met-ARNt$_i$, este se une al eFI-2 que es una proteína G y está unida al GTP. En esta forma es trasladado a la subunidad menor del ribosoma y deja allí al met-ARNt$_i$. Si la unión es adecuada se produce la hidrólisis del GTP a GDP y el eFI-2-GDP se disocia del ribosoma. En este caso alguna de las proteínas de la subunidad menor actúa como GAP de eFI-2. El complejo no puede unirse nuevamente al met-ARNt$_i$, pues para ello tiene que estar unido a GTP. El intercambio de nucleótidos es catalizado por eFI-2B que actúa como NEF y forma el complejo eFI-2:GTP, listo para unirse de nuevo a met-ARNt$_i$ (Fig. 30.10).

El factor eFI-2 es específico para met-ARNt$_i$ que actúa como iniciador de la síntesis de proteínas. Este factor reconoce algunas características estructurales del ARNt$_i$ y al mismo tiempo interactúa con la metionina que está unida a él. Esta especificidad en el reconocimiento impide que el eFI-2 se una al met-ARNt que participa en la elongación y debe descargar la metionina en el sitio A y no en el P, como lo hace el eFI-2.

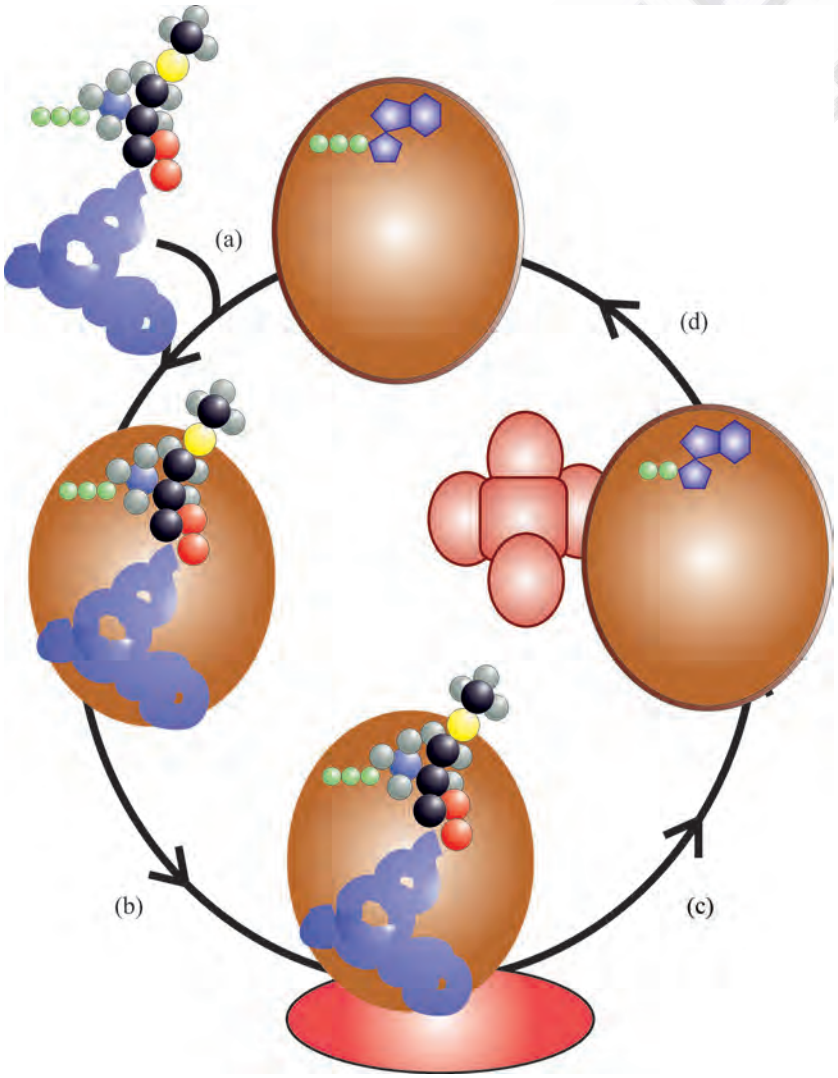


Fig. 30.10. Factor de iniciación eFI-2. La metionil-ARNt$_i$ se une al eFI-2-GTP (a) y así es depositado en el ribosoma (b) donde se produce la hidrólisis del GTP y se forma eFI-2-GDP. El eFI-2-GDP se une a eFI-2A (c) que estimula el intercambio de GDP por GTP (d) y el eFI-2 queda listo para un nuevo ciclo.

Preparación del ARNm. Para el comienzo de la traducción el eFI-4E hace el reconocimiento del casquete. Sin embargo, eFI-4E está secuestrado en el citoplasma por la proteína de unión al eFI-4E (4E-BP) que debe ser fosforilada para separarse y permitir la acción de eFI-4E. El eFI-4G tiene un sitio de unión para el eFI-4E y se une a él, pero también posee un sitio de unión a PAB: proteína de unión al poli(A) del ARNm, y al producirse la unión el ARNm presenta un aspecto circular con los dos extremos unidos por los eFI mencionados. El carácter circular del ARNm que se logra de esta manera, tiene un efecto potenciador sobre la traducción, pues permite a los ribosomas reiniciar el proceso por la transferencia de la subunidad 40 S, directamente desde 3´UTR hacia el extremo 5´del ARNm. Por otra parte permite explicar cómo proteínas que se unen a elementos del 3´UTR pueden modular la iniciación de la traducción. Esta fase se ilustra en la figura 30.11.

Adyacente al eFI-4E se une el eFI-4A, una proteína que tiene actividad de helicasa del ARN y que con la cooperación de eFI-4B y eFI-4H (esta última solo en mamíferos) comienza a moverse sobre el ARNm, desenrollando las estructuras secundarias presentes en la zona 5´-UTR, hasta que alcanza una estructura lineal. De esta forma el ARNm está listo para dar comienzo a la traducción.

La iniciación de la traducción está fuertemente influida por las características estructurales de la zona 5´-UTR. La iniciación es más eficiente en la medida que 5´-UTR sea más corta, menor, y menos complejas sean las estructuras secundarias y menor sea en contenido de pares GC en los tallos de estas estructuras. El codón de iniciación se encuentra en lo que se puede llamar la señal de iniciación. Esta señal (conocida como secuencia de Kosack) es más fuerte cuando presenta la secuencia CCRCCAUGG**,** donde la R en la posición -3 (la A del AUG es la posición +1) indica una purina. Esta señal se fortalece con la presencia de una horquilla a 14 nucleótidos hacia 3´ de la G +4.

Formación del ribosoma funcional de 80 S. Los ribosomas se encuentran en el citoplasma, en un estado de equilibrio entre la forma asociada (80 S) y las subunidades, donde predomina la forma asociada. La iniciación de la traducción ocurre fundamentalmente sobre la subunidad menor (40 S), por lo que es necesario desplazar el equilibrio hacia las formas disociadas. Esa función le corresponde al factor eFI-1A y al complejo multimérico eFI-3. Al parecer la unión del eFI-3 provoca un cambio conformacional en la subunidad menor que impide su asociación con la mayor. A esta forma se une el met--ARNti-eIF2-GTP y crea el complejo de 43 S (Fig. 30.12).

Este complejo se deposita en el extremo 5´ del ARNm, donde se encuentra el eFI-4E. El complejo 43 S se desplaza por el ARNm hasta encontrar el codón AUG (generalmente el primero) y forma parte de una señal de iniciación adecuada, proceso en el cual es asistido por eFI-1 y eFI-1A. Al producirse el apareamiento correcto entre las bases del codón de iniciación del ARNm y las del anticodón del met-ARNt_i, ocurre un cambio de conformación en eFI-2A que, auxiliado por eFI-5, estimula la actividad GTPasa de eFI-2A, provoca la hidrólisis del GTP y queda unido al GDP. De esta forma el complejo eFI-2A-GDP abandona el ribosoma y deja el met-ARNti en el lugar adecuado (denominado sitio P). También abandonan el ribosoma los otros factores de iniciación, esta etapa se ilustra en la figura 30.13. Es entonces cuando el eFI-5B cataliza la incorporación de la subunidad mayor, la cual, a su vez, estimula la actividad de GTPasa de eFI-5B que, al quedar unido al GDP, se disocia del ribosoma y se forma, de esta manera, el ribosoma funcional de 80 S, listo para comenzar el ciclo de elongación. El final de la iniciación se muestra en la figura 30.14.

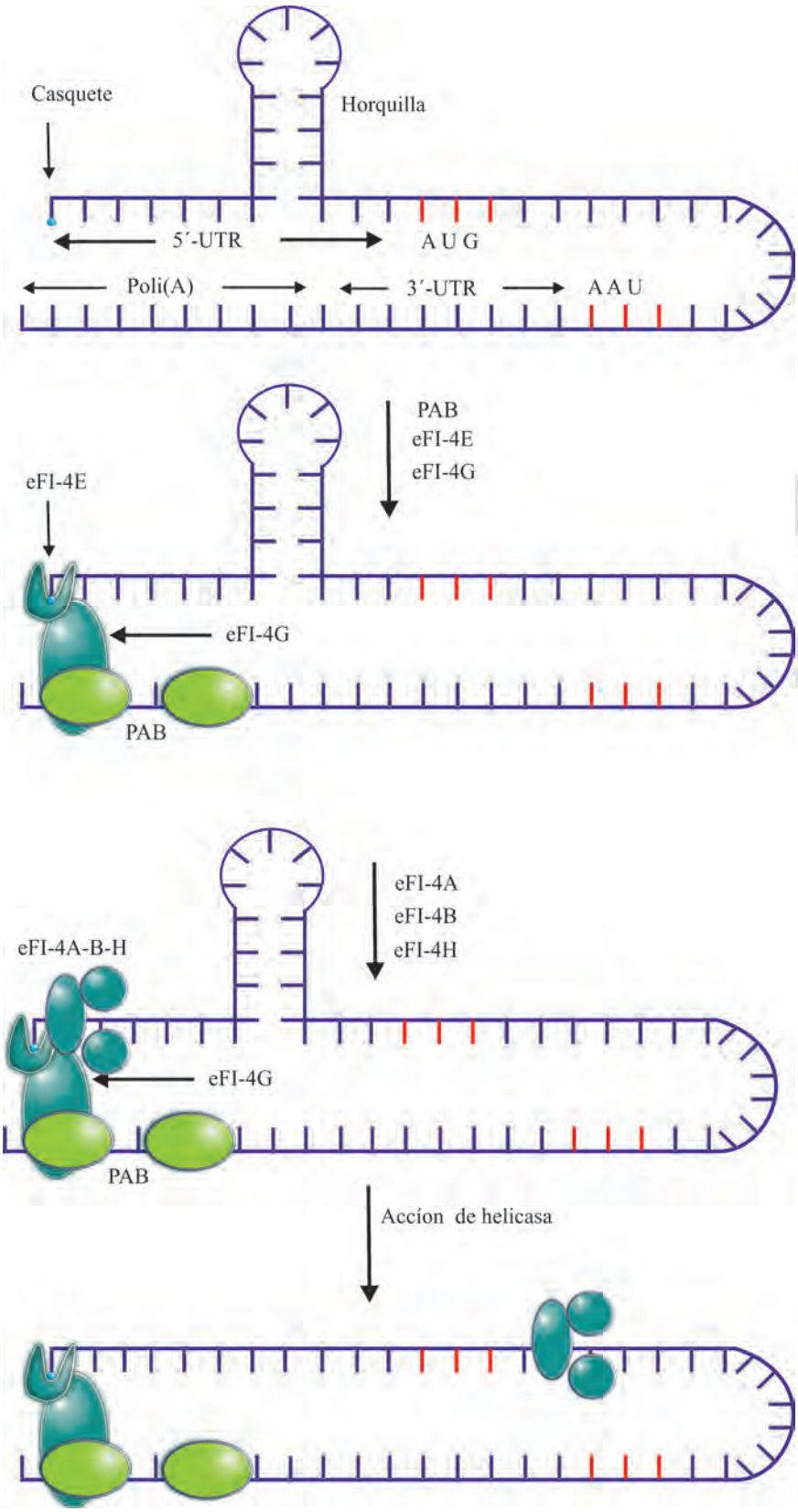


Fig. 30.11. Preparación del ARNm. En la parte superior se presenta la estructura del ARNm maduro. El eFI-4E reconoce al casquete, mientras que eFI-4G forma un puente entre el eFI-4E y la proteína de unión a poli(A) (PAB) dándole al ARNm una estructura circular. La acción combinada de eFI-4A, eFI-4B y eFI-4H elimina las estructuras secundarias en forma de horquilla de la región 5′-UTR y deja al ARNm listo para comenzar la traducción.

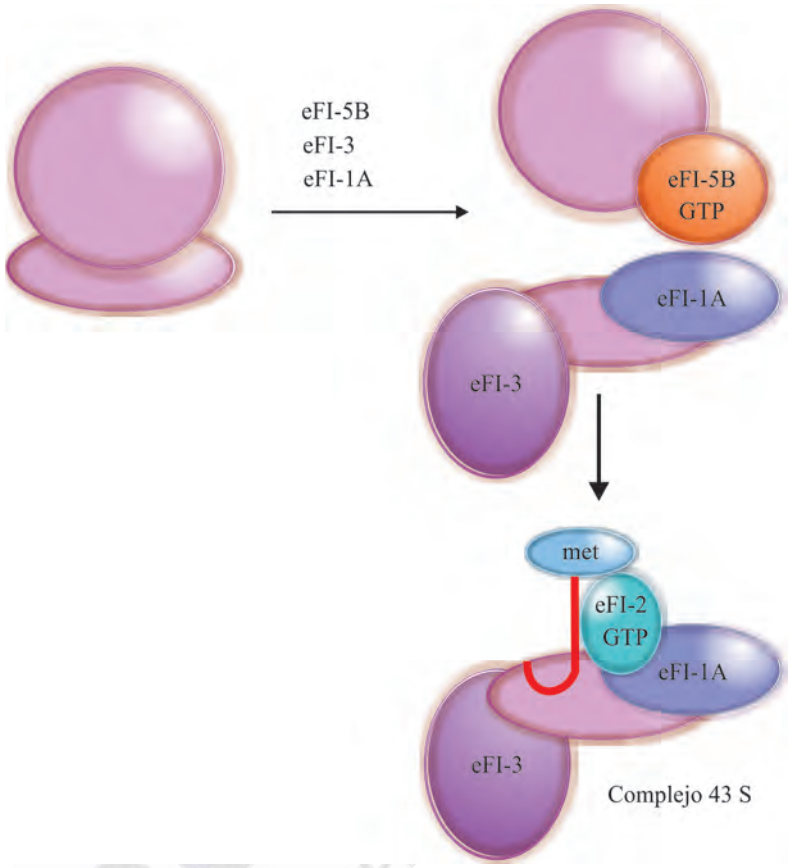


Fig. 30.12. Preparación de los ribosomas. El eFI-5B-GTP se une a la subunidad mayor y eFI-1A y eFI-3 se unen a la menor provocando la separación de las subunidades. A la subunidad menor se une el complejo ternario met-ARNti-eFI-2-GTP formando el complejo de 43 S.

Elongación

La elongación consiste en el alargamiento de la cadena polipeptídica, con la incorporación uno a uno de los aa-ARNt, de acuerdo con el orden de los codones en el ARNm. Es un proceso repetitivo cuya duración depende del número total de aminoácidos que deben ser incorporados a la proteína que se sintetiza.

La elongación de la traducción en eucariontes requiere de un conjunto de proteínas no ribosomales, denominadas factores de elongación (eFE). Este grupo incluye eFE-1A y eFE-1B, que están implicados en el reclutamiento de los aa-ARNt hacia el ribosoma, y eFE-2 que interviene en la translocalización del ribosoma.

En la elongación se describen habitualmente tres pasos fundamentales: la incorporación del aa-ARNt, la formación del enlace peptídico y el movimiento del ribosoma sobre el ARNm hacia el siguiente codón (Fig. 30.15).

Incorporación del aa-ARNt. Los aminoácidos son transportados hacia el ribosoma, donde forman un complejo ternario con el GTP y el factor de elongación 1 (eFE-1A) en forma aa-ARNt-GTP-eFE-1A. El ARNt desempeña una función importante en la ubicación del aminoácido y la descodificación, y posteriormente en la formación del enlace peptídico. Esto, a su vez, estimula la actividad GTPasa de eFE-1A. El eFE-1A-GDP libera el aa-ARNt en el sitio A, en una forma que permite continuar la elongación, en tanto este abandona el ribosoma.

El eFE-1A-GDP no es capaz de unir un nuevo aa-ARNt, pues para ello debe estar unido al GTP. El intercambio de nucleótidos es catalizado por eFE-1B.

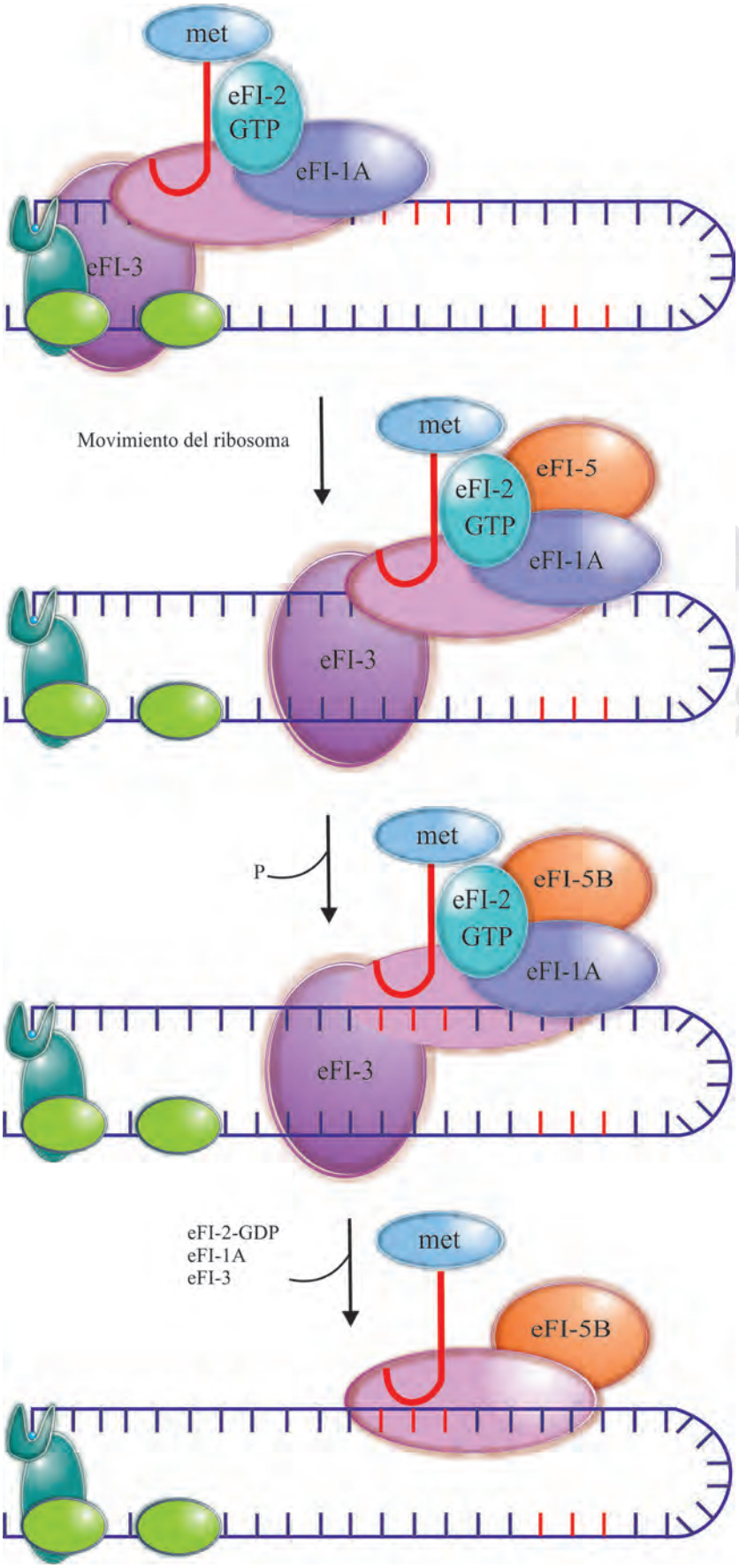


Fig. 30.13. Localización de la señal de iniciación. El complejo 43 S se asocia al eFI-4E en el extremo 5´ del ARNm y comienza a deslizarse hasta que el anticodón del met-ARNti se aparea con el codón de iniciación. El eFI-5 activa la GTPasa de eFI-2 liberando fosfato y formando eFI-2-GDP que abandona al ribosoma. Los otros factores también se disocian con la excepción del eFI-5.

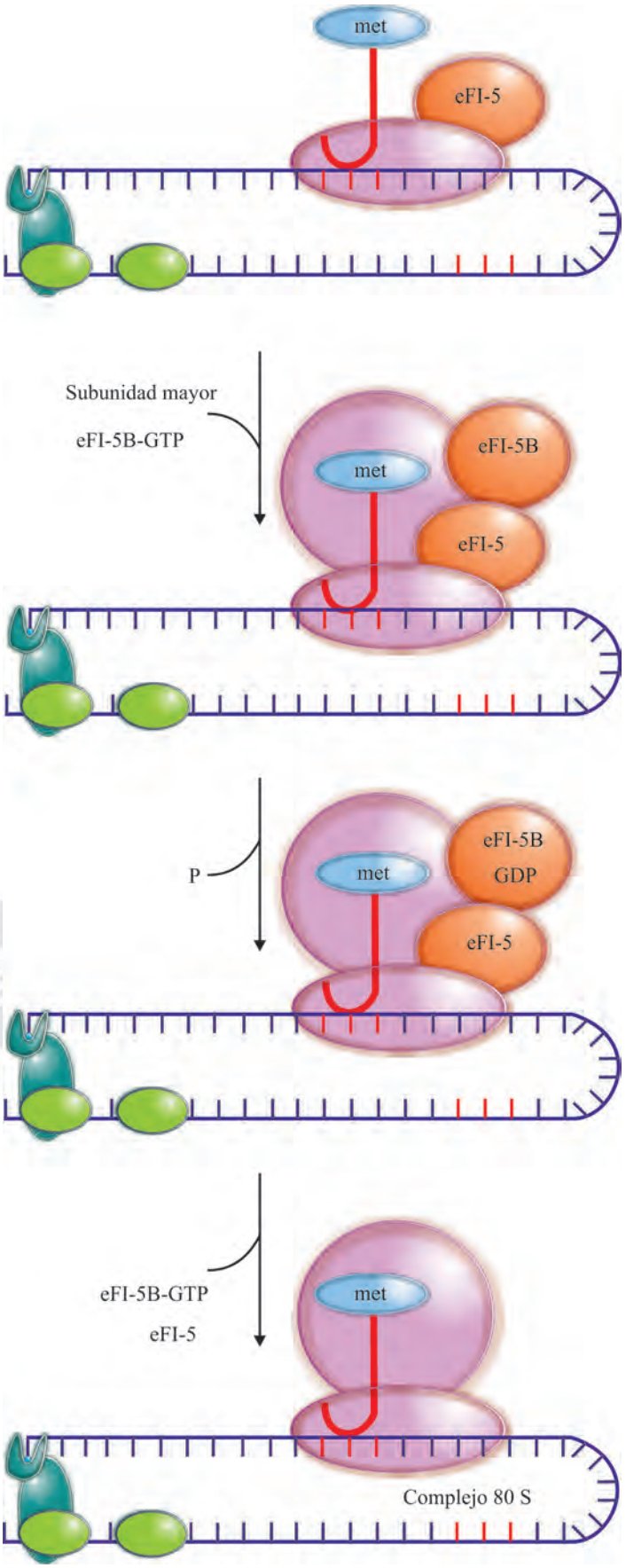


Fig. 30.14. Formación del ribosoma funcional de 80 S. El eFI-5B-GTP trae a la subunidad mayor hacia el sitio de la iniciación. Cuando se ha producido una unión correcta de las dos subunidades el eFI-5 estimula la actividad de GTPasa del eFI-5B que hidroliza al GTP y se mantiene unido al GDP. De inmediato tanto eFI-5 como eFI-5B-GDP abandonan al ribosoma y forman el complejo funcional de 80 S.

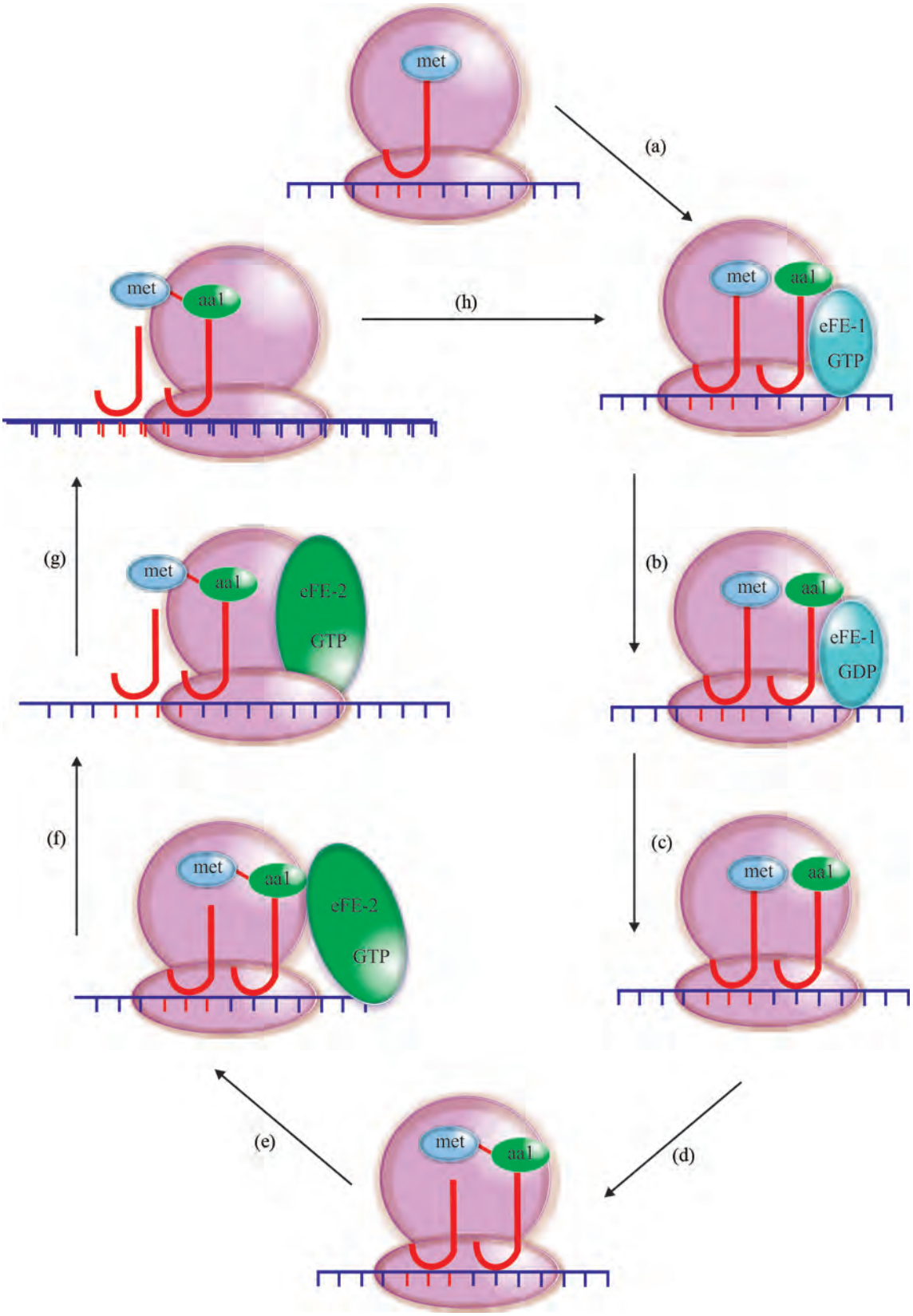


Fig. 30.15. Elongación. Se incorpora al sitio A el aminoacil-ARNt que se corresponde con el codón (a) unido con eFE1--GTP y de ser correcta la unión se hidroliza el GTP (b) y se libera el eFE1-GDP (c). Se forma el enlace peptídico (d) y el eFE2-GTP (e) mueve el ribosoma hacia el siguiente codón (f) hidrolizando el GTP y disociándose del ribosoma (g). El sistema está listo para la incorporación del siguiente aminoácido (h).

Formación del enlace peptídico. El centro con actividad de peptidil transferasa se localiza en la subunidad 60 S del ribosoma y está compuesto solamente por ARNr, sin proteína alguna dentro de los 15 Å del centro activo. Los tripletes conservados CCA del extremo 3´del ARNt se orientan de forma tal que el grupo amino del aa-ARNt produce un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del metARNt$_i$, lo que da lugar a la transferencia del residuo de metionina hacia el nuevo aa-ARNt y se forma un dipéptido unido al ARNt. El resultado de esta reacción es el ARNti desaminoacilado en un estado híbrido, esto es, con el extremo aceptor en el sitio E (del inglés *exit*: salida) de la subunidad mayor y el anticodón en el sitio P de la subunidad menor. También el peptidil-ARNt se encuentra en un estado híbrido, con el brazo aceptor en el sitio P de la subunidad mayor, y el anticodón en el sitio A de la subunidad menor. Estos estados híbridos deben ser eliminados por un movimiento del ribosoma que permita al ARNt$_i$ ocupar el sitio E de la subunidad menor, el peptidil-ARNt trasladarse al sitio P y un nuevo codón del ARNm posicionarse en el sitio A.

Translocalización del ribosoma. El movimiento del ribosoma hacia el siguiente codón del ARNm es catalizado por eFE-2. Esta proteína tiene un dominio con una estructura tridimensional, similar a la del brazo anticodón del ARNt, que le permite ocupar el lugar de este en el ribosoma. Dicho fenómeno se conoce como "mimetismo molecular". Por un mecanismo no conocido eFE-2 produce el movimiento del ribosoma dependiente de la hidrólisis del GTP. La hidrólisis del GTP deja a eFE-2 unido al GDP, lo que provoca que disminuya su afinidad por el ribosoma y termina por abandonarlo. No se conoce ninguna proteína con acción NEF sobre el eFE-2.

Debido a la acción de eFE-2, el ARNt$_i$ ocupa totalmente el sitio E; el peptidil-ARNt pasa al sitio P y en el sitio A aparece un nuevo codón del ARNm, listo para recibir el aa-ARNt que le corresponde.

Este ciclo de elongación se repite tantas veces como aminoácidos sean incorporados a la proteína, lo cual supone un gasto energético de al menos dos enlaces ricos en energía por cada aminoácido incorporado.

Terminación

La fase de terminación ocurre cuando un codón de terminación ocupa el sitio A del ribosoma y el peptidil-ARNt se encuentra en el sitio P. Esto trae como resultado la liberación de la cadena polipeptídica completa, debido a la hidrólisis del enlace éster entre el polipéptido y el ARNt que se encuentran en el sitio P. Una proteína conocida como factor de liberación (eRF), de clase I, descodifica la información del codón de terminación y estimula la hidrólisis que es catalizada por el centro de peptidil transferasa de la subunidad de 60 S. Otro eRF de clase II, con actividad de GTPasa, estimula la actividad del eRF de clase I, sin importar a cuál codón de terminación el eRF de clase I esté unido.

Al contrario de los procariontes, los eucariontes solo poseen un factor de liberación de clase I (eRF-1) que tiene una capacidad de descodificación total y puede promover la hidrólisis del peptidil-ARNt en presencia de cualquiera de los codones de terminación, UAA, UAG o UGA, por un mecanismo de mimetismo molecular. Los eucariontes también poseen solamente un factor de clase II, el eRF-3, que acciona la liberación del eRF- 1 del ribosoma una vez hidrolizado el peptidil-ARNt. La etapa de terminación se ilustra en la figura 30.16.

La estructura tridimensional del eRF-1 semeja una letra "Y" y presenta tres dominios: el dominio 1 ocupa la base de la Y, mientras que los dominios 2 y 3 ocupan los brazos. Los dominios 1 y 2, en su conjunto, son los que se unen al ribosoma, reconocen el codón de terminación y activan la hidrólisis del peptidil-ARNt. El dominio 3 sirve para la unión

con el eRF-3, mientras que los tres dominios son necesarios para estimular la actividad de GTPasa de eRF-3 y, por lo tanto, el eRF1 unido al ribosoma actúa como una GAP. Al producirse la hidrólisis del GTP los factores abandonan el ribosoma.

De esta forma los dos factores de liberación intervienen en la terminación, reconocen el codón de terminación, estimulan la hidrólisis del peptidil-ARNt y dejan libre al ribosoma para otro ciclo de traducción.

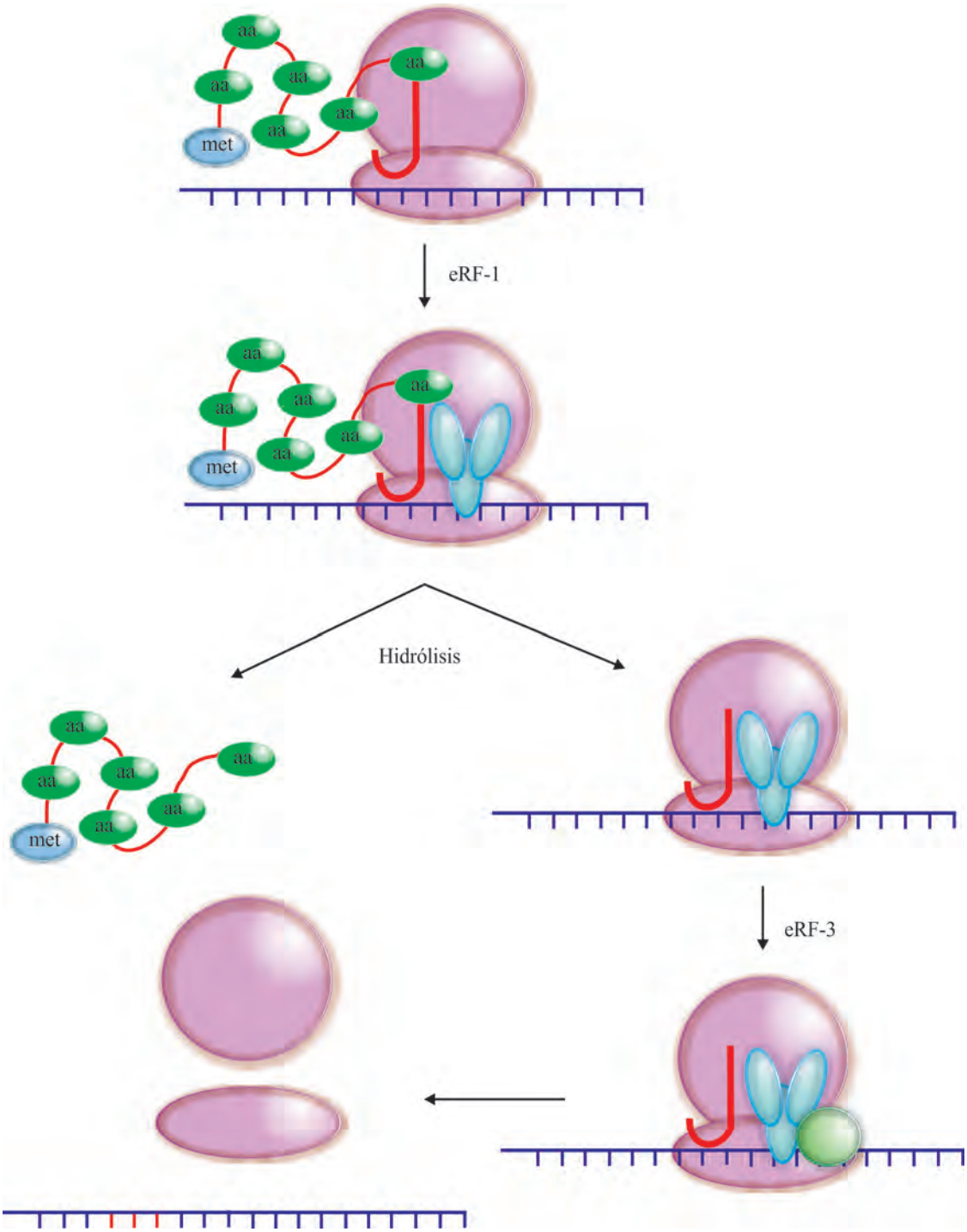


Fig. 30.16. Terminación. Al aparecer en el ARNm un codón de terminación, se produce la unión del eRF-1 que promueve la hidrólisis del enlace entre la cadena polipeptídica y el ARNt que está en el sitio P. El eRF-3 provoca la disociación total del sistema.

Es habitual que los ARNm contengan varios codones de terminación: unos repetidos en tándem y alguno fuera del marco de lectura, como si se quisiera asegurar que la síntesis de proteína termine donde debe hacerlo.

La existencia del carácter circular que adquiere el ARNm durante la traducción ha hecho que surja la idea de que el ribosoma puede pasar del extremo 3´del ARNm hacia el extremo 5´, con lo cual podría iniciar otro ciclo de traducción, este fenómeno recibe el nombre de reciclaje. Aunque la hipótesis es muy atractiva, no se ha corroborado experimentalmente.

De no ser así, el ribosoma se disociaría del ARNm y todo el proceso de traducción comenzaría desde el principio, como se ha descrito en los párrafos anteriores.

Como se puede inferir, el proceso de la traducción genética o biosíntesis de proteínas es complejo, en el cual interviene un número considerable de macromoléculas, cuyas propiedades estructurales y funcionales son decisivas para su éxito. También se implican problemas relacionados con la transferencia de información molecular y mecanismos de reacciones químicas que son poco usuales en los laboratorios.

Posterminación

La mayoría de las proteínas no tiene su conformación definitiva y funcional al abandonar los ribosomas. La cadena polipeptídica formada en el ribosoma suele experimentar modificaciones que se pueden producir de manera simultánea a su formación (modificaciones cotraduccionales), o una vez que ha sido liberada del ribosoma (modificaciones postraduccionales), que dan lugar a la forma definitiva y funcional de la proteína.

En los procariontes el grupo formilo de la formilmetionina es eliminado antes de terminar la traducción por la acción de una desformilasa específica, y en ocasiones, tanto en procariontes como en eucariontes, enzimas del tipo de las aminopeptidasas catalizan la separación de varios aminoácidos a partir del extremo N terminal. La eliminación de los aminoácidos parece estar influida por los aminoácidos que ocupan las posiciones siguientes: la metionina permanecerá como primer aminoácido, si el aminoácido que ocupa el segundo lugar es arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, isoleucina o lisina; mientras que será separada si los aminoácidos que ocupan el segundo lugar son alanina, glicina, prolina, treonina o valina. Con frecuencia el grupo aminoterminal constituido es acetilado por la acción de transacetilasas.

Algunas cadenas laterales de los aminoácidos son modificadas, por ejemplo, durante la síntesis del colágeno sucede la hidroxilación de los restos de prolina y de lisina; también son esterificados grupos fosfatos a restos de serina, tirosina y triptófano de numerosas proteínas.

Los grupos prostéticos son añadidos a las proteínas, como el hemo de la hemoglobina y los cofactores que se unen de forma covalente a la enzima, como la biotina, el FAD, etcétera.

Un evento postraduccional importante es la formación de los puentes disulfuro entre dos cisteínas que contribuyen a la estructura tridimensional de muchas proteínas.

La cadena proteínica puede ser hidrolizada en diferentes puntos, como sucede con los zimógenos del tubo digestivo, el pepsinógeno, el tripsinógeno, etc., que parecen ser formas de almacenamiento de la enzima y solo alcanzan su estado funcional en el momento de su acción.

La proinsulina es hidrolizada con la liberación de un segmento polipeptídico, denominado péptido C, que se encuentra en el centro de la molécula, haciendo que la forma funcional de la hormona esté constituida por dos cadenas polipeptídicas, cuando se ha sintetizado como una cadena polipeptídica única. En la hipófisis se forma una proteína que

es procesada mediante proteólisis parcial específica y puede dar lugar a varias hormonas de acuerdo con la posición de los enlaces peptídicos que son hidrolizados.

El ensamblaje de las proteínas formadas por subunidades también se produce después de la traducción. Este ensamblaje parece ser más sencillo en procariontes, donde en muchos casos todas las subunidades de una proteína multimérica se forman a partir de un solo ARNm policistrónico y, por tanto, se traducen de manera simultánea; en los eucariontes cada subunidad se forma a partir de ARNm diferentes.

Distribución de proteínas

En los organismos eucariontes tiene una significación especial el proceso de distribución de las proteínas. Todas las proteínas se forman en los ribosomas, pero deben realizar sus funciones en diferentes compartimentos celulares y, en ocasiones, deben ser llevadas hacia el exterior de las células. Las proteínas que permanecen en el citosol, así como las destinadas a las mitocondrias, los peroxisomas y el núcleo, son sintetizadas por ribosomas libres; las destinadas a otros compartimentos o hacia el exterior se sintetizan en ribosomas unidos a las membranas del retículo endoplasmático. A manera de ilustración se describirá el tránsito de proteínas a través de los sistemas membranosos de la célula, entre otras cosas por ser el mejor conocido.

Las proteínas que deben ser procesadas en el retículo endoplasmático se forman en un estado de preproteína, pues contienen hacia su extremo N terminal un pequeño péptido de 22 a 30 aminoácidos, denominado péptido señal. Cuando este péptido ha sido traducido es reconocido por un complejo nucleoproteínico conocido como partícula de reconocimiento de la señal que está formada por un ARN de aproximadamente 300 nucleótidos y seis proteínas de diferentes tamaños. Esta partícula actúa también sobre el ribosoma, bloquea la traducción y más tarde transporta los ribosomas hacia las membranas del retículo, transfiriéndolos a una proteína receptora que es parte integral de la membrana. La unión del ribosoma a su receptor recluta hacia esa zona un grupo de proteínas que se organizan en forma de canal, denominado aparato translocador, y hacia el cual es transferido el ribosoma. La unión del ribosoma al aparato translocador se realiza de manera que el dominio de secreción quede en contacto con la luz del canal, y al continuar la síntesis de la proteína esta es descargada hacia la luz del retículo (Fig. 30.17).

Formando parte del aparato translocador se han identificado, al menos, cuatro proteínas con actividad enzimática. La peptidasa señal separa el péptido señal del resto de la cadena polipeptídica, en tanto la péptido señal hidrolasa produce la degradación hidrolítica del péptido señal hasta sus aminoácidos constituyentes. Las dos enzimas restantes actúan sobre la cadena polipeptídica en crecimiento. La oligosacaril transferasa cataliza la transferencia de oligosacáridos hacia residuos específicos de serina o asparagina, en tanto la tiol disulfuro isomerasa cataliza la formación de los enlaces disulfuros y contribuye a la formación de la estructura tridimensional de las proteínas.

Las proteínas que pasan a la luz del retículo contienen pequeñas secuencias aminoacídicas que indican su destino. La presencia hacia el extremo C terminal de la secuencia KDEL determina que la proteína permanezca en el retículo, en tanto la señal KxKx o KKxx u otras con dos lisinas dirigen las proteínas hacia el aparato de Golgi. La presencia de manosa-6-P en el extremo de los oligosacáridos orienta las proteínas hacia los lisosomas. Se cree que existe otra señal para las proteínas que forman gránulos de secreción, pero no ha sido identificada. Estos gránulos de secreción se acumulan por debajo de la membrana plasmática y son segretados hacia el exterior cuando la célula recibe un estímulo específico. De igual manera se supone la existencia de señales que determinan la ubicación de proteínas en la membrana plasmática, en la cual parece ser determinante un residuo de tirosina. Si ninguna de estas señales está presente, entonces

la proteína es segretada en forma constitutiva, lo cual significa que la ausencia de señal es también una señal.

Aunque en los últimos años se ha progresado notablemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso de distribución de las proteínas, falta mucho por conocer para tener una imagen precisa de este proceso.

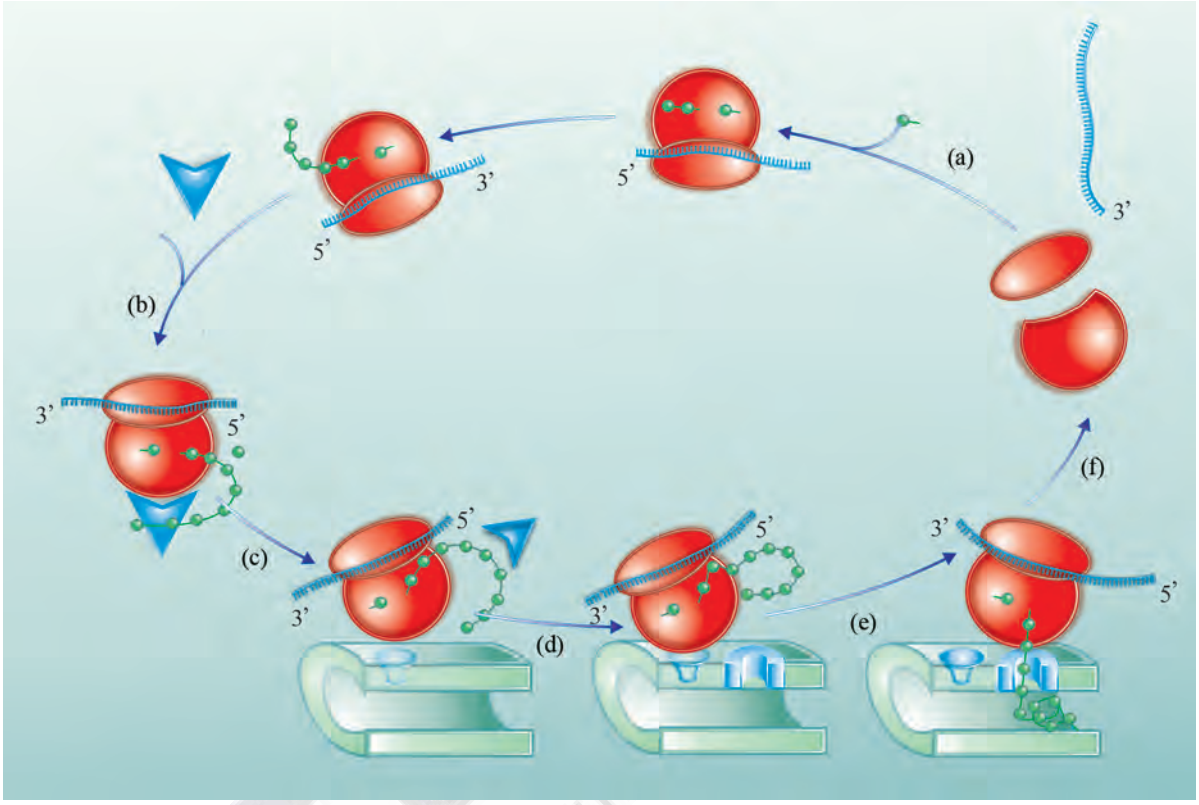


Fig. 30.17. Síntesis de las proteínas de secreción. (a) Formación del complejo de iniciación y comienzo de la elongación; (b) al aparecer el péptido señal este es reconocido por la partícula de reconocimiento que detiene la síntesis de proteínas; (c) los ribosomas son llevados a una proteína receptora que se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático; (d) la unión del ribosoma a su receptor provoca el reclutamiento hacia ese sitio de un grupo de proteínas que forman un canal a través de la membrana; (e) la proteína es translocada por el canal hacia la luz del retículo y la síntesis continúa, y (f) una vez terminada la síntesis, el ribosoma se separa del canal que se desarma y el ciclo comienza de nuevo.

Consideraciones energéticas

El proceso que se acaba de describir representa un gasto energético considerable para la célula que solo puede justificarse por el elevado valor que tiene el producto que se obtiene –las proteínas. Aunque se ha señalado que la hidrólisis del GTP tiene fundamentalmente una función reguladora, es cierto que la energía se libera y, por tanto, constituye un gasto para la célula, que se pudiera cuantificar si se tiene en cuenta lo que ocurre en cada una de las etapas.

En los eventos previos a la iniciación tiene lugar la activación de los aminoácidos, reacción en la cual se libera AMP, por lo que representa un gasto energético equivalente a dos ATP por cada aminoácido que es activado. En la iniciación un GTP es hidrolizado cuando el formilmetionil-ARNt o la met-ARNt$_i$ se incorpora al sitio P. Durante la elongación se requiere un GTP para la incorporación de cada aminoacil-ARNt y otro más para la translocalización. Como esta etapa tiene carácter repetitivo, representa el mayor gasto; también en la terminación se consume un GTP.

Para tener una idea real del gasto que el proceso representa, se tomará como ejemplo la síntesis de la α-globina que como se sabe tiene 141 aminoácidos. La activación de esos aminoácidos representa un gasto total de 282 ATP. La iniciación y la terminación consumen un GTP cada una. En la elongación harían falta dos GTP por cada aminoácido, por tanto el total sería otra vez de 282 ATP. En total serían 566 moléculas de ATP por cada molécula de la α-globina.

Inhibidores de la traducción

Debido a las diferencias entre los componentes del sistema traduccional en procariontes y eucariontes, los inhibidores del proceso en un tipo de organismo suelen no serlo en el otro, aunque existen excepciones.

Los principales inhibidores de la traducción son antibióticos que no solo han tenido valor en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sino también en el esclarecimiento de muchos de los aspectos relacionados con los mecanismos de la traducción.

La puromicina permitió comprobar la existencia de los dos sitios funcionales del ribosoma. Este antibiótico actúa como un análogo del aminoacil-ARNt (Fig. 30.18), pero no del fmet-ARNt$_i$ lo cual demostró que uno y otro se ubican en sitios diferentes. La adición de puromicina a un sistema de síntesis de proteínas provoca la terminación prematura de la cadena y origina pequeños péptidos de diferentes tamaños.

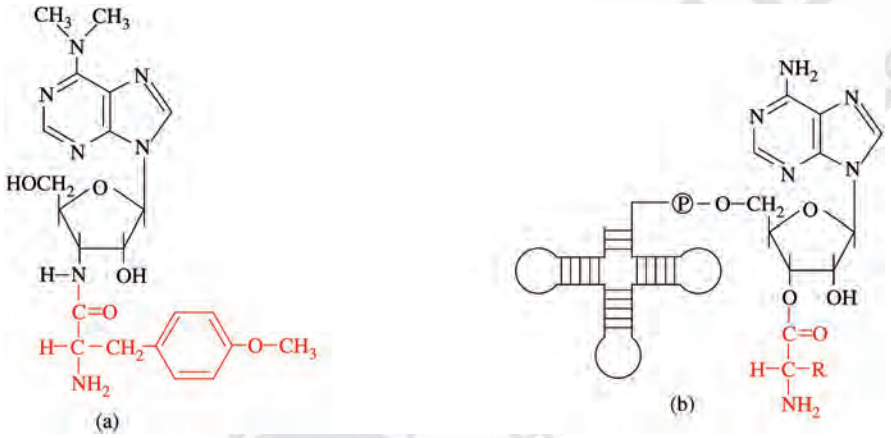


Fig. 30.18. Mecanismo de acción de la puromicina (a). Existe una gran similitud estructural entre la puromicina y el aminoacil-ARNt (b), por lo que el antibiótico se une al sitio A del ribosoma e impide la entrada del ARNt cargado, lo que provoca la terminación abortiva de la síntesis de la proteína.

La estreptomicina se une a la proteína S12 e impide la incorporación del ARNt$_i$ cargado o causa errores de lectura del código, si el proceso está en fase de elongación.

El cloranfenicol inhibe la peptidiltransferasa. La eritromicina se une a la subunidad 50 S e impide su reasociación con el complejo de iniciación de 30 S, pero no tiene efecto sobre la elongación (Fig. 30.19).

Resumen

La traducción constituye la etapa crucial del proceso general de expresión de la información genética, ya que en esta se producen las proteínas cuyas funciones específicas determinan un organismo.

Este proceso tiene lugar en los ribosomas y se produce unidireccionalmente del extremo N terminal al C terminal, colineal a la lectura del ARNm. Tiene carácter gradual y repetitivo y está acoplada a la hidrólisis de NTP; para su realización se requieren más de 200 macromoléculas específicas. Para su incorporación a las proteínas los aminoácidos deben ser activados, lo cual se logra con su unión a los ARNt específicos por enzimas denominadas aminoacil-ARNt sintetasas.

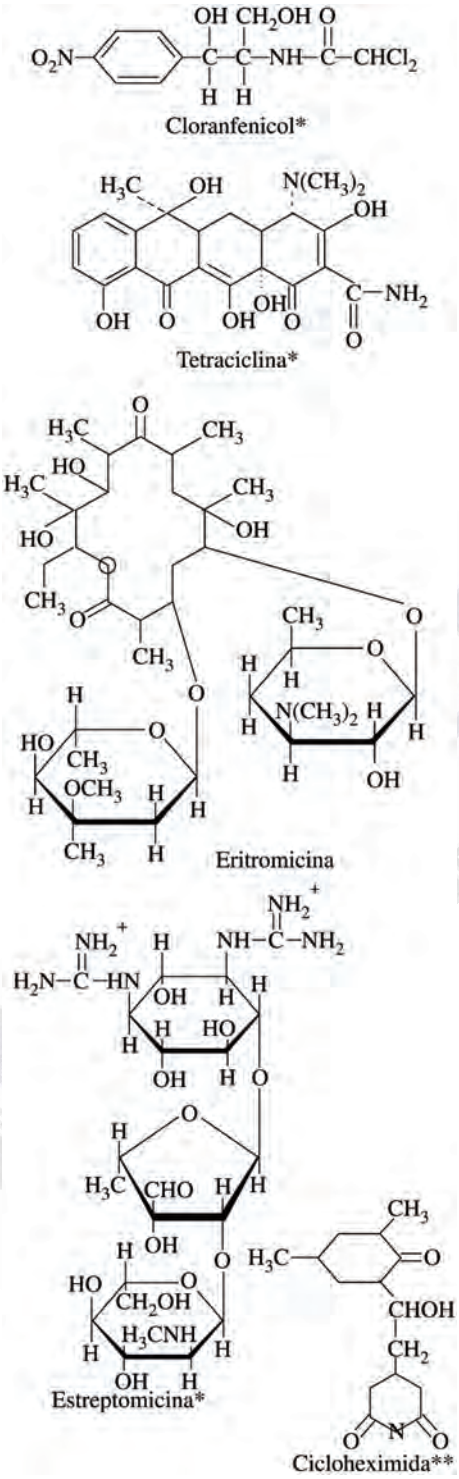


Fig. 30.19. Inhibidores de la traducción. Los principales inhibidores de la traducción son antibióticos, algunos de estos solo tienen acción sobre organismos procariontes (*), otros solo sobre eucariontes (**) y muy pocos sobre ambos.

La iniciación consiste en la formación del complejo de iniciación, para lo cual es necesaria la separación de las subunidades de los ribosomas y la unión específica a la menor del ARNm y del $ARNt_i$ cargado con N-formil-metionina en procariontes o metionina en eucariontes. En esta etapa son necesarias proteínas específicas, llamadas factores de iniciación, también se requiere la energía de hidrólisis del GTP.

La elongación consiste en la incorporación uno a uno de los aminoacil-ARNt determinados por los codones que aparecen sucesivamente en el ARNm y para lo cual se requiere de los factores de elongación y de la hidrólisis del GTP.

Durante la terminación algunas proteínas específicas, conocidas como factores de liberación, interactúan con el codón de terminación y no solo determinan el final de la síntesis, sino también el desensamblaje del sistema biosintético. En muchas ocasiones las proteínas son modificadas durante o después de la traducción hasta ser totalmente funcionales.

Existen numerosos antibióticos cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir alguna de las fases de la traducción, pero estos han contribuido considerablemente al conocimiento del proceso.

Ejercicios

1. Demuestre que en el proceso de la traducción se cumplen los principios siguientes:
   a) De los cambios graduales.
   b) De acoplamiento.
   c) De interrelación.
   d) De transferencia de información.
2. ¿Por qué en los experimentos de Niremberg y otros (ver capítulo 28) se podían utilizar, como ARNm, polinucleótidos que no contenían el codón AUG para la iniciación?
3. ¿Qué significado tienen en cuanto a la fidelidad de copia de la traducción las propiedades de las enzimas aminoacil-ARNt sintetasa?
4. La enzima nucleósidodifosfatoquinasa cataliza la reacción:

   $$ATP + GDP = ADP + GTP$$

   ¿Por qué cree usted que la inhibición de esta enzima provoca una inhibición de la traducción?
5. La cisteína puede perder su grupo sulfihidrilo espontáneamente. En un experimento con reticulocitos de conejo se observó que en algunas posiciones de la proteína donde debía aparecer cisteína, aparecía alanina. ¿Cuándo se produjo la pérdida del grupo sulfihidrilo, antes o después de la reacción de activación?
6. Una cepa de *E. coli* produce una proteína L12 mutante. Esta cepa es resistente a la acción de la estreptomicina. ¿Existe alguna relación entre estos dos hechos? Explique su respuesta.
7. Explique por qué la fosforilación del eFI-2α por la proteína quinasa, estimulada por el interferón, provoca una inhibición de la síntesis de proteínas. ¿Pudiera esta acción explicar la acción antiviral del interferón?
8. ¿Qué sucedería si por una mutación un ARNt pudiera leer uno de los codones de terminación?

Recombinación genética

La recombinación genética es uno de los procesos más importantes en que participa el ADN celular. Durante su transcurso se produce el intercambio de grandes segmentos de ADN entre dos moléculas. Sin este proceso, los cromosomas constituirían una combinación fija de alelos particulares, sujetos únicamente a los cambios mutacionales; el lugar de los daños provocados por las mutaciones se agrandaría muchas veces, ya que pasaría del gen al cromosoma; las mutaciones dañinas se irían acumulando hasta anular funcionalmente al cromosoma. Al intercambiar los genes de un cromosoma a otro, la recombinación permite la separación de las mutaciones dañinas de las beneficiosas, haciendo posible la eliminación de las primeras y la conservación de las segundas. Desde el punto de vista de la evolución, un cromosoma viene a ser algo así como "un ave de paso", una asociación temporal de alelos, cuya existencia particular en los grandes periodos evolutivos sería efímera.

Existen numerosas formas de recombinación genética, teniendo en cuenta el modo en que sucede el intercambio de los bloques de ADN y de acuerdo con el tipo de organismo donde se produce. El mecanismo es complejo y no está totalmente esclarecido ni en los organismos más simples, a pesar del extraordinario avance logrado en su comprensión durante los últimos años.

En este capítulo, primero se discutirán brevemente los conocimientos actuales acerca de los mecanismos moleculares de la recombinación genética, tomando como referencia el sistema mejor conocido –el de la *E. coli*–, y con posterioridad, los ejemplos más sobresalientes del proceso en seres humanos.

Historia del problema

El fenómeno de la recombinación genética fue descubierto en las primeras décadas del siglo XX por Thomas Hunt Morgan. A pesar de que el gen como unidad del fenómeno hereditario fue descubierto por Gregor Mendel a mediados del siglo XIX, quien además estableció las leyes que rigen su segregación, este hecho quedó casi en el olvido hasta principios del siglo XX cuando prácticamente las leyes de Mendel fueron "redescubiertas". A partir de ese momento comienza el desarrollo de la genética. Entre los años 1910 y 1925 Thomas Hunt Morgan y sus colaboradores realizaron extensos estudios acerca de

la genética de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*; mediante cuidadosas observaciones visuales detectaron más de 100 anormalidades físicas, debidas a mutaciones en los genes que se expresaban en variaciones en el color de los ojos, la forma de las alas, las antenas, etc. Morgan determinó que estos caracteres se segregaban en cuatro grupos que se correspondían con el número de cromosomas de la *Drosophila* e introdujo el concepto de ligamiento para aquellos genes que, por estar ubicados en el mismo cromosoma, con frecuencia se segregan unidos. Sin embargo, en algunos casos se observaba que los descendientes se apartaban del patrón de ligamiento, esto quiere decir que aparecían caracteres mezclados; a este fenómeno se le dio el nombre de recombinación.

Para ilustrar el concepto se utilizará un caso hipotético. Suponga que un animal tiene un gen que determina el color del pelo (llamémosle A) y otro que determina el de los ojos (que llamaremos B). Cuando el animal tiene la forma silvestre del gen, los ojos y el pelo son negros. Sin embargo, existen genes mutantes a y b que determinan la existencia de ojos verdes y pelo gris. Si se cruzan dos líneas puras de estos animales: uno de pelo y ojos negros y otro de pelo gris y ojos verdes, todos los descendientes son de ojos y pelo negros, por lo tanto estos son los caracteres dominantes. Si los genes A y B o a y b se encuentran muy cercanos en el mismo cromosoma, casi siempre segregarán juntos y los animales con ojos negros siempre tendrán el pelo negro y los de ojos verdes, el pelo gris. Sin embargo, si se obtiene un animal con ojos verdes y pelo negro o con ojos negros y pelo gris, significa que los genes han pasado de un cromosoma a otro, esto es, se ha producido la recombinación genética.

El proceso de la recombinación se puede observar durante el estudio microscópico de la meiosis de las células germinales, donde los cromosomas homólogos se disponen uno al lado del otro en una estructura denominada sinapsis, y luego se observa la fusión de estos en determinados puntos, denominados quiasmas.

Las experiencias de transformación del neumococo realizadas por Fred Griffiths, en 1928, constituyen también un proceso de recombinación genética, aunque en aquel momento no se conocía.

Desde entonces el fenómeno de la recombinación se ha observado cada vez con mayor frecuencia en los estudios experimentales y se han obtenido numerosos datos, tanto cualitativos como cuantitativos, que han permitido la construcción de mapas genéticos basados en la frecuencia de recombinación. Sin embargo, el mecanismo molecular continuaba siendo un misterio.

Un paso significativo fue dado en este sentido cuando en 1964 Robin Holliday, a partir de la interpretación de numerosos resultados experimentales, propuso un modelo que satisfacía todos los requerimientos y en el cual desempeñaba una función importante un intermediario, en el que dos cromosomas recombinantes se mantenían unidos de forma covalente, en una región determinada por una conexión entrecruzada, formada por el intercambio recíproco de dos de las cuatro cadenas de las dos moléculas de ADN que participan en el proceso. Esta estructura se conoce hoy como "el intermediario de Holliday".

Este intermediario tuvo una comprobación física en 1970, cuando pudo ser observado mediante microscopia electrónica. En los últimos años, estudios con extractos de *E. coli* y con productos génicos purificados, que estaban involucrados en la recombinación, han permitido profundizar en el conocimiento del proceso al nivel enzimático. Al estudio de la recombinación a este nivel está dedicado el contenido de este capítulo.

Tipos de recombinación genética

La recombinación se expresa en fenómenos diferentes entre los microorganismos que son generalmente haploides y los organismos diploides. En los haploides siempre

se requiere de la existencia de una molécula extraña de ADN o de un segmento de esta que se traslada de un lugar a otro. En los diploides el intercambio puede producirse entre dos moléculas que se encuentran en cromosomas homólogos.

La recombinación genética es el fundamento molecular de varios fenómenos como la transfección, la transformación, la transducción, la integración y la transposición. La transfección consiste en la transferencia de ADN de un organismo a otro mediante el uso de un vector, casi siempre un virus, y tiene un propósito experimental. En el proceso de transformación una molécula de ADN que aparece en el medio, por haber sido liberada por otra bacteria, es captada e incorporada al cromosoma bacteriano, determinando cambios en el fenotipo en la bacteria receptora, como sucedió en el experimento de Griffiths. Por su parte, la transducción necesita de un virus como vector, el cual asimila un segmento de ADN de una célula infectada y lo transfiere a otra que lo incorpora a su genoma. Por último, la conjugación se produce por el traspaso directo entre bacterias de pequeñas moléculas de ADN circulares denominadas plásmidos. En todos estos casos se requiere la existencia de grandes zonas de secuencias homólogas entre el ADN donante y el aceptor, las secuencias deben ser idénticas o casi idénticas. Debido a este requerimiento dichos procesos pertenecen al tipo llamado recombinación homóloga o general.

Un segundo tipo se presenta cuando un virus infecta una bacteria y el ADN viral experimenta un proceso de integración al ADN bacteriano, donde no existe homología entre la secuencia donante y la aceptora, sino que se produce por la presencia de secuencias específicas que permiten que enzimas determinadas las reconozcan, corten y empaten con el ADN viral; este tipo se denomina recombinación por sitio específico.

En la transposición un segmento de ADN migra de una parte a otra de la molécula o de un cromosoma a otro en los organismos diploides, sin que se requiera la existencia de secuencias homólogas.

En ocasiones se emplea el término de recombinación ilegítima para aquellos casos que no se ajustan a ninguno de los señalados, cuyos mecanismos y requerimientos son desconocidos.

En lo que se refiere a organismos superiores se suele hablar de recombinación sexual para designar aquella que se produce en las células sexuales, y recombinación somática cuando ocurre en el resto de las células.

Modelo de Holliday

El modelo más aceptado sobre el mecanismo de la recombinación genética fue propuesto por Robin Holliday, en 1964 (Fig. 31.1). Este comprende dos grandes etapas: iniciación y maduración.

Iniciación. Dos dobles hélices homólogas se alinean una al lado de la otra (apareamiento) y cada una de las bandas es cortada mediante enzimas en un lugar específico, de esta manera se crea un extremo libre que abandona la hebra complementaria a la cual estaba unida por puentes de hidrógeno, se asocia con la cadena complementaria de la otra molécula (invasión de hebra) y se establece una interacción física entre las dos moléculas a recombinar. Esta estructura se puede estabilizar por la acción de la ADN ligasa que forma los enlaces fosfodiéster correspondientes en cada hebra. La hebra invasora puede ir estableciendo cada vez un mayor número de puentes de hidrógeno con la molécula invadida y desplaza a la cadena original (migración de hebra). La estructura así formada recibe el nombre de intermediario de Holliday.

Este intermediario no es estático y su posición puede ir variando en un sentido o en otro por el mecanismo de migración, o puede rotar sobre su eje cilíndrico (isomerización), lo que hace que adquiera una nueva forma.

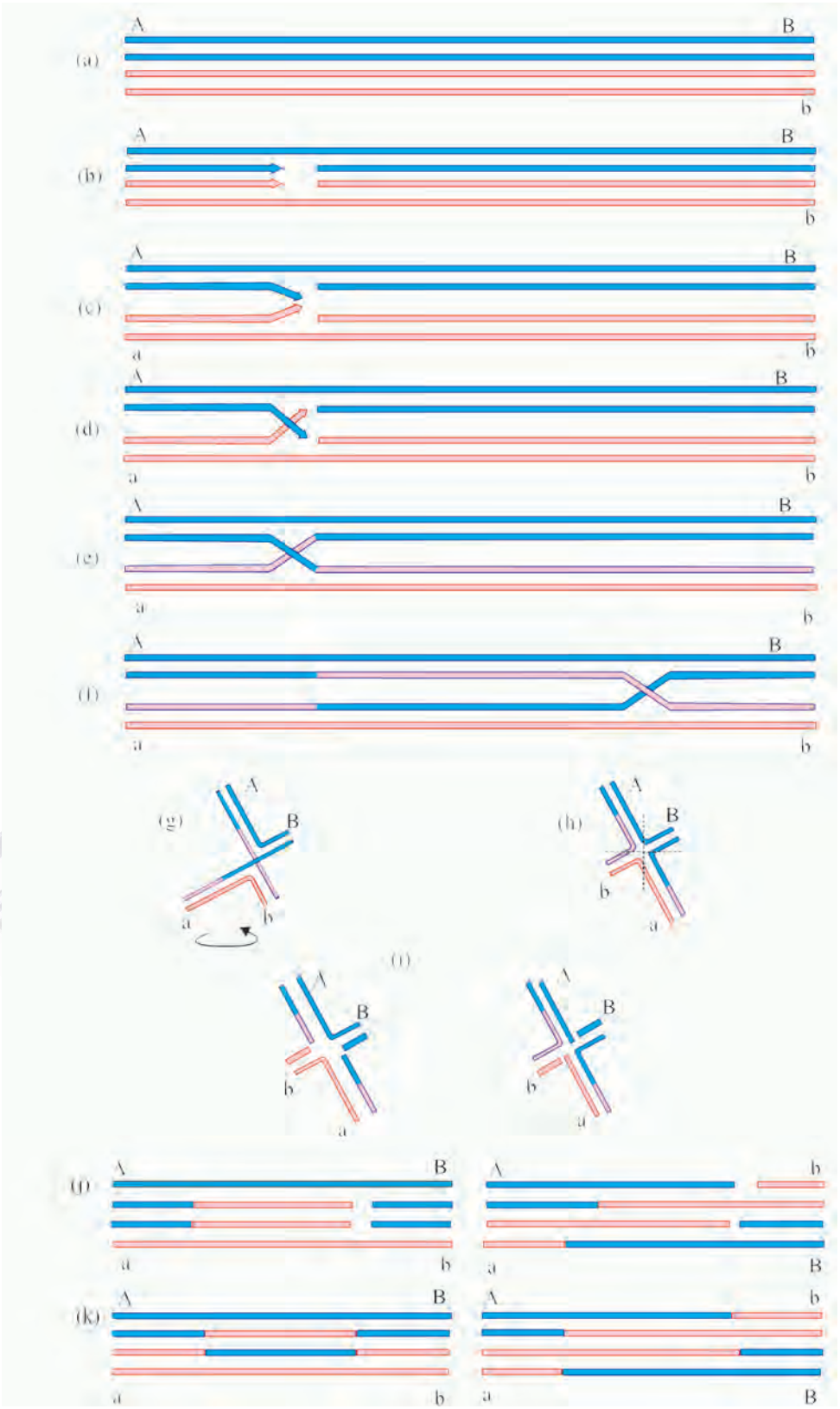


Fig. 31.1. Modelo general de Holliday. El modelo de recombinación propuesto por Holliday plantea que dos moléculas de ADN se aparean (a) y se produce un corte en cada una de las bandas (b). Los extremos libres invaden la molécula contraria (c y d) y forman puentes de hidrógeno con la cadena complementaria. La ADN ligasa sella la brecha (e) y se produce la migración de la hebra (f), dando el intermediario de Holliday. Se observa que en este momento existe una zona formada por cuatro cadenas de ADN, enrollada una sobre otra. La isomerización por rotación (g y h) y el corte posterior en un sentido vertical u horizontal (i) dan lugar a dos moléculas recombinadas (j y k). La zona heteróloga o heterocigótica se observa cuando en un sector de la molécula, una de las cadenas aparece en rojo y la otra en azul.

La construcción de modelos espaciales ha probado, sorpresivamente, que no existen impedimentos estéricos para la existencia de esa estructura y que casi todas las bases se encuentran apareadas.

La migración de la hebra puede dar lugar a la formación de zonas heterólogas de ADN, segmentos donde el apareamiento de las bases está alterado con la formación de áreas que son genéticamente heterocigóticas; este es uno de los hechos que más ha apoyado el modelo de Holliday.

Estudios teóricos y prácticos han llevado a la conclusión de que la velocidad de migración es suficientemente elevada como para permitir la formación de zonas híbridas en condiciones fisiológicas.

Dada la simetría de la estructura, la maduración puede ocurrir de dos formas y dar lugar a dos pares de cromosomas recombinantes.

La ruptura de arriba a abajo o de izquierda a derecha libera moléculas de ADN de igual tamaño, en las cuales pueden existir regiones heterocigóticas, y los genes que están en los flancos pueden mantenerse en su posición original o con igual probabilidad pudo haberse realizado una recombinación recíproca.

Este modelo es muy atractivo como mecanismo general de la recombinación porque puede dar cuenta de las propiedades genéticas de cromosomas recombinantes que se producen en las formas más complejas de intercambio de genes que se conoce –la meiosis de los eucariontes.

Dos hechos importantes se deben recordar:

- La recombinación ocurre con la conservación neta del material genético: por cada dos cromosomas que entran al proceso, salen dos cromosomas.
- Los cromosomas recombinantes se producen en pares recíprocos, no en general entre la población, sino durante eventos individuales de entrecruzamiento.

Comprobación del modelo

Aun cuando el modelo de Holliday fue propuesto sobre la base de estudios genéticos en eucariontes, su confirmación se realizó por estudios en procariontes, especialmente en *E. coli*.

El genoma de *E. coli* está constituido por una gran molécula circular de ADN y en el citoplasma bacteriano se encuentran moléculas independientes de ADN, también circulares, pero de mucho menor tamaño que reciben el nombre de plásmidos.

Si ocurriera la recombinación entre dos moléculas circulares de ADN se debe formar una estructura semejante al número ocho, como se muestra en la figura 31.2, o una molécula doble, dimérica, de acuerdo con el momento en que se observe la estructura. Este tipo de estructura en forma de 8 fue observado en el microscopio electrónico a partir de plásmidos extraídos de *E. coli*.

Aunque la existencia de la estructura en 8 se puede considerar como una evidencia del mecanismo propuesto, no es suficiente para demostrarlo, ya que se pueden obtener estructuras similares por la existencia de dos círculos concatenados o por un solo círculo que se ha torcido sobre sí mismo y da lugar a esta imagen. Para eliminar esas posibilidades, los extractos fueron tratados con una enzima de restricción que provocaba un solo corte en cada una de las moléculas; si se tratara de alguno de los casos mencionados debían obtenerse una o dos moléculas lineales de ADN, según el caso; si fuera el intermediario de Holliday lo que se está visibilizando, el resultado sería una estructura de forma similar a la letra griega chi (χ) con dos pares de brazos de igual longitud. Esta fue la estructura visibilizada (Fig. 31.3), con lo cual quedó demostrada la existencia del intermediario de Holliday.

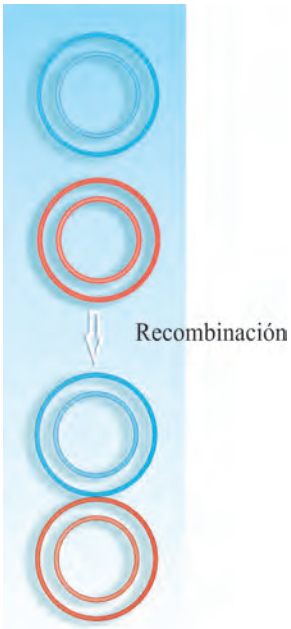


Fig. 31.2. Recombinación de moléculas circulares. Cuando las dos moléculas recombinantes son circulares existe una estructura intermedia que recuerda la figura del número 8.

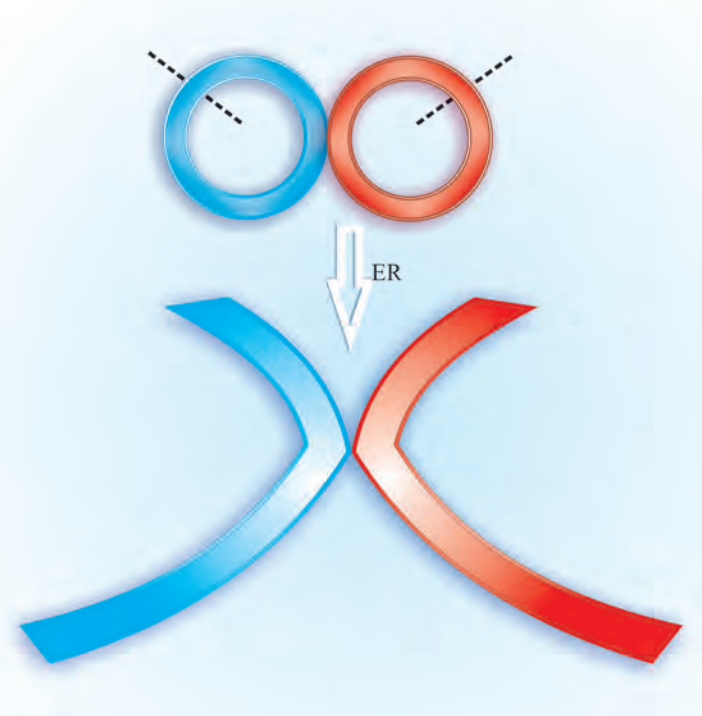


Fig. 31.3. Moléculas circulares recombinadas. Cuando las moléculas circulares recombinadas se tratan con una enzima de restricción, que haga solo un corte en cada una de las moléculas, se origina una figura similar a la letra griega chi.

Formación del intermediario de Holliday

Existen tres modelos fundamentales para explicar la formación del intermediario de Holliday, con el propósito de ajustar el mecanismo propuesto a los datos experimentales, sobre todo en cuanto al grado de heterología del ADN recombinado.

El modelo descrito en la figura 31.1 supone que cada una de las moléculas de ADN, una vez apareadas, son cortadas mediante enzimas en un sitio específico. La hebra que posee el extremo libre invade la otra molécula en zonas de secuencias homólogas y más tarde el mecanismo de migración aumenta la zona de ADN heterólogo. La brecha existente es sellada por la acción de la ADN ligasa; de esta forma la zona heteróloga es similar en ambas moléculas.

Un mecanismo alternativo (Fig. 31.4) plantea que el corte se produce en una sola hebra de una de las dos moléculas (Fig. 31.3) y esta invade la otra molécula en zonas homólogas. Se produce entonces la migración de la hebra mientras que la ADN polimerasa I va llenando el espacio que queda en la otra molécula. En algún momento posterior se produce la invasión de la otra molécula y con ello aparece el intermediario de Holliday, cuando las bandas son selladas por la ligasa. En este caso las zonas heterólogas son de tamaño diferente.

Un tercer modelo se muestra en la figura 31.5, según el cual se produce un determinado grado de desnaturalización del ADN en las cadenas apareadas, lo cual posibilita la invasión recíproca de las bandas si existen secuencias homólogas. Se produce la migración en los dos sentidos, para lo cual es necesaria la participación de la topoisomerasa I, originándose dos zonas de entrecruzamiento que por un solo corte dan lugar al intermediario de Holliday. Aquí, las zonas heterólogas son iguales en tamaño.

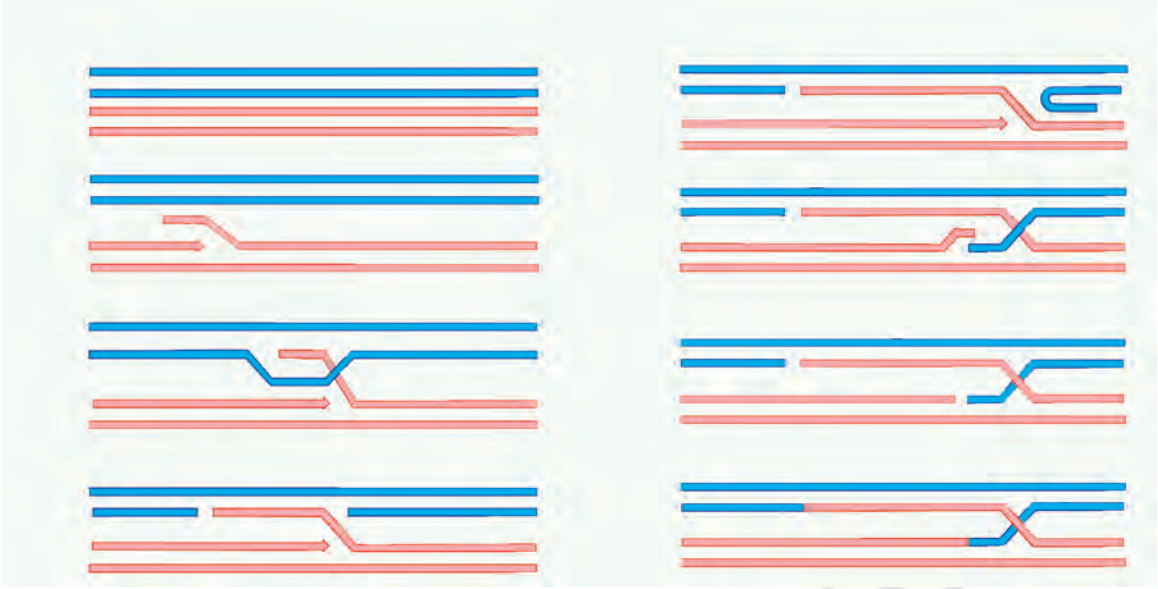


Fig. 31.4. Modelo de alternativo de recombinación. En este modelo una de las cadenas invade la otra (a la izquierda) y la hebra que queda desapareada es rellenada por la ADN polimerasa I (a la derecha). Después es que se produce la invasión de la hebra contraria y el proceso sigue igual al modelo ya descrito. Se observa que en este caso la zona heteróloga es diferente en cada una de las moléculas recombinadas.

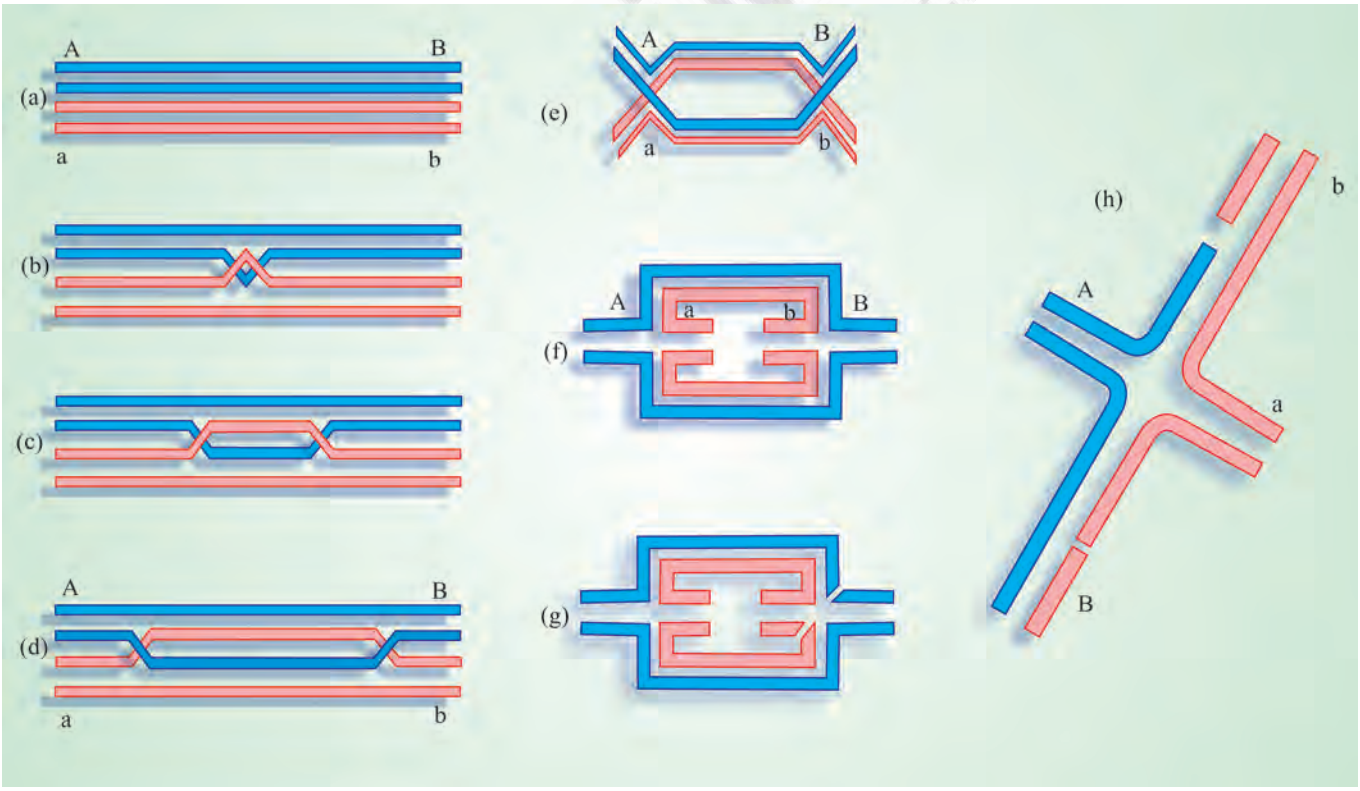


Fig. 31.5. Modelo de recombinación sin corte. Dos moléculas de ADN se aparean a todo su largo (a). Una desnaturalización local permite la invasión recíproca de las dos moléculas (b), que va aumentando en longitud (c y d). El paso de isomerización por rotación (e y f) y el corte (g) dan lugar al intermediario de Holliday (h) que se madura y da dos moléculas recombinadas, cuyas zonas heterólogas son de igual longitud.

Enzimología de la recombinación

Por estudios con bacterias mutantes se han podido identificar 12 genes involucrados en el proceso de la recombinación y son principalmente de las familias rec y ruv. Además, están los relacionados con las proteínas que participan en el metabolismo general del ADN, como la ADN polimerasa I, la ADN ligasa, las SSB y las topoisomerasas I y II.

No todos los genes de la familia rec se han podido caracterizar con igual profundidad, lo cual supone que el proceso no está completamente esclarecido. Sin embargo, el conocimiento actual permite buena aproximación al mecanismo molecular del proceso.

Estudios experimentales han demostrado que mutaciones en el gen recA pueden reducir hasta 1 000 veces la recombinación genética. La proteína RecA es un polipéptido de 40 kD, cuya síntesis se incrementa notablemente en situaciones que afectan de forma negativa el metabolismo del ADN (luz ultravioleta, ácido nalidíxico, bleomicina o mitomicina C), haciendo que pase de su nivel normal de unas 2 000 moléculas por célula a 50 000 aproximadamente, o sea, 6 % del total de las proteínas celulares.

La primera actividad enzimática conocida de RecA fue su acción proteolítica, cuyo significado se aclara en el capítulo 33 y no está relacionada con la recombinación.

Con posterioridad se demostró que la interacción con ADN de cadena simple (ADNs) desarrollaba en esta una fuerte actividad de adenosintrifosfatasa (ATPasa) y le permitía catalizar la asimilación de esa hebra a una molécula de ADN de doble hebra (ADNd), donde existieran zonas de secuencias homólogas.

En experimentos de recombinación la cantidad de RecA necesaria es directamente proporcional a la cantidad de ADNs en el sistema, en forma estequiométrica; un monómero de 40 kD es necesario por cada tres bases de ADNs. La RecA puede unirse tanto al ADNs como al ADNd, pero de forma diferente y compleja. Su unión al ADNs es más simple y no requiere ATP, pues si se añade, este es hidrolizado rápidamente y RecA se une y se separa de forma alternativa del ADNs. En contraste, en condiciones fisiológicas la unión de RecA al ADNd requiere ATP y es 100 veces más lenta que su unión al ADNs. El sitio de unión del ADNs y el ADNd es el mismo o son tan próximos que llegan a superponerse.

El producto de recB es un polipéptido de 140 kD que se asocia con el producto de recC, un polipéptido de 128 kD y con el de recD de 58 kD, formando una proteína multimérica conocida como RecBCD. Mutaciones en estos genes disminuyen la recombinación al nivel de 1 % del tipo silvestre, muy importante, aunque menos que recA. Tiene una potente actividad de exonucleasa y endonucleasa. Lo más sobresaliente es una actividad de endonucleasa de sitio específico como la enzima de restricción que reconoce la secuencia 5'GCTGGTGG3', conocida como motivo chi (χ). La enzima corta el ADN en el cuarto o sexto nucleótido después de 3'. Los productos de los demás genes de la familia rec son menos conocidos, aunque se sabe que RecF es una proteína de unión al ADNs, RecJ es una exonucleasa para ADNs y RecQ es una helicasa.

La otra familia génica implicada es ruv. RuvA es una proteína de 22 kD que forma tetrámeros, los cuales se unen al ADN que presente forma de X. RuvB es una ATPasa débil de 34 kD que se une al complejo ADN¦RuvA, y RuvC que solo tiene 19 kD es capaz de resolver los intermediarios de Holliday por rupturas endonucleolíticas.

Cuando RecBCD se incuba con ADNd, ATP y ADNs, su actividad de nucleasa se suprime y actúa desenrollando el ADNd, como una helicasa, de este modo se expone ADNs que es cubierto por las SSB. Se ha propuesto un modelo a partir de los estudios cinéticos de la enzima. En condiciones fisiológicas un extremo de RecBCD se une al ADNd y comienza a desenrollarlo a una velocidad de 300 nucleótidos por segundo. La cadena formada es liberada en el otro extremo a una velocidad de 200 nucleótidos por segundo. La diferencia de velocidades origina un asa de ADNs, que va creciendo en la

medida que la enzima se desplaza sobre el ADNd. Estas bandas simples interaccionan con las SSB que las cubren totalmente y aparecen cadenas simples que pueden servir de sustrato a RecA para comenzar la recombinación. Cuando aparece el motivo chi (χ) corta la hebra y genera el extremo libre necesario para la acción de RecA, que se polimeriza en forma helicoidal alrededor del ADNs y forma un surco donde se pueden alojar tanto el ADNs como el ADNd, por lo cual se supone que un ADN trifibrilar actúa como intermediario de la recombinación.

Una vez formado el complejo ADNs:ADNd:RecA se produce la asociación entre las dos hebras, si existe homología de secuencia; de no ser así se produce la hidrólisis del ATP y la separación del complejo que vuelve a unirse en otro sitio hasta formarse un apareamiento estable (Fig. 31.6).

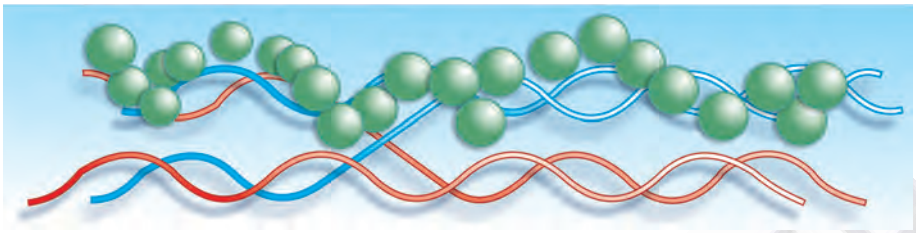


Fig. 31.6. Unión entre el ADN y RecA. Las moléculas globulares de RecA forman un filamento doble que se asocia con el ADN. La rotación de la molécula va provocando la migración de la hebra invasora.

La homología que se requiere no es absoluta, de lo contrario, las zonas heterólogas no se formarían. En pruebas realizadas se ha demostrado que el ADN con una homología de 90 % puede ser recombinado, en tanto otros con 70 % no pueden recombinarse; el límite de máxima tolerancia no es conocido aún. En este primer paso se produce el apareamiento de 300 a 500 pares de bases, después el ATP es hidrolizado y el complejo se disocia. Para la migración es necesaria la acción reiterada de RecA que se asocia y disocia hidrolizando ATP en cada ciclo.

En esta primera etapa intervienen las SSB, aun cuando RecA puede hacer todo el proceso hasta la formación del intermediario de Holliday, este evento mejora extraordinariamente su eficiencia si al sistema se añade SSB, con lo cual se requiere de menos cantidad de proteína RecA y de hidrólisis de ATP para lograr un grado igual de recombinación en relación con preparaciones que no contienen SSB.

Mientras la hebra invasora no se encuentre unida de forma covalente por la ADN ligasa, no se presentará ningún problema topológico, ya que existe un extremo libre que permite la relajación de las tensiones que se van creando en la medida que la migración avanza. Pero una vez que la brecha ha sido sellada, aparecerán los problemas topológicos, los cuales pueden ser resueltos con la participación de la topoisomerasa I, que por ruptura y formación de enlaces fosfodiéster permite aliviar las tensiones de manera similar a como ocurre en la replicación.

La enzimología de la maduración es menos conocida. El descubrimiento de las enzimas codificadas por los genes de la familia ruv ha comenzado a esclarecer esta etapa final del proceso de recombinación. Sin embargo, aún queda mucho por aclarar. Se espera que los métodos modernos de análisis genéticos permitan que en los próximos años todos los mecanismos implicados en el proceso de recombinación genética queden totalmente esclarecidos.

Recombinación genética en seres humanos

Al igual que en muchos organismos superiores, en los seres humanos tienen lugar procesos de recombinación. A continuación se ofrecerá una descripción simplificada de un ejemplo de recombinación somática y otro de recombinación sexual.

Recombinación somática. El ejemplo más sobresaliente de la recombinación somática en los seres humanos es el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas durante la maduración de los linfocitos B que son los productores de anticuerpos.

Las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos. Una cadena mayor, denominada H (del inglés *heavy*: pesada) y una cadena corta, L (del inglés *light*: ligero), se aparean a partir del extremo N-terminal y forman un dímero que se une a un dímero igual mediante puentes disulfuro. Las características de la cadena H determinan el tipo de inmunoglobulina: IgA, IgG, IgM, etc. La estructura de las inmunoglobulinas se muestra en la figura 31.7.

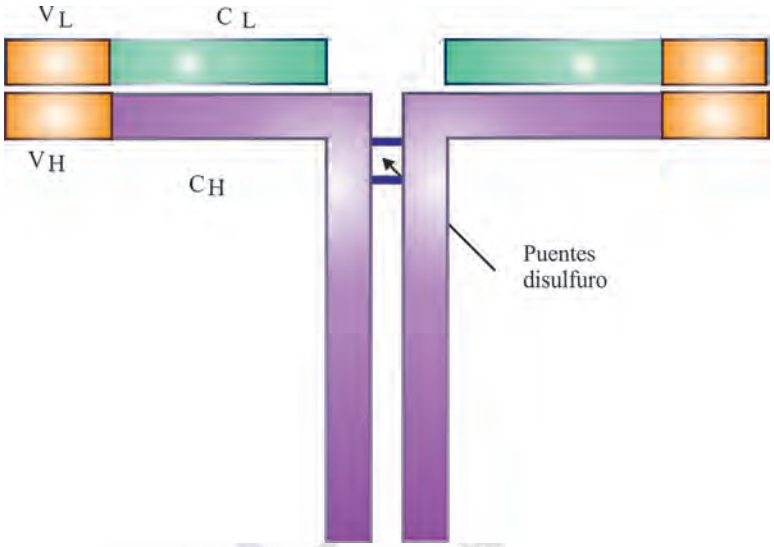


Fig. 31.7. Estructura de las inmunoglobulinas. Cada molécula está formada por dos cadenas ligeras (L) y dos pesadas (H) unidas por puentes disulfuro. Cada cadena está formada por un zona variable (VL y VH) y dos zonas constantes (CL y CH). Las zonas variables de las dos cadenas forman el sitio de unión con el antígeno.

Aproximadamente los 100 primeros aminoácidos de las dos cadenas son diferentes en todas las inmunoglobulinas del mismo tipo y por eso se le llama zona variable (V); el resto es igual en las moléculas del mismo tipo y se le llama constante (C). Esta gran diversidad estructural es resultado de la forma de organización de los genes, pues no están organizados de forma continua, sino por sectores. Así, el conjunto génico de las cadenas pesadas tiene varios sectores variables (V), otros que son de unión o J (del inglés, *join*, unir) y otros que se denominan D, por incrementar la diversidad (Fig. 31.8).

Durante la maduración de los linfocitos B se produce la reordenación de estos segmentos génicos que dan lugar a una unidad de transcripción de la cual se origina un ARNm que al traducirse producirá una molécula única de inmunoglobulina.

Hacia el lado 3´de cada segmento V existe una secuencia señal de recombinación (SSR), formada por un heptanucleótido y un nonanucleótido, separados por un espaciador de 12 pb y hacia el extremo 3´de los segmentos D también existe un nonanucleótido y un heptanucleótido, pero separados por un espaciador de 23 pb. Las proteínas de los genes RAG1 y RAG2 (del inglés, *recombination activating genes)* acercan la SSR del extremo 3´de un sector V con la SSR del extremo 5´de un sector D. Estas proteínas catalizan la hidrólisis del enlace fosfodiéster entre el heptámero y la zona V y D, de manera que en ambas aparece el extremo 3´-OH que produce un ataque nucleofílico sobre el fosfato de la hebra complementaria formando una estructura en forma de horquilla y liberando la zona que une al segmento V con el D. Estos extremos en forma de horquilla generan una estructura llamada sinapsis que se mantiene por el complejo Rag1/Rag2 que recluta al complejo Ku (formado por Ku70 y Ku80) hacia ese sitio. Las proteínas Ku son las subunidades acompañantes de la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK); tienen

forma de anillo y se enrollan a los dos extremos del ADN y reclutan hacia ese sitio a la subunidad catalítica de ADN-PKcs. Esta fosforila y activa a la endonucleasa codificada por el gen Artemisa y que produce la ruptura de la horquilla. Los extremos de las zonas codificantes de los segmentos V y D son "podados" por exonucleasas no identificadas y los segmentos monofibrilares, alargados por ADN polimerasas. Por último, los sectores codificantes son ligados por la acción combinada de XRCC4 (del inglés, *X-ray repair cross-complementing protein 4*), XLF y la ADN ligasa IV. De esta manera queda formado el segmento génico que codificará la primera parte de la zona N-terminal de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

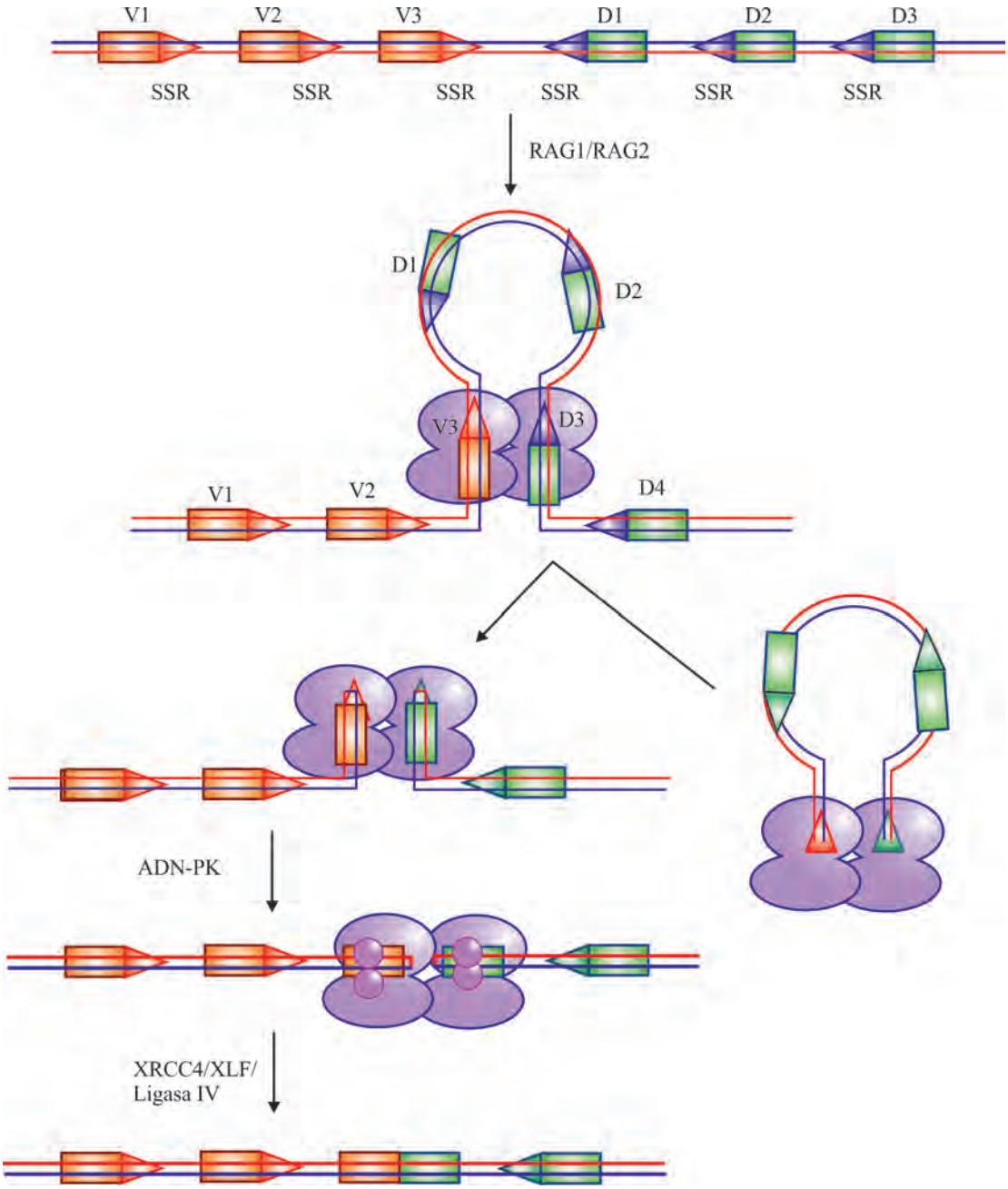


Fig. 31.8. Recombinación somática. Un sector V y otro D son unidos por el complejo RAD1/RAD2 utilizando las secuencia señal de recombinación (SSR) y corta las dos moléculas liberando toda la zona de ADN intermedia entre los dos sectores. Los bordes son procesados por un complejo de proteínas que incluye a la ADN-PK y sellados por XRCC4/XLF/ADN ligasa IV. Más detalles aparecen en el texto.

Recombinación sexual

En los seres humanos el ejemplo más claro de recombinación sexual se produce durante la meiosis en el proceso de maduración de los gametos.

Breve recuento de la meiosis. La meiosis es el proceso mediante el cual se producen los gametos a partir de células germinales precursoras. Consta de dos divisiones celulares sucesivas sin que entre estas se produzca la replicación del ADN. Durante el proceso se produce la reducción a la mitad del número de cromosomas y como resultado se obtienen cuatro células haploides. En la primera división, especialmente en la profase, es donde ocurren los procesos fundamentales, mientras que la segunda transcurre como una mitosis normal.

La meiosis comienza cuando la célula precursora alcanza la etapa G2 después de haber replicado el ADN. La profase de la primera división en la meiosis (profase I) es un paso crítico en el ciclo de vida de las células reproductoras en los eucariontes. Durante esa fase una sucesión de eventos celulares y moleculares coordinados aseguran que los cromosomas homólogos de origen materno y paterno segreguen adecuadamente permitiendo la eventual formación de los gametos haploides. Uno de esos eventos es el intercambio de ADN entre cromosomas homólogos mediante la recombinación homóloga, lo cual conduce a la trasmisión a la progenie de nuevas combinaciones de alelos. En la profase I es cuando se producen los procesos fundamentales. Comienza la condensación de los cromosomas que permite la observación de zonas más gruesas en el ADN, llamadas cromómeros, con un patrón característico para par cromosómico. Después los cromosomas homólogos empiezan a acomodarse por parejas a lo largo de toda su extensión, fenómeno denominado sinapsis y es muy preciso, de modo que las moléculas de ADN contactan punto por punto a todo lo largo del par de cromosomas. La unión de los cromosomas se produce mediante un complejo multiproteínico denominado complejo sinaptonémico. A continuación se completa la sinapsis y se condensan los cromosomas de manera que pueden observarse las cromátidas, por lo que a este estado se le denomina tétrada. Al final el complejo sinaptonémico ha desaparecido, pero los cromosomas homólogos se mantienen unidos por estructuras denominadas quiasmas que mantienen unida la pareja; el par de cromosomas alcanza su máxima condensación y de esta forma se localizan en el plano ecuatorial para dar comienzo a la metafase.

La metafase I comienza con la desaparición de la envoltura nuclear y la formación del huso acromático, y los cromosomas homólogos se colocan en la placa ecuatorial. Cada uno de los cromosomas del par se une al huso por el cinetócoro.

En la anafase I cada cromosoma del par migra hacia los polos celulares, esto es, a diferencia de la mitosis en la cual migra una de las cromátidas, en esta fase de la meiosis migra un cromosoma completo, de manera que las células hijas tendrán la mitad de los cromosomas de la célula madre.

En la telofase los cromosomas comienzan a descondensarse, se restablece la envoltura nuclear y se produce la división celular mediante el proceso de citoquinesis.

La segunda división transcurre como una mitosis normal. Durante la anafase a cada polo celular migrará solamente una de las cromátidas de cada cromosoma, de manera que al producirse la citoquinesis cada una de las cuatro células resultantes contiene solamente una de las cuatro cromátidas de cada par de cromosomas que poseía la célula madre.

Mecanismo de la recombinación. Consiste en el intercambio recíproco entre homólogos y es el resultado del intercambio de alelos en largos intervalos cromosómicos. Un aspecto clave de la regulación de la recombinación meiótica es la coordinación entre el procesamiento del intermediario de Holliday y los cambios en la organización de los cromosomas para garantizar el apareamiento de los homólogos y al menos un cruzamiento por cada par de homólogos.

Cada evento de recombinación meiótica comienza con una rotura de doble hebra programada (DSB) que es catalizada por la proteína meiótica similar a la topoisomerasa SPO11. En los cromosomas existen los puntos críticos que abarcan de 1 a 2 kb y se ha observado que el proceso comienza aproximadamente en el centro de esos sitios. En los seres humanos se han identificado 25 000 puntos críticos. Solamente los *loci* a los lados de los puntos críticos resultan recombinados.

Una función determinante la desempeña la proteína 9 con dominio PR, PRDM9 (del inglés, *PR domain-containing protein 9*). Se trata de una enzima con actividad de histona metil-transferasa que cataliza la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3). La PRDM9 contiene un dominio con una estructura digitiforme de Zn^{2+} que se une a motivos de secuencias de ADN en el centro de los puntos críticos. Una vez unida al ADN, la PRDM9 cataliza la formación de H3K4me3 en los nucleosomas vecinos y esa marca es necesaria para el reclutamiento hacia ese sitio de un complejo que contiene a SPO11.

Dos complejos con SPO11 se unen al sitio marcado con H3K4me3, uno a cada hebra del ADN. La SPO11 es similar a las toposiomerasas, pues cataliza la transferencia del fosfato del enlace fosfodiéster hacia un residuo de tirosina de la proteína enzimática, con lo cual provoca la rotura de las dos hebras. La formación de la doble rotura está altamente regulada, de manera que solo se forma una en cada par de cromosomas homólogos. Este proceso dura aproximadamente 4 semanas en los ovocitos y 3 semanas en los espermatocitos.

La aparición de la forma fosforilada de la variante de histona H2AX es uno de los primeros signos de la formación de la doble rotura, detectados en el leptonemo. Esta fosforilación es catalizada por la quinasa ATM que activa los mecanismos de reparación de varios tipos de doble rotura.

La endonucleasa de la recombinación meiótica MRE11 (del inglés, *meoitic recombination*) cataliza la hidrólisis del ADN varios nucleótidos por delante de SPO11, de manera que la enzima queda unida covalentemente a un oligonucleótido y así abandona al ADN. Otras proteínas también participan en esta etapa.

A continuación la hebra que contiene el extremo 3´-OH invade la molécula de ADN del cromosoma homólogo mediante apareamiento de bases con la hebra complementaria y formando un lazo D (por desplazamiento) en un proceso dependiente de Rad51 y Dmc1. Esta hebra es alargada por la acción de una ADN polimerasa. A su vez, el lazo D establece interacciones con la otra hebra de la misma cromátida y permite su alargamiento, así se forma el intermediario de Holliday. Este intermediario es resuelto por la acción de la exonucleasa MUS81 que hidroliza ADN con estructuras específicas. Las cromátidas recombinadas se mantienen unidas por los chiasmatas hasta el final de la anafase. Un resumen del proceso se muestra en la figura 31.9.

Al concluir el proceso se ha producido un intercambio de ADN entre cromosomas homólogos que no necesariamente tienen la misma información genética.

Significado biológico de la recombinación

La recombinación genética es un fenómeno fundamental en los seres vivientes, ya que constituye uno de los principales mecanismos de intercambio de información genética entre estos. El hecho de que un organismo pueda captar e incorporar a su genoma segmentos extensos de ADN provenientes de otras fuentes, como sucede en la transformación, constituye un factor trascendente en la evolución de los seres vivos, ya que le permite la adquisición de nuevos caracteres que pueden representar una ventaja selectiva. Lo mismo sucede con la transducción, cuya diferencia esencial consiste en que el material genético es transportado de una célula a otra por la acción de un virus. El virus de la inmunodeficiencia humana, productor del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), cuando penetra en las células del sistema linfoide forma un ADN que luego se integra al genoma celular mediante un mecanismo de recombinación por sitio específico.

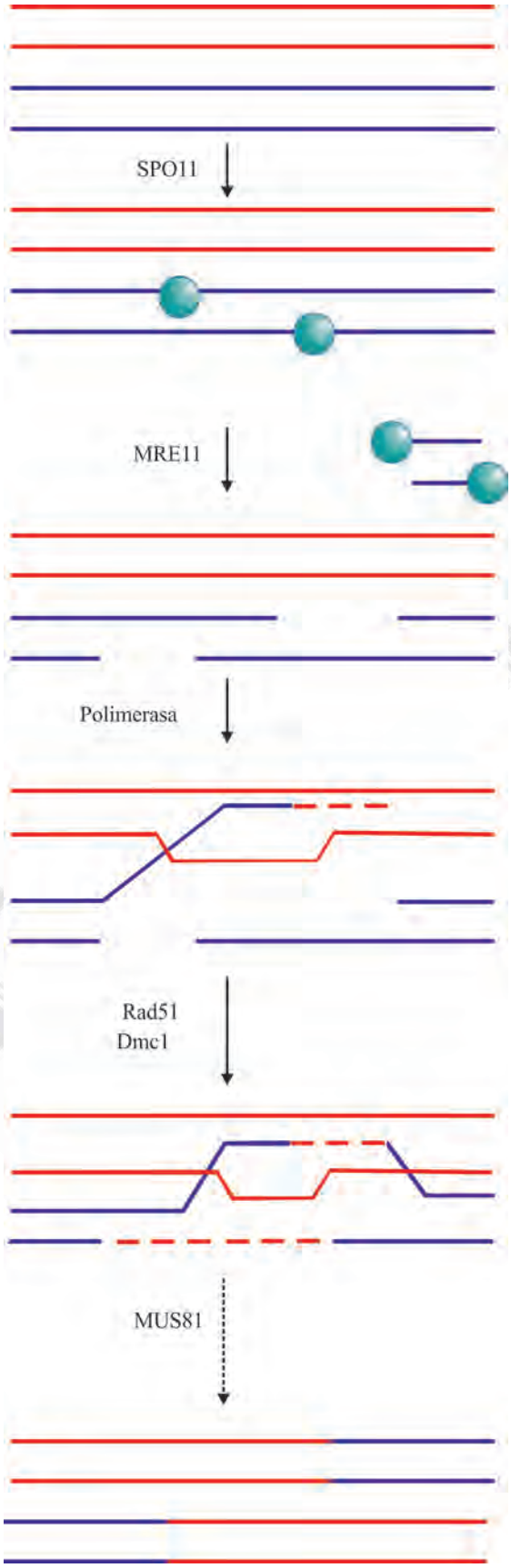


Fig. 31.9. Recombinación sexual. Las dos moléculas de ADN de cromosomas homólogos se aparean. La SPO11 se asocia a cada una de las hebras de una molécula. La endonucleasa MRE11 corta al ADN unos nucleótidos por delante del sitio de unión de SPO11 que unida a un oligonucleótido abandona al ADN. Se produce la invasión de una hebra y después de la otra. Las cadenas son alargadas por un polimerasa formándose el intermediario de Holliday. La estructura es resuelta por MUS81 originando dos moléculas recombinadas.

En organismos con reproducción sexual la recombinación genética representa el mecanismo fundamental –aparte de la mutación– para la creación de nuevos genotipos por una redistribución de los genes parentales, lo cual en muchos casos puede originar genotipos ventajosos que representarían una mejoría en la adaptación al medio, aumentando la supervivencia y la reproducción.

Pero la recombinación puede representar también un mecanismo de defensa o depuración contra las mutaciones dañinas y una forma de hacer perdurables las beneficiosas. Si no existiera la recombinación al producirse una mutación dañina sobre un gen, comenzaría un proceso irreversible sobre el cromosoma que la porta, lo cual conduciría inevitablemente a su desaparición funcional; una nueva mutación agravaría el proceso y así sucesivamente. Los efectos de mutaciones beneficiosas serían opacados por los daños establecidos. Como ya se ha dicho, la localización de un gen en un cromosoma solo es temporal, ya que al producirse la recombinación ese gen puede trasladarse a otro cromosoma y de esta forma dos mutaciones dañinas pueden ser físicamente separadas, incluso una beneficiosa de otra dañina como se muestra en la figura 31.10.

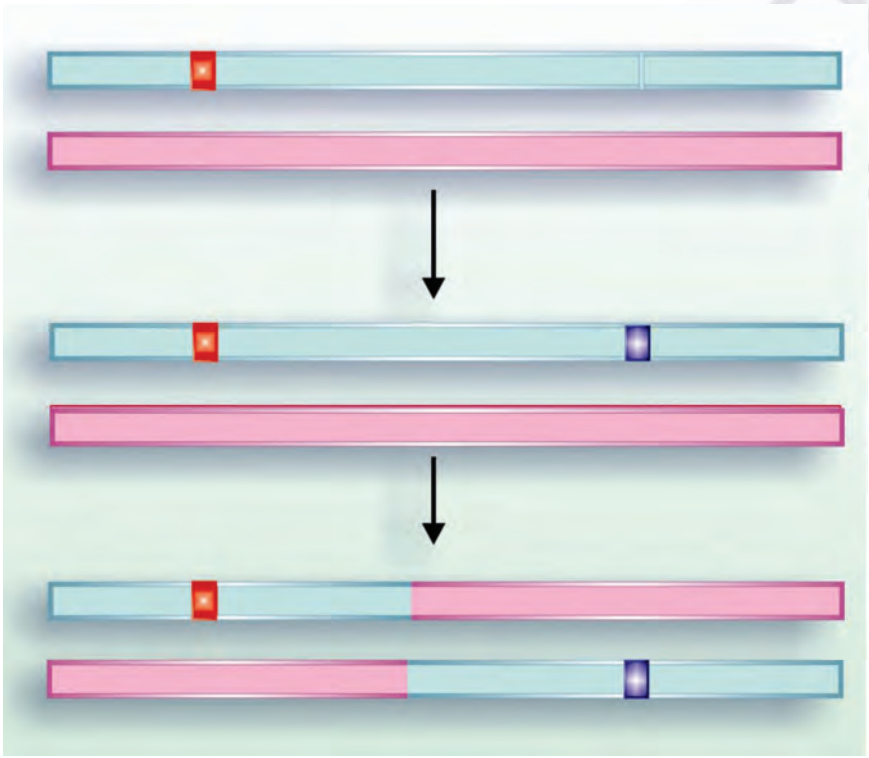


Fig. 31.10. Separación de genes mutados. En uno de los dos cromosomas homólogos ha ocurrido una mutación beneficiosa que se representa en rosado. Se muestra el proceso de mutación, pero ahora se trata de una dañina, representada en azul. El organismo que herede ese cromosoma heredará los dos genes mutantes, pero mediante un proceso de recombinación separa las dos mutaciones durante la evolución; los organismos que adquieran la mutación beneficiosa se podrán adaptar mejor al ambiente, sin llevar consigo la mutación dañina.

Durante la gametogénesis en la división meiótica ocurre la recombinación de los cromosomas homólogos, con lo cual pueden aparecer gametos con genotipos diferentes a los parentales.

La existencia de recombinación entre las células somáticas embrionarias, lo que ha permitido desarrollar toda una teoría para explicar la formación de la gran diversidad de inmunoglobulinas por las células linfoides, como se discute con mayor amplitud en el capítulo 84.

En la mitosis de las células somáticas se han observado entrecruzamientos de cromátides, similares a los de la meiosis, pero no ocurre la recombinación, ya que en este caso las cromátides que intercambian son hermanas y por tanto iguales.

El proceso de recombinación genética es uno de los principales mecanismos que intervienen en la producción de la gran variación de los seres vivos, hasta tal punto que se puede afirmar que en una especie dada no existen dos individuos totalmente iguales.

Resumen

La recombinación genética es uno de los procesos más importantes en que participa el ADN celular. En esta etapa se produce el intercambio de grandes bloques entre dos moléculas de ADN. Existen diferentes tipos de recombinación, de acuerdo con las características de la molécula donante y la aceptora. La transformación, transducción y conjugación pertenecen al grupo denominado recombinación general u homóloga, en tanto la transposición es de tipo heteróloga. Al nivel molecular la recombinación consta de dos etapas: la iniciación, con la formación del intermediario de Holliday, y la maduración.

Se ha planteado un modelo general para explicar el proceso en términos enzimáticos; este comienza con la participación de la proteína RecBCD que al moverse sobre el ADN crea una zona desnaturalizada de varios cientos de bases que se mantiene gracias a la intervención de las proteínas SSB. Una de estas cadenas invade la otra molécula que participa en el proceso.

En este momento interviene la proteína RecA que se une a la hebra invasora y forma un complejo ADN-RecA, que explora la otra molécula hasta encontrar una zona de homología en la secuencia de bases, para lo cual provoca la desnaturalización parcial de la molécula receptora. Al encontrar la zona homóloga se produce el apareamiento de bases entre la hebra invasora y la molécula receptora. A medida que el apareamiento progresa se crean zonas de tensión en la molécula que pueden ser eliminadas con la participación de la topoisomerasa I. La rotación de la molécula formada da lugar a la aparición del intermediario de Holliday.

La ruptura del intermediario produce dos nuevas moléculas recombinadas, pero de esta etapa es poco lo que se conoce y solo recientemente se ha encontrado una enzima producida por el fago T4 que reconoce esta estructura como sustrato.

La frecuencia en la recombinación de dos o más genes ha permitido la elaboración de mapas genéticos en varios organismos.

En los seres humanos existen dos tipos generales de recombinación: la somática y la sexual. El caso más estudiado de recombinación somática es el proceso de maduración de los genes de las inmunoglobulinas en los linfocitos B. Estos genes se encuentran formados por sectores para las zonas variables de la proteína. En el proceso varios sectores se unen y dan lugar a un gen funcional que codificará una sola molécula de la inmunoglobulina correspondiente.

La recombinación sexual se produce en la meiosis durante la formación de las células germinales. El proceso es muy complejo y no está totalmente aclarado, pero durante la primera profase se produce el intercambio de grandes sectores de ADN entre cromosomas homólogos. De esta forma los descendientes no serán necesariamente iguales a sus progenitores.

La recombinación genética es el principal mecanismo capaz de explicar la gran diversidad de organismos que componen una especie, de ahí su valor en el proceso evolutivo. Además, puede significar un mecanismo de protección, ya que permite la separación de las mutaciones dañinas de las beneficiosas. Se espera que en los próximos años se produzcan notables avances en nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la recombinación genética.

Ejercicios

1. ¿Qué significado tuvo en la historia del conocimiento de la recombinación genética la aparición del modelo de Holliday?
2. Tomando como base el modelo de Holliday ¿puede afirmarse que en todo proceso de recombinación se obtienen siempre dos moléculas recombinadas?
3. ¿Qué entiende usted por una molécula de ADN heterocigótica? ¿Qué función desempeña en la recombinación?
4. ¿Cuáles son las principales analogías y diferencias entre los modelos propuestos para explicar la formación del intermediario de Holliday? ¿En cuál de ellos es imprescindible la participación de la topoisomerasa I?
5. Los organismos que carecen de la proteína RecA realizan la recombinación con muy baja frecuencia. ¿Cómo explicaría usted este fenómeno en esos organismos?
6. ¿Por qué puede afirmarse que la recombinación genética ha desempeñado una función importante en el proceso evolutivo de los seres vivos?

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Mutaciones

Los seres vivos se desarrollan en dependencia del medio y si bien de este obtienen todo lo necesario, también pueden experimentar daños, debido a la presencia en su ambiente de agentes físicos y químicos, capaces de interactuar con las biomoléculas y provocar alteraciones en estas. Dicha situación también se puede originar como resultado de interacciones entre las propias sustancias componentes de los seres vivos en condiciones especiales.

La actividad del hombre, en ocasiones, puede modificar de forma negativa las características del medio, ya sea de manera accidental o deliberada, con el propósito de hacer daño. La contaminación ambiental es, sin dudas, uno de los grandes problemas actuales, que requiere del concurso internacional para su solución definitiva.

En este capítulo se estudiarán aquellos agentes que pueden alterar el material genético y, por tanto, provocar la aparición de variaciones fenotípicas en los individuos y en su descendencia.

Después de aclarar los conceptos fundamentales y la terminología que se debe emplear, se estudiarán los mecanismos que originan las mutaciones, sus consecuencias positivas y negativas, analizadas desde diferentes puntos de vista, para terminar con el análisis de algunas situaciones relacionadas con la práctica médica.

Definiciones y nomenclatura

En este tema se emplea un conjunto de términos que deben ser definidos antes de comenzar el estudio de los contenidos.

Concepto de mutación

Se denomina mutación a toda alteración permanente que se produce en el material genético, esto es el ADN, y que se trasmite a los descendientes durante el ciclo replicativo. No todas las alteraciones son trasmitidas a los descendientes, gracias a un sistema de mantenimiento y reparación del ADN, por esta razón, desde el punto de vista bioquímico una mutación es el resultado de un daño al ADN que no ha sido reparado. El organismo que se origina como consecuencia de una mutación y que difiere del organismo original se denomina mutante. El agente capaz de provocar la aparición de una mutación se

denomina agente mutagénico o mutágeno, el cual puede ser de naturaleza física o química y puede originarse en el interior o exterior del organismo. Por último, el mecanismo por el cual un mutágeno origina la mutación se denomina mutagénesis.

Si la *E. coli* que existe en la naturaleza es capaz de formar leucina a partir de una fuente carbonada y una nitrogenada, el organismo se nombrará leu^+ y se considera que es el tipo silvestre. Si por la acción de un mutágeno se obtiene un mutante que no es capaz de crecer en un medio carente de leucina (ha perdido la capacidad de sintetizar ese aminoácido), entonces se nombra leu^-. En este sistema de nomenclatura el tipo (+) es siempre el tipo silvestre, aunque no sea el que existe en la naturaleza, y el tipo (-) es el mutante. Para referirse al genotipo se utilizarán letras minúsculas y para el fenotipo, las mayúsculas.

En los organismos diploides se mantiene la notación, pero identificando el genotipo del organismo. Si se quiere hacer referencia a situaciones relacionadas con el gen CDK2, existen tres posibilidades: si los dos genes son de tipo silvestre, cdk2+/+; uno silvestre y otro mutado, cdk2+/- o los dos mutados cdk2-/-. En ocasiones se hace referencia al tipo de mutación, por lo general se define el cambio originado en la proteína, por ejemplo, el gen que codifica el transportador de cloruros, conocido como CFTR, presenta frecuentemente una mutación en la cual está ausente la fenilalanina, que ocupa la posición 508, entonces se escribe $CFTR^{\Delta 508}$ o también CFTRΔ508. El gen de la cadena β de la hemoglobina se designa HBB y por eso la mutación que origina la drepanocitosis se puede escribir HBBE6→V y también $HBB^{E6 \rightarrow V}$.

Tipos de mutaciones

Las mutaciones se pueden clasificar en función de numerosos criterios, de los cuales los más utilizados son los que se definen a continuación. De acuerdo con su origen las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas. Algunas se producen como consecuencia del funcionamiento normal de la célula, estas reciben el calificativo de espontáneas y ocurren en una proporción que es característica para cada gen en un organismo determinado. Las mutaciones que se originan como consecuencia de la acción del hombre sobre determinados organismos reciben la denominación de inducidas. La efectividad de un mutágeno debe medirse por su capacidad para incrementar la proporción de las mutaciones en un organismo determinado.

Las mutaciones pueden ser génicas o cromosómicas de acuerdo con el segmento del ADN que ha sido afectado. Teniendo en consideración el grado de afección que el mutágeno origina en el material genético, las mutaciones se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellas que se pueden visibilizar con el microscopio por afectar un sector grande del ADN, que reciben el nombre de mutaciones cromosómicas (también denominadas aberraciones estructurales), y las que afectan solo una o muy pocas bases nitrogenadas, por lo que tienen un nivel molecular o submicroscópico y se denominan mutaciones génicas.

Las aberraciones cromosómicas estructurales más importantes son: la deleción, cuando falta una porción del cromosoma; la inserción, cuando aparece un segmento adicional, y la translocación, cuando un segmento de un cromosoma aparece en otro. Para su estudio detallado debe consultarse un texto de citogenética.

Mutaciones génicas. Las mutaciones génicas se producen fundamentalmente por alteraciones en la secuencia de bases del ADN. Estas alteraciones pueden ser consecuencia del cambio de una base por otra, entonces se les denomina puntuales. Los cambios de más de una base son fenómenos que aunque probables, resultan muy poco frecuentes. Otros tipos se producen por la adición (inserción) o sustracción (deleción) de una o más bases (Fig. 32.1).

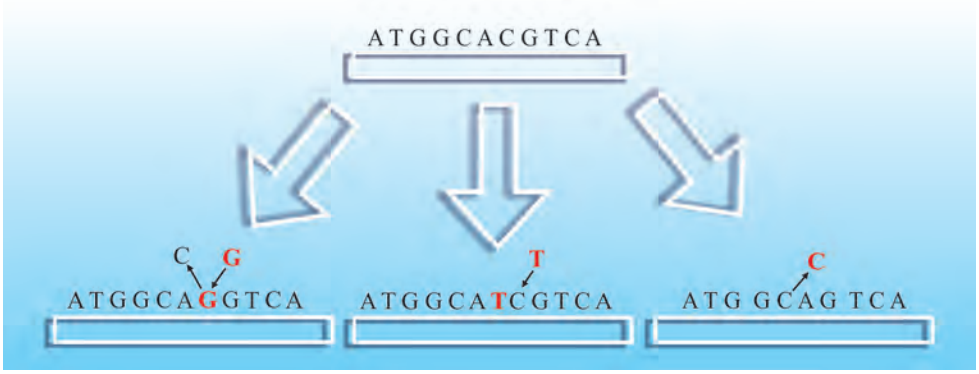


Fig. 32.1. Principales mutaciones génicas. Se producen por el cambio de una base por otra (izquierda), la inserción de una base (centro) o la deleción de una base (derecha). Como puede inferirse, las consecuencias de cada tipo deben ser diferentes.

Para los cambios de una base por otra existen términos especiales, así, se denomina transición el cambio de una purina por otra o una pirimidina por otra, en tanto recibe el nombre de transversión el cambio de una purina por una pirimidina, o viceversa.

Las mutaciones pueden ocurrir en las secuencias de bases que codifican aminoácidos de la cadena polipeptídica o radicar en secuencias reguladoras (promotores, etc.). Las que afectan las secuencias codificantes pueden estar localizadas en diferentes partes del gen y alterar el codón de iniciación, los intermedios o los de terminación, lo cual indica que las consecuencias de las mutaciones pueden ser muy diversas.

Cuando una mutación se produce en la zona de codificación del gen, puede no alterar la secuencia de aminoácidos en una proteína y se denomina silente. Existen casos en los que la mutación provoca el cambio de un aminoácido por otro similar, que no altera la función de la proteína y entonces se denomina mutación neutra.

Un tipo especial son las mutaciones dinámicas. En este caso se trata de tríos de bases (tripletes), cuyo número se va incrementando de generación en generación. El mecanismo de producción de estas mutaciones se desconoce.

Ejemplos de este tipo de mutaciones se encuentran en el origen de la enfermedad de Huntington (CAG/CTG), el síndrome frágil X (CGG/CCG) y la ataxia de Friedrich (GAA/TTC). El número de repeticiones se incrementa durante la maduración de las células germinales, de manera que va creciendo a medida que un individuo se reproduce.

En el caso del síndrome frágil X se ha podido demostrar que hasta 50 repeticiones el fenotipo es normal. De 50 a 200 se encuentra en estado de premutación, con manifestaciones moderadas; y más de 200 es la mutación completa, con manifestaciones más graves como el retraso mental.

Estas enfermedades se caracterizan por el fenómeno de anticipación, que consiste en que en cada generación los síntomas se presentan en edades más tempranas. Esto se puede explicar de la manera siguiente: un individuo con 50 repeticiones pasa a su hijo ese mismo número de tripletes, pero en las células germinales del hijo ese número aumenta, por ejemplo, a 150. Ahora el nieto hereda 150 (premutación), pero en sus células germinales el número crece a 200 (mutación completa), por lo tanto en cada uno de ellos las manifestaciones clínicas se presentarán cada vez en edades más tempranas, pues van heredando un número mayor de tripletes.

Mutagénesis

Son numerosos los agentes que pueden dañar el ADN y de no repararse la lesión, actuar como mutágenos, pero pueden reunirse de acuerdo con el mecanismo por el cual producen las mutaciones en los grupos que se describen a continuación.

Mutágenos análogos de bases

En la naturaleza existen numerosas bases nitrogenadas, pero solo cuatro de estas forman parte del ADN. Esas bases pueden ingresar al organismo mediante la alimentación o emplearse como reactivos experimentales. Como tienen un parecido estructural con las bases del ADN, se denominan análogos de bases, por lo tanto, un análogo de base es una sustancia que no es ninguna de las bases habituales del ADN y puede ser incorporada a este durante la replicación por formar pares de bases con alguna de las bases normales. Pero que por tautomerización (capítulo 8) puede cambiar su patrón de apareamiento en el siguiente ciclo replicativo y originar un cambio de bases en el ADN.

Un ejemplo de este tipo es el bromouracilo que es un análogo de la timina y por ello se aparea con la adenina en su forma ceto, pero al cambiar a su forma enol forma par con la guanina (Fig. 32.2) y en el siguiente ciclo replicativo aparecerá un par GC donde antes existía uno AT.

Para que esto suceda, se requieren dos ciclos replicativos, como se muestra en la figura 32.3.

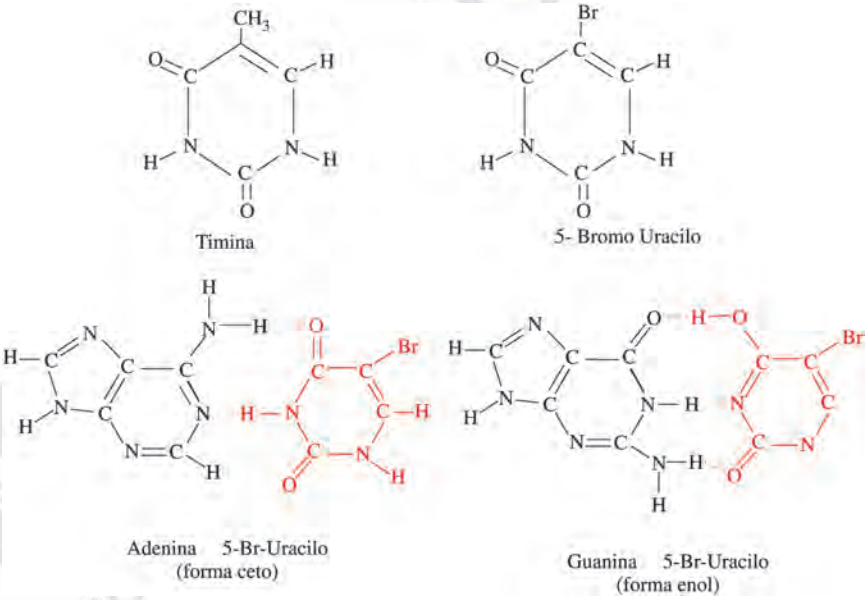


Fig. 32.2. Análogos de bases. La parte superior de la figura muestra la estructura de la timina y del 5-bromouracilo, donde se advierte su similitud estructural. En la parte inferior se muestra cómo en la forma ceto, el 5-bromouracilo forma pares de bases con la adenina y actúa como un análogo de la timina, pero en su forma enol se aparea con la guanina y sustituye la citosina.

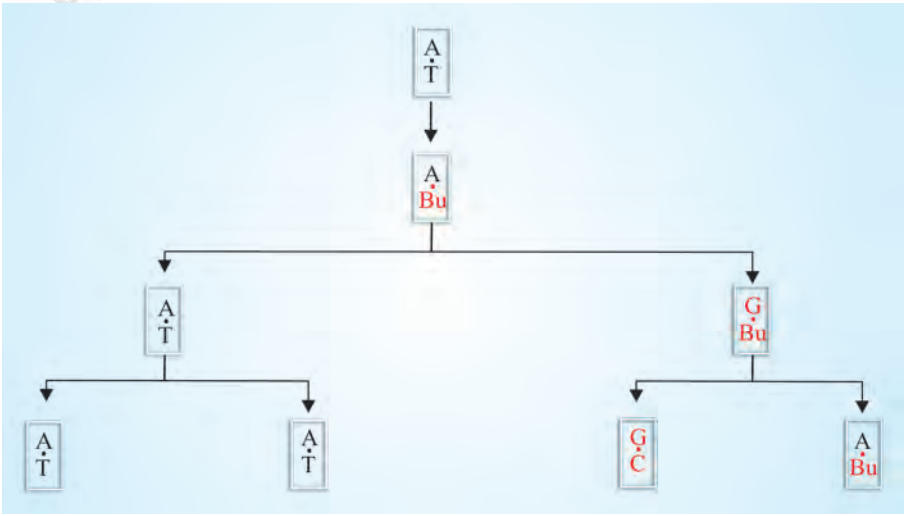


Fig. 32.3. Mutaciones por análogos de bases. Cuando durante un ciclo replicativo se incorpora el 5-bromouracilo, en su forma ceto, formará pares de bases con la adenina, pero en el ciclo siguiente cambia a su forma enol y se aparea con la guanina, originando en el próximo ciclo la aparición de un par G:C donde existía originalmente un par A:T.

Otro ejemplo es la 2-aminopurina que sustituye la adenina; no tautomeriza, pero puede aparearse con la timina y la citosina; aunque el apareamiento con la citosina es muy débil, es suficientemente fuerte para provocar en el siguiente ciclo replicativo la transición AT > GC.

Mutágenos químicos

Un mutágeno químico es una sustancia que reacciona con alguna de las bases del ADN y la modifica de forma que cambia su patrón de apareamiento. Los más poderosos son el ácido nitroso (HNO_2), la hidroxilamina, el sulfonato de etilmetano y la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Fig. 32.4).

El ácido nitroso transforma los grupos aminos en cetónicos y, por tanto, transforma la citosina en uracilo, la adenina en hipoxantina y la guanina en xantina (Fig. 32.5), que forman los pares UA, HC y XC; esto provoca los cambios GC en AT y AT en GC cuando la citosina y la adenina son desaminadas. La desaminación de la guanina en xantina no provoca mutaciones, ya que GC da XC. Por un proceso muy complejo la hidroxilamina reacciona con la citosina y la modifica, de manera que forma pares con la adenina, por lo que ocurre un cambio de GC en AT.

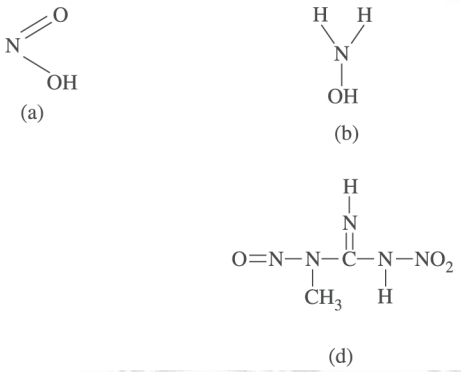


Fig. 32.4. Principales mutágenos químicos. Se muestran las estructuras de los mutágenos químicos más utilizados: el ácido nitroso (a), la hidroxilamina (b), el sulfonato de etil-metano (c) y la N-nitroN'metil N-nitroso--guanidina (d).

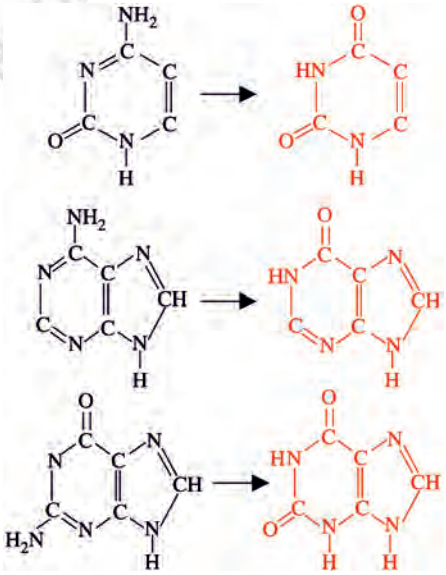


Fig. 32.5. Efecto de agentes desaminantes. Los agentes desaminantes, como el ácido nitroso, actúan sobre las bases nitrogenadas y al desaminarlas convierten la citosina en uracilo (arriba), la adenina en hipoxantina (centro) y la guanina en xantina (abajo). En algunos casos estos cambios pueden afectar el patrón de apareamiento.

El sulfonato de etilmetano (o de etiletano) es un agente alquilantes provoca la adición de grupos alquilos (metilo, etilo, etc.) a las bases nitrogenadas del ADN y puede reaccionar con la guanina y en menor grado con la adenina. La adición de un grupo alquilo en el N-7 de la purina produce dos efectos: el apareamiento de G con T y la labilización del enlace N-glicosídico del nucleótido que se hidroliza rápida y espontáneamente, creando un sitio apurínico (ver capítulo 33), que si no es reparado, en el siguiente ciclo replicativo puede dar origen a la aparición de cualquiera de las bases en la cadena complementaria.

El N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina es un poderoso mutágeno que actúa por alquilación. En una población bacteriana produce cerca de 1 % de mutantes, muchos de estos múltiples. Las mutaciones se producen en grupos, muy cerca unas de otras. Se supone que su acción se realiza en la horquilla de replicación.

Otro grupo importante de mutágenos son las especies reactivas del oxígeno que constituyen un grupo de radicales libres que se forma a partir del oxígeno en diferentes reacciones redox. Los radicales libres son especies químicas que presentan uno o dos electrones sin aparear y por lo tanto son muy reactivos, pues rompen enlaces químicos sustrayendo un electrón que se aparea con el propio, pero dejan a la otra especie química con un electrón desapareado y generan, de esta forma, una reacción en cadena. Tienen una vida media muy corta debido a que reaccionan con la sustancia más cercana. En el organismo existen reacciones que provocan la formación de radicales libres. Si esas reacciones ocurren en el núcleo celular pueden tener al ADN como un blanco de los radicales libres y producir en esa molécula daños considerables. También las radiaciones que provoca la fotolisis del agua son agentes productores de radicales libres y eso explica los efectos de las radiaciones sobre el ADN.

Sustancias intercalantes

Los agentes intercalantes son moléculas planas de tres ciclos que se introducen entre los pares de bases y alteran la replicación y la transcripción. A este grupo pertenecen algunos colorantes como el naranja de acridina, la proflavina y la acroflavina, cuyas dimensiones son aproximadamente iguales a las de un par de bases. Esto le permite intercalarse entre dos pares de bases y al ocurrir la replicación generalmente suceden inserciones de una base (muy pocas veces de dos) y con mucha menor frecuencia deleciones; el mecanismo se desconoce.

Sustancias de esta naturaleza fueron utilizadas por Crick para descifrar el código genético.

Radiaciones

La luz ultravioleta, los rayos gamma, los rayos X y otras radiaciones ionizantes son poderosos agentes mutagénicos. Su mecanismo de acción, así como sus consecuencias, se estudiarán con más detalles en el capítulo 33.

Consecuencias de las mutaciones

Las consecuencias de las mutaciones dependen del tipo de mutación y de su localización. Las mutaciones génicas más frecuentes son las puntuales, las cuales se definen como el cambio de una base por otra. En este caso pueden originarse varias situaciones: en primer lugar suele producirse una mutación silente, ya que debido al carácter degenerado del código genético, estudiado en el capítulo 28, los cambios, sobre todo en la tercera base, pocas veces acarrean cambios en el aminoácido codificado; en segundo lugar puede

originarse una mutación neutra, lo cual significa que, aunque ocurre el cambio de aminoácidos, estos son tan similares que no provocan afecciones del producto génico; por último, puede ocurrir un cambio de aminoácidos que afecte sensiblemente la estructura y por consiguiente la función de la proteína codificada, modificando el fenotipo, y estos son los que suelen reconocerse como mutantes (Fig. 32.6).

Otro tipo importante son aquellas que transforman el codón de iniciación, lo cual puede traer como consecuencia que el ribosoma utilice otro codón AUG más interno y con ello producirse una proteína de menor tamaño, si el AUG empleado está en fase, es decir, si está separado del codón de iniciación original por un número de bases múltiplo de tres, de manera que los codones siguientes al nuevo codón de iniciación codifiquen los mismos aminoácidos que en la proteína original. De no ser así, puede originarse una proteína totalmente diferente a la original.

En otros casos están implicados los codones de terminación que suelen dar lugar a dos situaciones diferentes: que un codón de lectura sea convertido por el mutágeno en un codón de terminación, con lo cual provoca la terminación prematura de la cadena polipeptídica; la otra, ocurre cuando un codón de terminación se convierte en un codón de lectura, lo cual ocasionará el aumento en el número de aminoácidos de la proteína. Esto puede modificar las propiedades de la proteína (solubilidad, asociación con otras proteínas, etc.) o eliminar totalmente su función haciéndola inservible. Estas situaciones se resumen en la figura 32.7.

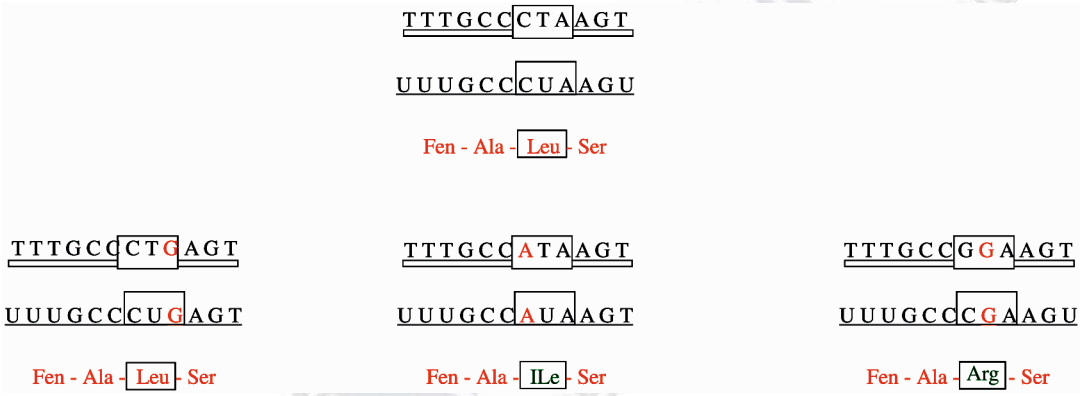


Fig. 32.6. Consecuencia de las mutaciones puntuales. Al producirse el cambio de una base por otra, las consecuencias pueden ser diferentes debido al carácter degenerado del código genético. El cambio de A × G da origen a una mutación silente (derecha), pues se codifica el mismo aminoácido; C × A produce una mutación neutra, ya que cambia la leucina por la isoleucina que son aminoácidos del mismo tipo (centro); por último, el cambio de T × G, sí debe originar un fenotipo mutante, ya que la leucina que es un aminoácido apolar se cambia por arginina (izquierda) que es del tipo polar iónico.

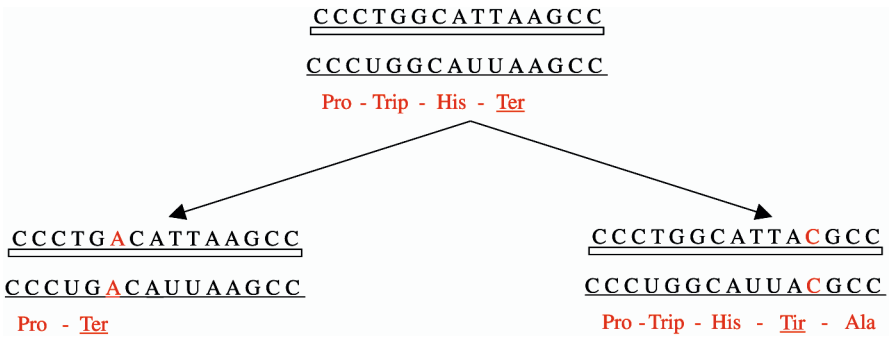


Fig. 32.7. Mutaciones que afectan la terminación. En el primer caso (izquierda), el cambio G x A da origen a la aparición de un codón de terminación y la terminación anticipada de la síntesis de proteínas. En el segundo caso (derecha), el cambio A x C transforma un codón de terminación en uno de tirosina y con ello prolonga la cadena polipeptídica más allá del límite normal.

Estas mutaciones pueden afectar también las zonas reguladoras. Las mutaciones en las zonas reguladoras pueden modificar la cantidad de proteína sintetizada. Se recuerda que, por ejemplo, la fortaleza de un promotor depende, entre otros factores, de la secuencia consenso TATAAT, por lo que una mutación que aleje la secuencia real de la de consenso debilitará al promotor, y la que lo acerque, lo hará más fuerte. Situaciones similares se pueden originar en otras secuencias reguladoras, como se estudiará en el capítulo 39.

Las inserciones y las deleciones provocan un corrimiento del marco de lectura, pues como los codones son leídos uno a continuación del otro, la adición de una base dará lugar a una lectura diferente a partir del punto de inserción. Igual sucede con las deleciones (Fig. 32.8).

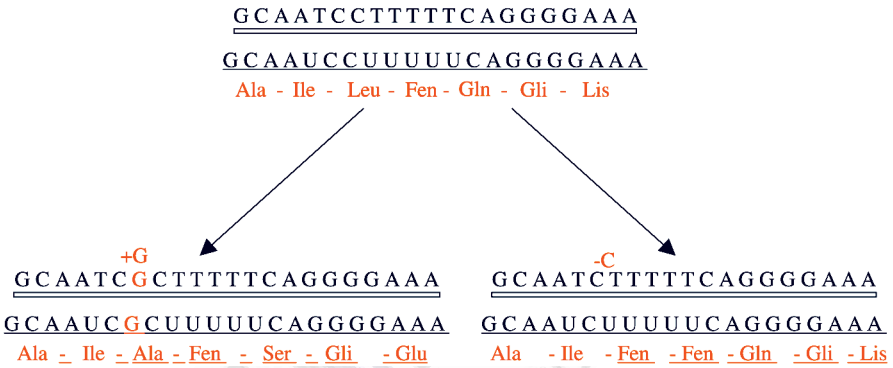


Fig. 32.8. Inserciones y deleciones. La inserción (izquierda) y la deleción (derecha) de una base alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína, a partir del punto donde se produjo la mutación. Se observa que mientras más cercana sea la mutación al inicio del gen, en mayor grado alterará la estructura de la proteína que el gen codifica.

Las consecuencias de inserciones y deleciones son diferentes de acuerdo con el punto donde se producen, así, tienen mayor connotación aquellas que ocurren en los codones iniciales, ya que originan un producto totalmente alterado. Este tipo de mutaciones suele alterar también las secuencias reguladoras, pues en ocasiones dos secuencias típicas deben estar separadas por un número determinado de bases para ser efectivas; el aumento o disminución de este número puede alterar la función reguladora.

Mutaciones mayores

Con una frecuencia muy baja ocurren cambios que afectan secuencias de muchas bases (hasta miles) y que también deben ser consideradas como mutaciones. Las principales son deleciones, duplicaciones y rearreglos. Las deleciones de 100 hasta 1 000 pb ocurren de manera espontánea, pero pueden ser estimuladas por agentes de entrecruzamiento; presumiblemente los largos segmentos entrecruzados se eliminan de alguna forma, quizás con la participación de algún mecanismo de recombinación.



Fig. 32.9. Mutaciones mayores. La duplicación y la inversión de grandes sectores del ADN constituyen fenómenos que no son poco frecuentes y que generalmente implican varios genes. Los mecanismos de producción de estos tipos de mutaciones son desconocidos.

En una duplicación (o triplicación que también puede ocurrir) una secuencia de bases se repite y aparece organizada en tándem (Fig. 32.9). La longitud del segmento duplicado es típicamente tan larga que incluye varios genes. Este mecanismo es poco frecuente en bacterias, pero se observa en anfibios durante el mecanismo de amplificación genética y en células de mamíferos, relacionado con los mecanismos de resistencia a algunas drogas, como se discute en el capítulo 86.

Parece ser que la duplicación de genes ha desempeñado una función importante en el proceso de la evolución; como un gen duplicado puede mutar independientemente del otro, a partir de un gen único suele producirse una familia de genes que tiene un grupo de características comunes, pero posee aspectos específicos que lo

diferencian y, además de una ganancia de material genético, puede dar origen a proteínas con funciones similares, pero con algún grado de diferenciación. El ejemplo más sobresaliente lo constituye el gen de la globina, que al parecer era único en un inicio y por mecanismos de duplicación y después por mutaciones independientes ha dado lugar no solo a las cadenas que componen los diferentes tipos de hemoglobina, sino también a la mioglobina, una proteína muscular relacionada con el almacenamiento de oxígeno en determinadas fibras musculares.

Un rearreglo típico es la inversión, un segmento de ADN que se separa y se reinserta con una orientación invertida (Fig. 32.9). Los rearreglos de este tipo generalmente originan un fenotipo mutante con respecto a los genes involucrados, pero si no son esenciales para el crecimiento a veces no se detectan.

Los mecanismos moleculares de la duplicación y el rearreglo no son conocidos, presumiblemente impliquen errores de replicación, recombinación, o ambos.

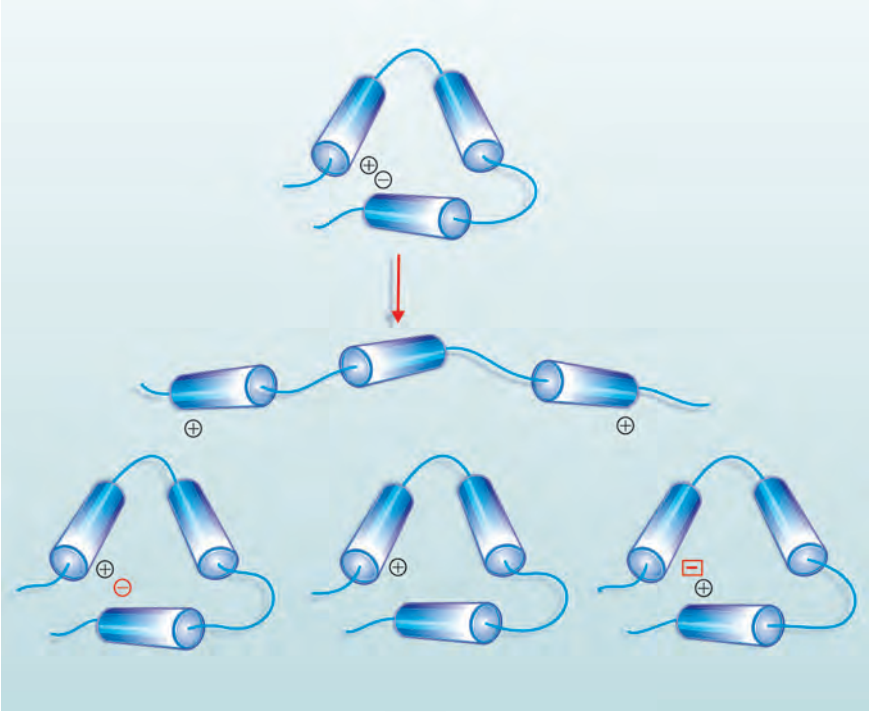


Fig. 32.10. Reversión intragénica. La estructura de la proteína representada en la figura se mantiene exclusivamente por una interacción iónica entre dos aminoácidos específicos. Si una mutación afecta uno de estos, la proteína puede recuperar su conformación inicial por otra mutación que restituya el mismo aminoácido u otro de la misma carga, o un aminoácido que cambie la carga del otro aminoácido que interviene en la interacción.

Supresión

Se denomina supresión el fenómeno mediante el cual un mutante vuelve a adquirir el fenotipo silvestre. Hasta ahora solo se ha estudiado el proceso de obtención de mutantes a partir del tipo silvestre, el fenómeno contrario también existe y se le denomina retromutación o reversión. Una forma de reversión sería que el mutante recuperara el genotipo original, pero eso no siempre ocurre, ya que existen muchas formas de reversión.

Si se colocan 10^4 bacterias Leu^- en un medio carente de leucina no se obtiene crecimiento alguno, pero si se colocan 10^7 bacterias Leu^- se recogen unas pocas colonias Leu^+, esto se debe a que dichas bacterias elaboran su propia leucina y se les denomina revertantes. El hecho de que muestren un fenotipo Leu^+ no significa necesariamente que presenten el genotipo leu^+ original.

La reversión es debida a mutaciones espontáneas y por tanto es un proceso azaroso que no está influido por el medio carente de leucina, pero este permite detectarlas. En el laboratorio es posible estimular la reversión con el empleo de mutágenos.

Análisis matemáticos de las frecuencias de mutaciones espontáneas demuestran que el genotipo original solo se lograría en una por cada $1{,}5 \times 10^{10}$ células, pero experimentalmente se demuestra que el fenotipo original se obtiene en una frecuencia de una por cada 10^8 células. La explicación sería que la mutación ocurre en otro sitio diferente, que permite recuperar el fenotipo original, a este tipo se le denomina mutaciones de segundo punto o supresoras. En ocasiones la segunda mutación ni siquiera ocurre en el mismo gen, por lo que deben distinguirse las supresiones intragénicas de las extragénicas.

El estudio del producto génico ha demostrado que en la mayoría de los casos la sustitución del aminoácido original permanece, pero ha aparecido un segundo cambio que compensa al primero. Se debe considerar el ejemplo hipotético que se muestra en la figura 32.10, de una proteína con 97 aminoácidos cuya estructura está determinada completamente por una atracción iónica entre un aminoácido (+) en la posición 18 y otro (-) en la 64; si ocurre una mutación que cambia al aminoácido 64 por uno (+), la proteína será totalmente inactiva. En este caso se puede lograr la reversión de tres formas principales:

- Una mutación que haga que a la posición 64 regrese el aminoácido original.
- Una mutación que cambie el aminoácido (+) de la posición 64 por otro (-), aunque no sea el original.
- Una mutación que produzca la aparición de un aminoácido (-) en la posición 18.

En todos los casos señalados se recuperaría el fenotipo original, aunque solo en el primero se restituiría el genotipo silvestre.

Otra situación ocurre con las mutaciones que provocan alteraciones del marco de lectura; una inserción puede revertir como consecuencia de una deleción y viceversa, en estos casos mientras más próxima se produzca la segunda mutación, mayor será la probabilidad de obtener el fenotipo silvestre.

Los casos analizados hasta el momento corresponden a supresiones intragénicas, pero también existen las extragénicas. Suponga que una proteína está formada por dos subunidades, cada una de las cuales está codificada en un gen diferente. Si una mutación en uno de los genes afecta el sitio de reconocimiento entre las dos subunidades, no se podrá formar el dímero y la proteína estará inactiva. Si ocurriera una mutación en el otro gen que modifique el sitio de reconocimiento, de manera que pudiera formarse el dímero, se restituiría el tipo silvestre.

Mutaciones en seres humanos

El genoma humano surge como consecuencia de un largo proceso de evolución y no está exento de alteraciones mutacionales. Los métodos actuales de análisis han permitido demostrar la existencia de mutaciones de todo tipo en los seres humanos; en algunos casos estas mutaciones no tienen ninguna significación y se descubren como resultado de estudios masivos en grandes poblaciones, que se realizan en busca de situaciones anormales, por lo que surge el concepto de polimorfismo que se refiere a la existencia de numerosas formas (secuencias) de un mismo gen, tengan o no una repercusión sobre el fenotipo.

La hemoglobina es el caso más sobresaliente, de la cual se conocen alrededor de 400 tipos diferentes, aunque solo unos pocos causan alteraciones morbosas.

Las deleciones también se presentan en los seres humanos y son causas de diferentes enfermedades (Tabla 32.1).

Tabla 32.1. *Algunas enfermedades causadas por deleciones génicas*

Gen	Enfermedad
Factor VIII de la coagulación	Hemofilia A
Factor IX de la coagulación	Hemofilia B
21-hidroxilasa	Hiperplasia adrenal congénita
Fenilalanina hidroxilasa	Fenilcetonuria
Receptor de LDL	Hipercolesterolemia familiar
Colágeno Iα1	Osteogénesis imperfecta severa
Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa	Síndrome Lesh Nyham

Como resumen de las distintas alteraciones que pueden presentar los genes humanos, en la tabla 32.2 se muestran diferentes causas de β-talasemia, una enfermedad que se caracteriza por la síntesis de cantidades insuficientes de β-globina, que es una de las cadenas polipeptídicas que componen la hemoglobina. Se puede apreciar cómo existen mutaciones que afectan los exones y los intrones e incluso a secuencias reguladoras, codones de iniciación y de terminación, etcétera.

Tabla 32.2. *Mecanismos moleculares productores de talasemias*

Mecanismo molecular	Ejemplos
1. Mutaciones puntuales	
a) Transcripción defectiva	
mutaciones del promotor	C a T en -88
	A a G en -29(1)
b) Defectos de maduración del ARNm	
corte anormal	G a A intrón 1 posición 1
	G a A intrón 2 posición 1
	G a C intrón 1 posición 5 (2)
– Nuevo sitio de corte	GAG a AAG en codón 26 (5)
– Intrón dentro del gen	G a A en 110 intrón 1 (3)
	G a T en 654 intrón 2 (4)
– Sitio de poliadenilación	AATAAA a AACAAA (4
c) Traducción defectiva	
terminación prematura	Codón 17 A a T = lis a ter
	Codón 39 C a T = glN a ter (3)
2. Deleciones	
a) Transcripción defectiva	Parcial de 619 pb (6)
b) Defectos de maduración	25 pb extremo 3' de intrón 1
c) Traducción defectiva	2 bases en el codón 8
	4 bases en codones 41/42
3. Inserción	
corrimiento del marco de lectura	1 base en 8/9
	1 base en 71/72 (4)
(1) En negros americanos	(2) En indios asiáticos
(3) En mediterráneos	(4) En chinos
(5) Corresponde a Hb E	(6) La Hb Lepore

ECIMED PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Resumen

Las mutaciones son alteraciones que se producen en el material genético y se trasmiten a los descendientes. Los agentes mutagénicos o mutágenos son aquellos capaces de producir mutaciones, que pueden ser de naturaleza física o química. Los principales tipos de mutaciones génicas son las puntuales, por sustitución de una base; las inserciones, por la adición de una base, y las deleciones, por la sustracción de una base.

Las mutaciones pueden ser espontáneas, si ocurren como consecuencia de la actividad normal del organismo, o inducidas cuando interviene la mano del hombre, con intenciones experimentales, accidentalmente, o por una actitud criminal.

Las mutaciones pueden provocarse con la utilización de análogos de bases como el bromouracilo y la 2-aminopurina; mutágenos químicos como el ácido nitroso, la hidroxilamina, la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina y el sulfonato de etilmetano, los cuales modifican las bases nitrogenadas y cambian su patrón de apareamiento. También son mutagénicas las radiaciones ultravioleta, las ionizantes y las sustancias intercalantes como el naranja de acridina, la proflavina y la acroflavina.

Los efectos causados por las mutaciones pueden ser diferentes según el tipo de mutación (puntual, inserción y deleción) y el sitio donde se producen (secuencias codificantes o reguladoras).

Otros tipos de mutaciones afectan grandes sectores del ADN como las grandes deleciones, las duplicaciones y los rearreglos, cuyos mecanismos son desconocidos.

La supresión es el mecanismo por el cual a partir de un mutante se logra obtener el fenotipo silvestre y esta se debe a la ocurrencia de una segunda mutación en el mismo gen (intragénica), o en un gen diferente (extragénica).

Existen numerosos ejemplos de mutaciones en seres humanos, muchas de las cuales son causas de enfermedades, el ejemplo más destacado, como sucede en otros aspectos ya estudiados es el gen de la globina, que codifica la porción proteínica de la hemoglobina.

Ejercicios

1. Explique qué tipo de mutación (transición o transversión) se produce si un cultivo celular es tratado con:
   a) Bromouracilo.
   b) 2-aminopurina.
   c) Ácido nitroso.
   d) Hidroxilamina.
   e) Sulfonato de etilmetano.
   f) N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.
2. ¿Qué tipo de mutaciones se originan con el empleo de las sustancias intercalantes?
3. A continuación se muestra la secuencia de la hebra codificante de un segmento de ADN que usted debe tomar como referencia para responder las preguntas siguientes:

   T G T C T C T C G A G C G A G C T C C C G T C T A G T G A A G A 3'

   a) Escriba la secuencia del péptido que se codifica.
   b) Cómo se modifica esa estructura si:
      – Cambia A × T en la posición 12.
      – Cambia T × C en la posición 15.

- Cambia T × A en la posición 8.
- Inserta un G entre 16 y 17.
- Deleción de la C de la posición 21.
- Cambia T × A en la posición 2.
- Cambia G × A en la posición 27.
- Cambia A × G en la posición 30.

4. ¿Cómo se pudiera suprimir una mutación por otra dentro del mismo gen?
5. ¿Cómo se puede suprimir una mutación por otra que ocurra en un gen diferente?
6. Si dos células bacterianas tienen el mismo fenotipo, ¿necesitan tener el mismo genotipo?

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Conservación de la información genética

No existe ninguna otra biomolécula cuya integridad tenga para la célula el significado vital que tiene el ADN. Todas las características estructurales y funcionales de la célula están codificadas en estas grandes y complejas moléculas. La posibilidad de expresar esas características, como la de poder trasmitirla a sus descendientes, dependen en elevado grado de la integridad estructural de estas moléculas, tanto de su estructura primaria como de su arquitectura tridimensional. El ADN no es dispensable ni reciclable, por tanto las alteraciones que se produzcan en él deben ser eliminadas para que la célula pueda continuar normalmente su vida. Las otras biomacromoléculas, proteínas, ARN y polisacáridos experimentan un recambio permanente como resultado de los procesos de síntesis y degradación. Esto no sucede con el ADN.

No obstante, las posibilidades que tiene esta molécula de sufrir alteraciones es bastante elevada, ya sea durante su funcionamiento como molde para la replicación y la transcripción, como por su susceptibilidad a la acción de agentes físicos y químicos provenientes del exterior o del interior de la célula.

No es de extrañar que durante los millones de años que han transcurrido de la evolución, todos los organismos, desde los unicelulares hasta los pluricelulares, hayan desarrollado mecanismos que le permitan conservar dentro de algunos límites la más elevada fidelidad de la información contenida en el ADN.

En la sección de biomoléculas quedó demostrado que la estructura del ADN, con sus elevadas estabilidades quimicofísica y metabólica constituye un primer nivel de seguridad en la conservación; su asociación con proteínas en organizaciones de cada vez mayor complejidad, aumentan el grado de seguridad que se incrementa aún más en los eucariontes, donde el ADN está confinado al núcleo y separado del resto de la célula por una envoltura de doble membrana.

Aún así, el ADN no constituye una molécula invulnerable a la acción de agentes que originan en él cambios que pueden traducirse en daños a su estructura y, por ende, en alteraciones de sus funciones.

En este capítulo se examinarán los principales daños que puede experimentar el ADN celular, así como los diferentes sistemas que tienden a conservar la información original, tanto durante la actividad normal de la célula como en respuesta a algún agente agresor, por último, se estudiará cómo algunas alteraciones en los sistemas de conservación pueden originar alteraciones morbosas en los seres humanos.

Modificación-restricción

Uno de los mecanismos más generalizados para mantener la integridad del material genético es el de modificación-restricción. Las células pueden captar ADN del entorno y este puede incorporarse al propio y modificar su contenido informativo, sin embargo, este proceso tiene sus limitaciones. Las células o bacterias son capaces de distinguir entre el ADN propio y el extraño. Esto viene dado porque cada especie posee un grupo de enzimas que metilan el ADN en posiciones específicas, principalmente en adenina y citosina, y crean un patrón de metilación que indica el origen del ADN, este proceso se conoce como modificación. De manera simultánea existe un conjunto de endonucleasas que si al interactuar con el ADN en los mismos sitios no encuentran el patrón de metilación característico de su especie, entonces lo hidrolizan. Este fenómeno se denomina restricción. Su nombre deriva de experimentos con virus (fagos) que infectan a *E. coli*. Se pudo observar que la infección en ocasiones se limitaba a una de las cepas de la bacteria, esto es, el virus estaba restringido a una sola cepa bacteriana. Un esquema de los sistemas de modificación-restricción se muestra en la figura 33.1. En su conjunto el sistema de modificación-restricción protege la célula contra la contaminación de moléculas extrañas de ADN.

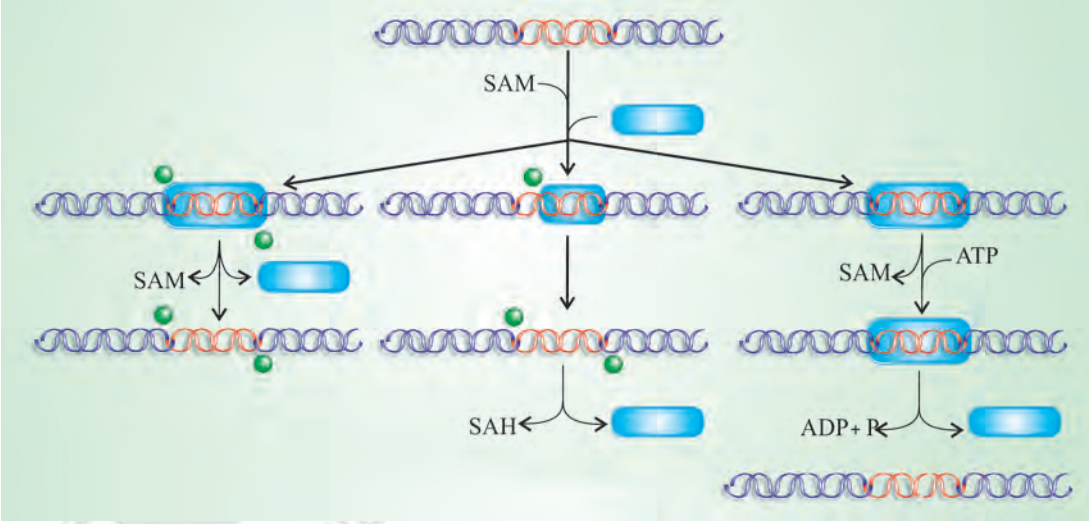


Fig. 33.1. Sistema general de modificación-restricción. La enzima de modificación-restricción unida previamente con la S-adenosilmetionina (SAM) se une al ADN, y su acción dependerá del grado de metilación de este. Si el ADN está totalmente metilado la enzima se disocia. Si está hemimetilado, entonces transfiere el grupo metilo del SAM y completa la metilación. Si el ADN no está metilado, entra a funcionar la actividad restrictiva que produce la hidrólisis del enlace fosfodiéster en las dos hebras. La S-adenosilhomocisteína (SAH), producida cuando el SAM cede su grupo metilo al ADN, tiene que convertirse nuevamente en SAM por acción de transmetilasas específicas.

En la tabla 33.1 se relacionan algunas de las enzimas de restricción mejor caracterizadas y sus sitios de acción. Como cada especie presenta su propio patrón de metilación, cualquier molécula de ADN de origen extraño que logre incorporarse a la bacteria, será reconocida como ajena y resultará hidrolizada por las endonucleasas.

Los sistemas de modificación-restricción se clasifican en tres grupos, cuyas características principales se muestran en la tabla 33.2.

Una enzima de modificación-restricción de tipo I consta de tres tipos de subunidades: la R, con actividad de restricción; la M, de metilación y la S, que realiza la función de reconocimiento del sitio específico. Una vez que la enzima se ha unido al ADN se produce la modificación o la restricción; la actividad de las subunidades M y R es mutuamente excluyente, por ejemplo, la EcoK con un peso de 400 kD, formada por 2R (135 kD), 2M (62 kD) y una S (55 kD).

Tabla 33.1. *Enzimas de restricción y sus sitios específicos de acción*

Enzima	Microorganismo	Sitio específico
Generan fragmentos monofibrilares		
EcoR1	*E. coli*	G*AATTC
BamH1	*B. amiloliquefaciens H*	G*GATCC
Bgl1	*B. globigli*	A*GATCT
HindIII	*H. influenzae*	A*AGCTT
SalI	*S. albus G*	G*TCGAC
TaqI	*T. aquaticus*	T*CGA
No generan fragmentos monofibrilares		
BalI	*B. albidum*	TGG*CCA
HaeI	*H. aegyptus*	GG*CC
SmaI	*S. marcescens*	CCC*GGG

* Indica el punto del corte.

Tabla 33.2. *Características de los diferentes tipos de enzimas de restricción*

Característica	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Actividad modificación-restricción	Multifuncional simple	Separadas	Multifuncional simple
Estructura proteínica	3 subunidades diferentes	Simple	2 subunidades diferentes
Requerimientos para la restricción	ATP, SAM, Mg^{2+}	Mg^{2+}	ATP, Mg^{2+} (SAM)
Requerimientos para la metilación	SAM (ATP, Mg^{2+})	SAM	SAM (ATP, Mg^{2+})
Secuencia específica	T-G-A-N_8-T-G-C-T	Palindrómica	A-G-A-C-C
Sitio de hidrólisis	1 000 pb del sitio de unión	En el sitio de unión	26 pb del sitio de unión
Restricción y metilación	Mutuamente excluyentes	Separadas	Simultáneas
Sitio de metilación	Específico	Específico	Específico

El grupo metilo es aportado por la S-adenosilmetionina (SAM) que se transforma en S-adenosilhomocisteína (SAH). La unión de la SAM a la subunidad M es necesaria para la unión de esta al ADN. En un primer momento la SAM actúa como un efector alostérico y promueve una transconformación de la subunidad M, que se trasmite a la S y permite la interacción con el ADN. Una vez unido al ADN se incorpora el ATP a la subunidad R. Si el sitio está metilado se produce la separación de la enzima; si no lo está, la SAM abandona el complejo y ocurre la hidrólisis por acción de la subunidad R, para lo cual es necesaria la hidrólisis del ATP. El sitio de unión está separado por unos 1 000 pb del sitio de hidrólisis.

Las enzimas del tipo II suelen presentar estructuras más sencillas, pues solo intervienen en la restricción, y la actividad de metilación la realizan otras enzimas. El mejor caracterizado es el sistema EcoR1, cuya enzima de restricción es un dímero de subunidades idénticas y su metilasa es un monómero. El sitio de unión es una secuencia de 4 a 6 pb, generalmente de tipo palindrómica. Un palíndromo es una frase que puede leerse en ambos sentidos, por ejemplo:

Anita lava la tina
Dábale arroz a la zorra el abad

Esta simetría indica que las bases son metiladas en las dos hebras del ADN; el sitio puede aparecer totalmente metilado (las dos hebras), hemimetilado (una sola hebra) y no metilado. En el último caso lo más probable es que se produzca la restricción (Fig. 33.1).

La metilasa añade un solo grupo metilo de una vez, por lo que al encontrar una zona desmetilada transfiere un grupo metilo hacia la base correspondiente y abandona al ADN para unirse de nuevo y transferir otro grupo metilo hacia la otra hebra. Debido al carácter semiconservativo de la replicación lo más frecuente es que la enzima actúe sobre ADN hemimetilado; existen dos subtipos de estas enzimas: las que hidrolizan el ADN en el mismo sitio de reconocimiento y las que lo hacen unas pocas bases hacia afuera.

Esta característica hace que dichas enzimas sean las preferidas para los experimentos, pues siempre se sabe dónde se ha producido el corte y cuáles son los nucleótidos que están a su alrededor. Por ejemplo, la EcoR1 reconoce la secuencia GAATTC y corta entre la G y la A, por lo tanto en los extremos aparece un segmento monofibrilar de ADN con la secuencia AATTC. Si una molécula grande de ADN es tratada con esta enzima, todos los fragmentos terminarán con esa secuencia de bases.

Las enzimas del tipo III constan de dos subunidades, una R y otra SM, con un tamaño de 106 a 110 kD para la R y de 73 a 80 kD para la SM, y para la unión al ADN se requiere de ATP. Una vez unida, las dos actividades compiten entre sí: la metilación en el sitio de unión y la restricción de 24 a 26 pb a uno de los lados.

Esta actividad de las enzimas se realiza de manera constante, lo que constituye un sistema de control de la integridad del ADN celular, pero cuando sucede un daño sobre el ADN, se ponen en acción otros mecanismos enzimáticos que reciben el nombre genérico de sistemas de reparación. Se presentarán brevemente los principales tipos de daño que pueden ocurrirle al ADN y los mecanismos que permiten la reparación de estos. En 1978, Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton O. Smith recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por el descubrimiento de las enzimas de restricción y su aplicación a problemas de la Genética Molecular.

Causas y consecuencias de los daños al ADN

Se considerará como daños al ADN cualquier alteración que se produzca en la secuencia de bases nitrogenadas y que por lo tanto modifique el contenido informativo de esta molécula. Existen cuatro mecanismos fundamentales que pueden provocar alteraciones estructurales en el ADN:

- Errores cometidos durante el proceso de replicación.
- Inestabilidad química intrínseca de alguna de las bases.
- Inestabilidad intrínseca del enlace N-glicosídico.
- Alteraciones resultantes de la acción de agentes físicos o químicos provenientes del ambiente.

Errores en la replicación. Las ADN polimerasas pueden cometer errores durante la replicación que provocan daños al ADN. Como se estudió en el capítulo 26, las ADN polimerasas poseen una elevada especificidad para copiar la hebra molde; en ocasiones se cometen errores y se incorpora una base que no es la que debía ser incorporada, por ejemplo, frente a una adenina se incorpora una citosina o una guanina. Los errores en la replicación producen bases mal apareadas.

Otro error en la replicación es debido a un fenómeno que se denomina deslizamiento de la polimerasa. Este puede traer dos consecuencias: la polimerasa se puede deslizar hacia atrás y copiar dos veces la misma base con la cual se produce una inserción; también se puede deslizar hacia delante y dejar de copiar una base, lo que provoca una deleción. A veces se copia (o deja de copiar) más de una base y se forman los lazos de inserción deleción (LID). Tanto los errores de incorporación incorrecta como los debidos al deslizamiento de la polimerasa son rectificados por las proteínas de la familia Mut. Este mecanismo ya fue estudiado en el capítulo 26.

Inestabilidad química de las bases. Algunas bases se pueden alterar espontáneamente y dañar la información del ADN. El ejemplo más notorio de este mecanismo es la desaminación de la citosina. Cuando la citosina se desamina de manera espontánea, da origen al uracilo. Como el uracilo normalmente se aparea con la adenina, en el próximo ciclo replicativo aparecerá una AU, que más tarde se hará AT, donde antes existía un par CG. También se origina la desaminación espontánea de la adenina que produce hipoxantina, con un patrón de apareamiento diferente a la adenina.

Inestabilidad del enlace N-glicosídico. El enlace N-glicosídico en los nucleótidos purínicos se rompe de manera espontánea y crea un sitio sin bases. El enlace N-glicosídico tiene un determinado grado de inestabilidad intrínseca y tiende a romperse espontáneamente. Este efecto es más significativo en los nucleótidos purínicos. Al romperse el enlace se forma un sitio que carece de base nitrogenada (sitio abásico). Al suceder la replicación, las ADN polimerasas colocan como complemento del sitio abásico cualquiera de los nucleótidos, con lo cual la probabilidad de cometer un error es de 0,75 (de cuatro bases disponibles, solo una es la correcta).

Acción de agentes ambientales. En el ambiente del ADN existen agentes físicos y químicos capaces de producir daños en la molécula. El término *ambiente del ADN* se refiere tanto a las condiciones existentes en los sitios muy cercanos a la molécula, como a las condiciones alejadas. Lo anterior se puede ejemplificar de la manera siguiente: el núcleo celular constituye el ambiente cercano y el medio en el cual se desenvuelve el organismo es el ambiente lejano. Los daños pueden provenir de agentes situados tanto en el ambiente cercano como en el lejano. Los agentes químicos siempre provienen del ambiente cercano. Aunque pueden originarse en lugares más distantes, tienen que llegar a las inmediaciones del ADN para provocar una interacción con el mismo que resulte en un daño. Son agentes químicos los análogos de bases, las sustancias intercalantes, los agentes alquilantes y los agentes de entrecruzamiento (ver capítulo 32).

Los agentes químicos mencionados pueden incrementar la inestabilidad de las bases o del enlace N-glicosídico y reflejar los resultados ya estudiados, o suelen ocasionar modificaciones importantes en las bases que cambien su patrón de apareamiento o impidan la replicación y la transcripción. También son agentes químicos las especies reactivas del oxígeno, muchas como radicales libres, que se generan durante reacciones enzimáticas y son poderosos agentes de daño al ADN.

Las radiaciones son los agentes físicos más importantes que producen daño al ADN. Los daños más frecuentes, ocurridos por las radiaciones, son las rupturas de las bases, de la desoxirribosa y del enlace fosfodiéster. También es muy común la formación de entrecruzamientos entre bases de la misma hebra, especialmente con las timinas, que forman los dímeros de timina. El daño producido por las radiaciones está mediado por especies reactivas del oxígeno que se producen por la fotólisis del agua, de ahí que los daños producidos por las radiaciones y las especies reactivas del oxígeno sean similares. Cuando las radiaciones son muy intensas o las especies reactivas del oxígeno, muy abundantes, pueden causar múltiples roturas de las hebras del ADN y si algunas de estas coinciden en las dos hebras ocurre la ruptura total de la molécula que es el daño más grave que sufre el ADN. Un esquema de los daños al ADN se muestra en la figura 33.2.

Las consecuencias de los daños al ADN pueden ser de tres tipos: mutagénicas, citotóxicas y citostáticas. Los daños mutagénicos son aquellos que dan origen a la aparición de mutaciones (ver capítulo 32) y su acumulación conduce a la carcinogénesis. Lo que caracteriza este tipo de mutaciones es que no significan un impedimento para los procesos en los cuales interviene el ADN, como la replicación, la transcripción y la segregación de los cromosomas. Por lo tanto el ADN dañado se puede trasmitir de una generación celular a la siguiente. Los daños citotóxicos a citostáticos son aquellos que

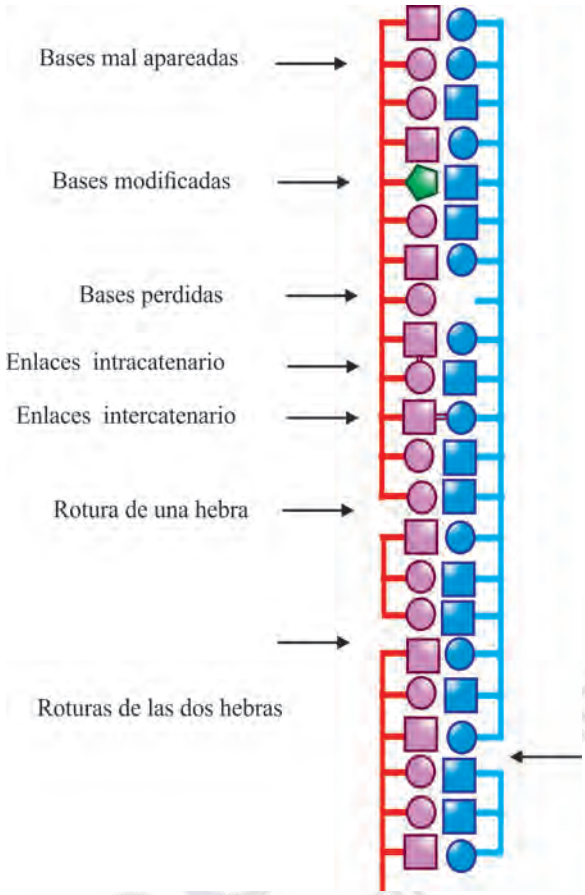


Fig. 33.2. Daños al ADN. Se muestran los daños que puede experimentar el ADN; por errores en la replicación se producen bases mal apareadas. De forma espontánea o por la acción de agentes externos se producen modificaciones de las bases o su pérdida, enlaces cruzados intracatenarios e intercatenarios y rotura de una o las dos hebras. Todos estos se reparan de manera eficiente.

interfieren en esos procesos. La no reparación oportuna de un daño citotóxico implica la activación de los mecanismos de la apoptosis y con ello la muerte celular. Por su parte los daños citostáticos producen una detención permanente del ciclo celular, fenómeno conocido como senescencia.

Todos estos daños alteran la estructura física o informativa del ADN y por tanto provocan algunas de las consecuencias mencionadas. No obstante, todas las células disponen de eficientes mecanismos de reparación de esos daños. Al estudio de esos mecanismos se dedica el resto de ese capítulo.

Sistemas de reparación

Existen numerosos sistemas enzimáticos especializados en la reparación de los distintos tipos de daños al ADN. Una evidencia de la importancia de la integridad del ADN para las células se deriva del hecho de la existencia de numerosos sistemas de reparación. Prácticamente cada uno de los daños mencionados tiene su mecanismo de reparación específico, aunque algunos suelen ser empleados en la reparación de diferentes tipos de daños que tengan un factor común, por ejemplo, la alteración de la estructura duplohelicoidal del ADN. También existe una escala jerárquica en cuanto a la prontitud de la reparación. Así, especialmente en eucariontes, el ADN que forma parte de genes que se transcriben activamente, se repara antes que el resto de ADN no genómico. Pero en el ADN génico la hebra molde en la transcripción es reparada antes que la hebra codificadora. La razón de este proceso se explicará más adelante.

En una primera aproximación los sistemas de reparación se pueden agrupar en dos tipos fundamentales: los que causan la reversión directa del daño (reparación directa) y los que actúan eliminando la zona dañada y resintetizando de nuevo ese sector (reparación indirecta). Los primeros pueden ser dependientes de la luz (fotorreactivación) y los que son independientes de esta (reparación oscura). El segundo tipo (que es siempre independiente de la luz) incluye tres mecanismos fundamentales: reparación por escisión, reparación por recombinación y respuesta al ADN dañado (DDR, del inglés, *DNA damage response*).

Reparación directa

La reparación directa consiste en hacer retornar el ADN al estado existente antes de la lesión. Dos sistemas enzimáticos intervienen en este mecanismo.

Las fotoliasas transforman la energía radiante de la luz en potencial químico para la ruptura de enlaces covalentes. En todas las células, desde las bacterianas hasta las humanas, se ha aislado una enzima que interviene en la reparación de los dímeros de pirimidinas, formados a causa de la irradiación con la luz ultravioleta. Esta enzima cataliza la ruptura de los dímeros de timina (los dímeros de citosina y de citosina-timina se forman en menor proporción y también se reparan por esta enzima) siempre que se produzca una fuerte irradiación con luz visible (300-600 nm), preferiblemente la luz solar. La enzima contiene un cofactor de pteridina que actúa como una antena para la captación de la luz. Al ser iluminada la enzima, la pteridina capta fotones, se activa y transfiere electrones a una molécula de FAD, unida de forma covalente a la enzima. Estos electrones son transferidos al dímero de timina y rompen el enlace covalente, con lo cual el daño se elimina. En la figura 33.3 se muestra un esquema de este proceso.

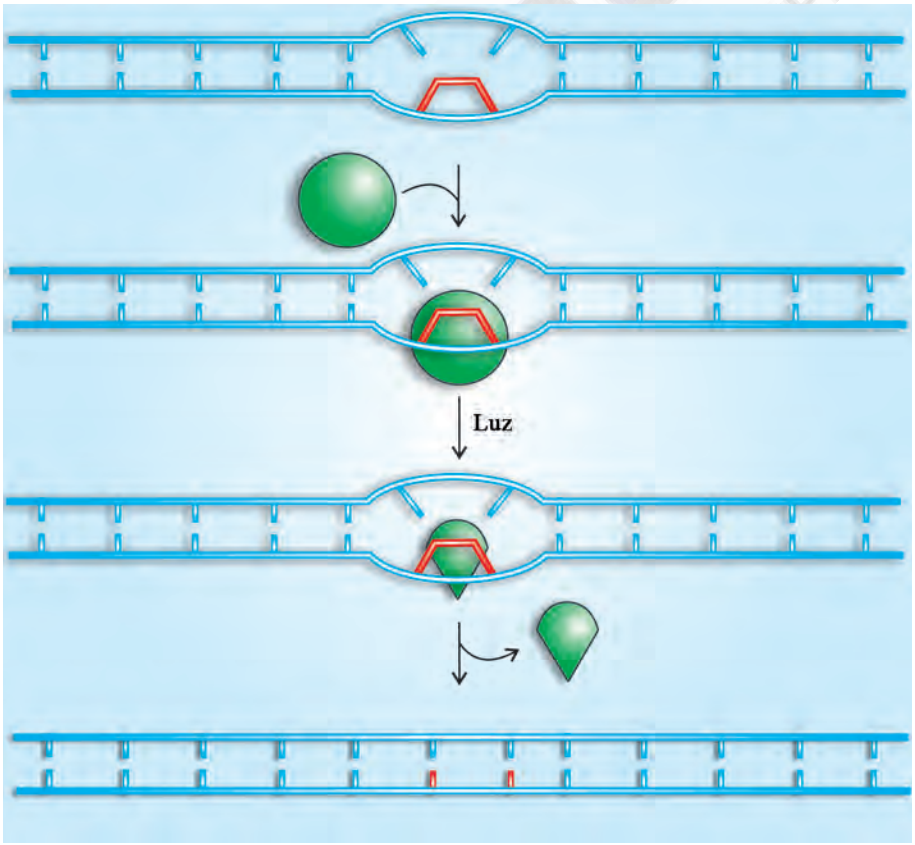


Fig. 33.3. Reparación por fotorreactivación. Cuando la luz ultravioleta provoca la formación de dímeros de timina y se produce la distorsión de la doble hélice, esta interactúa con el producto de los genes uvr. Si la bacteria se expone a la luz, el sistema se activa y repara el daño al eliminar los enlaces que provocaron la formación del dímero.

Las proteínas específicas reparan los daños provocados por los agentes alquilantes. En Química se denominan grupos alquilos a aquellos derivados de los hidrocarburos lineales no saturados, por ejemplo, el metilo derivado del metano y el etilo derivado del etano. Los agentes alquilantes transfieren grupos metilos (y en menor grado grupos etilos) hacia las bases nitrogenadas del ADN. Estas alquilaciones aumentan la inestabilidad del enlace N-glicosídico, que como ya fue estudiado es particularmente importante en los nucleótidos de purinas. Por otra parte, las bases alquiladas pueden tener un patrón de apareamiento diferente a la base original. Existe un grupo de proteínas, las ADN-alquil--transferasas, que transfiere el grupo metilo (o etilo) desde la base nitrogenada del ADN hacia un residuo de cisterna de la proteína, volviendo la base a su estado original. Lo curioso de este sistema es que una vez transferido el grupo alquilo hacia la proteína, esta no puede deshacerse de él y es marcada de alguna manera para su degradación. Esto es lo que algunos autores denominan "reacción suicida". Debido a que la proteína no puede repetir el ciclo de transferencia, no debe ser considerada como una enzima, aunque el nombre asignado nos lleve a pensar de esa manera. Este mecanismo se ilustra en la figura 33.4.

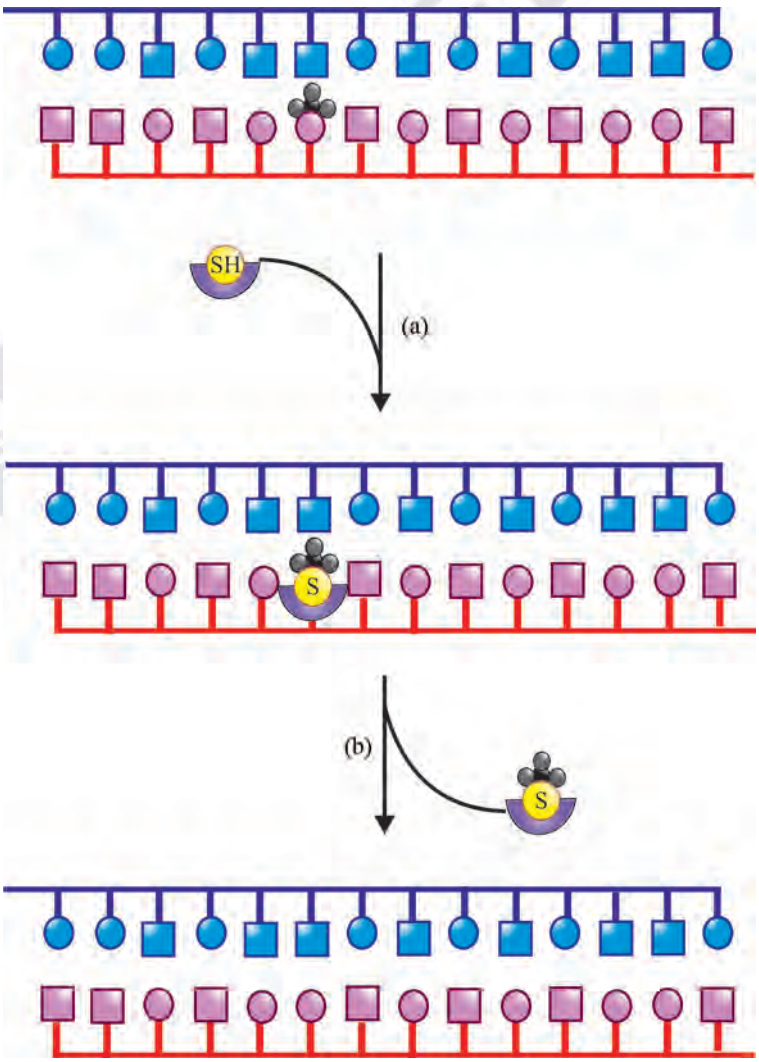


Fig. 33.4. Reparación directa de las alquilaciones. (a) Una proteína con actividad de alquiltransferasa se une al sitio dañado, y (b) el grupo alquilo se transfiere hacia un grupo sulfihidrilo (S) de la proteína que abadona al ADN que de esta forma ha sido reparado.

Reparación indirecta

En la reparación indirecta se elimina la zona que contiene el daño y se sustituye por un segmento de hebra nuevo. A diferencia del anterior este mecanismo comprende varias etapas catalizadas de manera enzimática. Cada tipo de reparación tiene su propio sistema enzimático y de proteínas no enzimáticas que actúan de forma especializada. Asimismo cada uno tiene su propio mecanismo de reparación. Son mecanismos de reparación indirecta la escisión de bases, la escisión de nucleótidos, la reparación por recombinación, la reparación de enlaces cruzados, la reparación de rotura de hebras y DDR –el más complejo. A continuación se describirán someramente cada uno de estos mecanismos.

Reparación por escisión de bases

La reparación de bases dañadas se hace por el mecanismo de escisión de bases. Las bases dañadas pueden ser el resultado de la desaminación espontánea de la citosina o la adenina o como consecuencia de la acción de agentes externos. Las enzimas claves en este proceso son las ADN-N-glicosidasas que catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosídico selectivamente en aquellos sitios donde existe daño a las bases. Constituyen una gran familia en la que se destacan la uracilo-ADN-N-glicosidasa y la hipoxantina-ADN-N--glicosidasa. Dicha característica le confiere a este mecanismo un alto grado de especificidad que no está presente en la reparación por escisión de nucleótidos. Se tomará como ejemplo de daño la desaminación de la timina que produce uracilo, teniendo presente que los pasos del mecanismo serán iguales en cualquier caso y lo único diferente es la ADN-N-glicosidasa que interviene en el primer paso del proceso.

El daño se produce cuando la citosina se desamina de manera espontánea o provocada y se forma el uracilo. A continuación la uracil-ADN-N-glicosilasa hidroliza el enlace N-glicosídico del nucleótido dañado y deja la base de la hebra opuesta sin apareamiento. Un grupo de endonucleasas, conocidas como AP (apurínicas o apirimidínicas), hidroliza el enlace fosfodiéster de la posición 5´ de la base que ha sido removida y deja una brecha consistente en la ausencia de un nucleótido en la banda dañada. Esta ausencia es ocupada por la ADN polimerasa β, ya que dispone del extremo 3'-OH necesario. Por último, una ADN ligasa sella los extremos apareados por la polimerasa y el ADN queda reparado.

Las enzimas ADN-N-glicosidasas actúan mediante un mecanismo muy peculiar. Estas se asocian con el ADN casi siempre por el surco mayor y provocan una rotación de 180° de la base nitrogenada. Una vez que la base está prácticamente fuera del ADN se ejecuta la hidrólisis del enlace N-glicosídico. Por último, la enzima se separa y la hebra rota hasta alcanzar la posición debida en la molécula.

Este mecanismo también opera en la reparación de daños por bases perdidas, solo que en ese caso el proceso comienza con la participación de las endonucleasas AP, pues ya el sitio abásico fue credo por el agente productor del daño. Los primeros pasos del mecanismo donde intervienen las glicosilasas se ilustra en la figura 33.5.

Reparación por escisión de nucleótidos

El mecanismo más empleado por los organismos superiores para la reparación del ADN es la escisión de nucleótidos. En este mecanismo interviene un grupo considerable de enzimas y proteínas no enzimáticas y es capaz de reparar una gran variedad de daños al ADN, especialmente todos aquellos que ocasionan distorsión de la doble hélice.

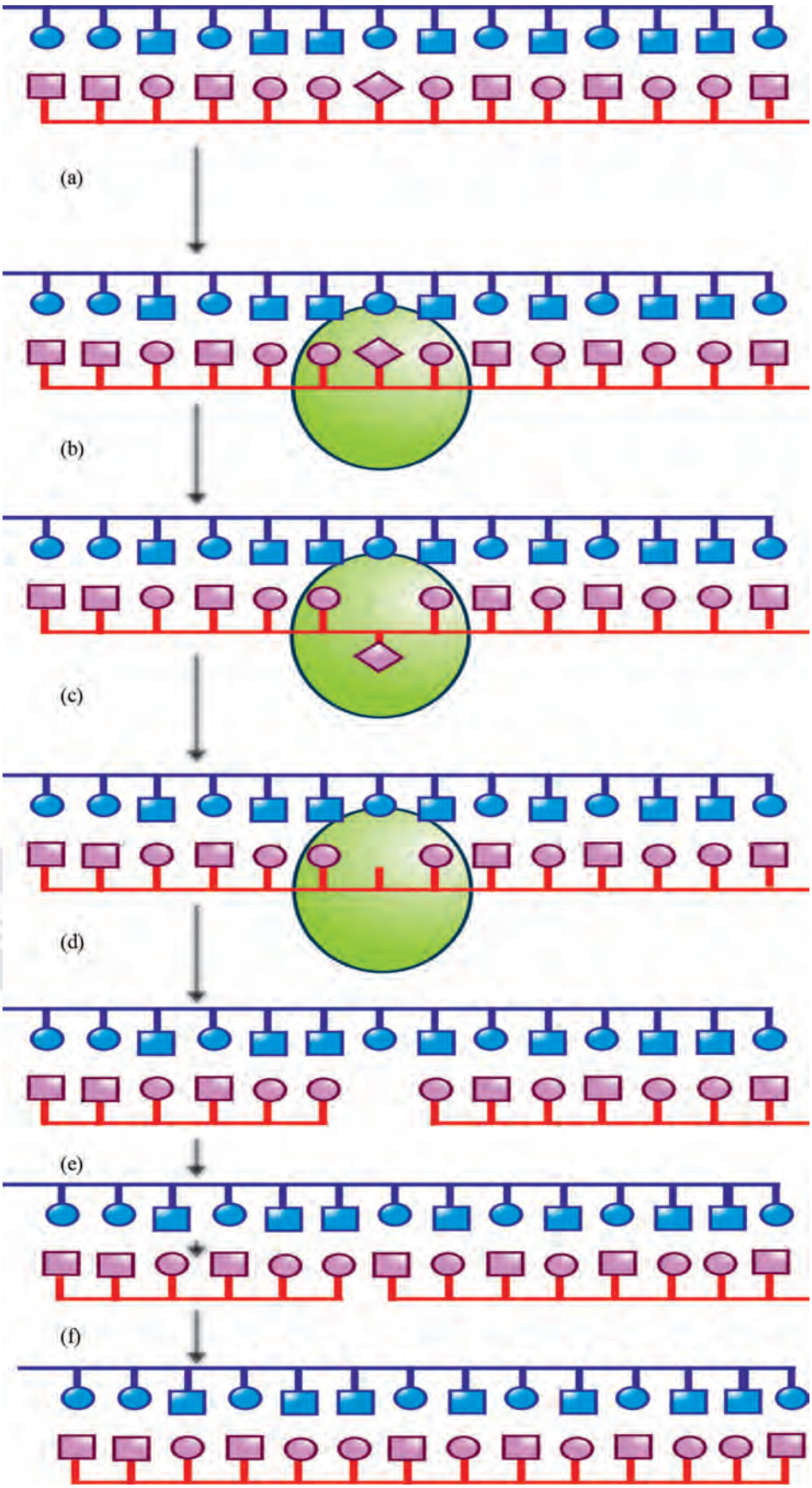


Fig. 33.5. Reparación por escisión de bases. (a) Una ADN-glicosilasa reconoce el sitio donde aparece la base dañada y (b) la hace rotar 180º hacia el sitio activo de la enzima que (c) cataliza la hidrólisis del enlace N-glicosídico. Una endonucleasa (d) hidroliza el enlace fosfodiéster; (e) la hendidura es llenada por la ADN polimerasa β y (f) sellada por la ligasa.

Los conocimientos acerca de este mecanismo en seres humanos alcanzaron un gran nivel de profundidad en 1994, a partir de estudios moleculares del *Xeroderma pigmentosum*, enfermedad que se manifiesta fundamentalmente en la piel, con gran predisposición al cáncer. Debido a ello, las proteínas que intervienen en el mecanismo de reparación fueron bautizadas como XP, con variantes que van de la A a la G.

Existen dos variedades de este mecanismo que se diferencian por la forma en que el daño es reconocido inicialmente. Esas variantes se denominan reparación por escisión de nucleótidos del genoma global (REN-GG) y reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (REN-AT). En el caso de la REN-GG el daño al ADN es reconocido inicialmente por un complejo dimérico formado por las proteínas XPC y hHR23B (la letra h señala el origen humano de esta proteína, del inglés *homologue of Rad23B*). En algunos casos, cuando el daño es pequeño y la distorsión de la hélice no es muy grande, el reconocimiento puede ser facilitado por XPE, que está formado por las proteínas DDB1 (del inglés, DNA: *damage binding protein*) y p48. Para la variante REN-AT el proceso es diferente. Cuando durante la transcripción la ARN polimerasa II se encuentra con un daño en la hebra molde, su actividad y por tanto su movimiento se detienen. Esta detención permite que las proteínas CSA y CSB (productos de los genes mutados en el síndrome Cockaine) se asocien con la polimerasa. El factor de transcripción TFIIH es reclutado hacia el sitio de la lesión. Como parte de este factor se encuentran las proteínas XPB y XPD que tienen actividad de helicasas. También XPG es reclutada al sitio donde la polimerasa se ha detenido y entre todas favorecen la separación de la ARN polimerasa II del ADN y con esta las proteínas CSA y CSB.

De aquí en adelante el proceso continúa igual en las dos variantes. Se recuerda que en el sitio de la lesión se ha formado una compleja estructura constituida por el ADN y las proteínas XPC, hHR23B, XPB, XPD y XPG. El complejo se completa con la entrada de las proteínas XPA, RPA y el dímero XPF-ERCC1. A toda esa estructura se le da el nombre de complejo de preincisión.

En este momento las proteínas XPB y XPD poseen actividad de helicasas y desenrollan la doble hélice en esa zona, de este modo provocan la separación del segmento donde se encuentra el daño al ADN.

El siguiente paso consiste en la rotura y separación de un fragmento de la hebra dañada que contenga el sitio del daño. La proteína XPG es una endonucleasa que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster en el quinto nucleótido hacia el lado 3´ de la lesión. El complejo XPF-ERCC1, también con actividad de endonucleasa, corta la hebra dañada 24 nucleótidos hacia el extremo 5´ de la lesión. De esta forma se genera un fragmento de 29 nucleótidos que contiene la lesión y se separa del complejo de reparación. Por último, se procede a rellenar la brecha de 29 nucleótidos que se ha formado, proceso en el que intervienen la ADN polimerasa δ y el PCNA. El paso final es sellar la hebra y dar integridad al ADN, gracias a la acción de una ADN ligasa. Los aspectos principales de este mecanismo se muestran en la figura 33.6.

Como se verá más adelante, en el *Xeroderma pigmentosum* existe una deficiencia de este sistema de reparación, lo cual fue evidenciado de la manera siguiente: se estudiaron fibroblastos de piel, obtenidos de personas normales y de enfermos. Cuando estos fibroblastos eran irradiados con luz ultravioleta, en el medio de cultivo de los normales se recuperaba gran cantidad de dímeros de timina, lo cual indicaba que el mecanismo operaba de manera eficiente. Cuando la irradiación se hacía a los fibroblastos de los enfermos, la recuperación de dímeros de timina era extremadamente escasa, lo que indicaba fallos en el sistema. Esta investigación permitió identificar varios grupos de complementación.

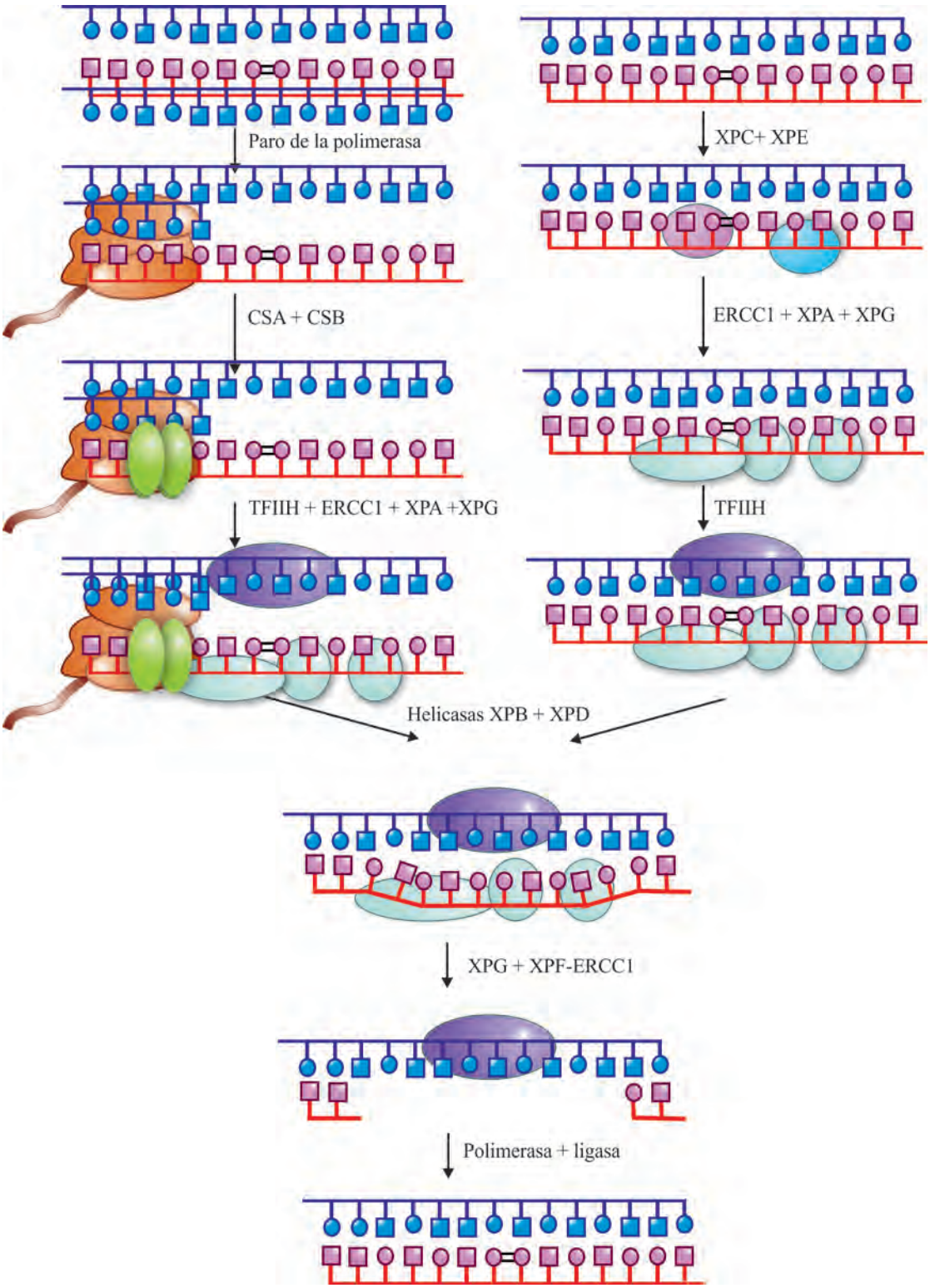


Fig. 33.6. Reparación por escisión de nucleótidos. A la izquierda se ilustra el mecanismo acoplado a la trasnscripción (RE-AT) y a la derecha, el del genoma global (REN-GG). Obsérvese que la diferencia está en el reconocimiento de la lesión y el reclutamiento del TFIIH. Una vez que este se ha incorporado, el proceso es común para ambas vías.

Para explicar qué es un grupo de complementación se pondrá un ejemplo: se obtuvieron fibroblastos de la piel de tres pacientes (A, B y C) y de un individuo normal (N). Se cultivaron por separado y se irradiaron con luz ultravioleta. En el medio de cultivo de N apareció una gran cantidad de dímeros de timina, mientras que en los de A, B y C el número era escaso. Mediante la utilización de polietilenglicol se logró unir fibroblastos de los pacientes A y B, y formar un heterocarionte (núcleos diferentes).

Cuando el heterocarionte era irradiado, se recuperaban abundantes dímeros de timina en el medio de cultivo, lo que indicaba que el defecto de A era compensado por el de B y el de B por el de A, es decir, había una complementación entre las células de los dos pacientes. Esto se interpreta como que la deficiencia en la reparación se debe, al menos, a la mutación de dos genes, que se designarán GENA y GENB. El paciente A tiene defectuoso el GENA, pero normal el GENB, mientras que el paciente B tiene normal el GENB y defectuoso el GENA. Al formarse el heteocarionte, el paciente A aporta el GENB y el B, el GENA, de manera que el proceso se restituye, por eso cada grupo de complementación es equivalente a un gen.

Se pueden formar heterocariontes tanto entre pacientes A y C como entre B y C, y los resultados se analizan de la misma forma, por ejemplo, si al unir A y C la eliminación de dímeros de timina sigue siendo escasa, se supone que los genes mutados en A y C son los mismos. Si aumentan los dímeros de timina, entonces las mutaciones de A y C son diferentes y se crearía un nuevo grupo de complementación. Habría que probar con heterocariontes B y C. Estos estudios permitieron identificar siete grupos de complementación, designados XPA a XPG, y caracterizar los componentes del sistema de reparación por escisión de nucleótidos en los seres humanos.

Reparación de enlaces entrecruzados

La formación de enlaces cruzados es una de las lesiones más graves que puede experimentar el ADN, pues constituye un obstáculo insalvable para las enzimas que intervienen tanto en la duplicación como en la transcripción. La permanencia de estos daños puede llevar a la muerte celular y con ello a la falta de función de un órgano o tejido. Se ha estimado que entre 20 y 40 de estos daños sin reparar son suficientes para matar una célula de mamíferos. Este daño puede ser originado por algunos antibióticos como la mitomicina C o reactivos químicos como el ion nitrito.

Los enlaces cruzados siempre son el resultado de la acción de agentes externos al ADN y se caracterizan por presentar dos sitios reactivos: por uno de estos el agente se une a una base nitrogenada y por el otro, a otra base. Cuando las dos bases son parte de la misma hebra, se forma un enlace intracatenario; cuando las bases pertenecen a hebras complementarias los enlaces son intercatenarios. Por su potencialidad para producir la muerte celular, algunos de esos agentes se emplean con éxito en el tratamiento del cáncer.

La reparación de enlaces cruzados intracatenarios se realiza mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos, que fue estudiado en el capítulo anterior, por lo tanto, en este solo se estudiará el mecanismo de reparación de enlaces cruzados intercatenarios.

El mecanismo de reparación de estos daños es complejo y no está aclarado totalmente. Un hecho notorio es la participación de numerosas proteínas, organizadas en múltiples complejos durante el proceso de reparación. La falla de algunos de los componentes del sistema da lugar a la anemia de Fanconi, una enfermedad genética poco frecuente, con tendencia al cáncer.

Mecanismo de la reparación. La lesión es reconocida por la distorsión en la estructura local de la doble hélice, debido a la desestabilización de las interacciones de empalizado que incrementan la flexibilidad de la hélice. Los mayores aportes para el conocimiento de esta vía se han logrado mediante el estudio de células provenientes de pacientes con anemia de Fanconi, que es el resultado de mutaciones en alguno de los 15 genes cuyos productos componen la vía y se han denominado FANCA a FANCP. Un conjunto de esas proteínas reconoce la lesión y forma una especie de plataforma molecular que coordina las acciones de las nucleasas y la etapa de síntesis sobre el molde dañado TLS (del inglés *translesion synthesis*), necesarias para la reparación de los enlaces cruzados.

El primer paso del mecanismo molecular de la reparación consiste en la ruptura de una de las hebras a ambos lados de la lesión, de forma tal que el fragmento queda unido por el agente de cruzamiento a la otra hebra. Esta doble ruptura es realizada por alguna de las endonucleasas que son reclutadas hacia el sito por el complejo FA. También se ha sugerido la participación de XPF y XPG del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, lo que da como resultado la formación de una brecha en una de las hebras. Esta brecha puede ser llenada por la acción de ADN polimerasas específicas, capaces de realizar la síntesis sobre un molde dañado y sellada por una ADN ligasa. La hebra complementaria es reparada mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos, estudiado anteriormente.

Como se puede observar el proceso es complejo y desde el punto de vista de su mecanismo equivale a una reparación por escisión de nucleótidos doble, es decir, uno para una hebra y otro para la hebra complementaria (Fig. 33.7).

En resumen, la formación de enlaces cruzados intercatenarios representa un gran desafío para la célula, pues estos daños son un obstáculo infranqueable tanto para la duplicación del ADN como para su transcripción. Cuando las polimerasas que realizan la función principal en estos procesos se encuentran con un enlace entrecruzado, se detienen y no pueden continuarlo, a menos que la lesión no sea reparada. En tanto la lesión no se repara, se detiene la progresión del ciclo celular que, de hacerse permanente, puede conducir a la senescencia o a la apoptosis. Sin embargo, como el reconocimiento de la lesión se realiza a través de las proteínas de los complejos FA cuando alguna de ellas falta o no es funcional, no se pone en marcha la respuesta celular y esto puede llevar a rupturas cromosómicas, pérdida de material cromosómico y división celular en condiciones precarias, hasta crear un estado de inestabilidad genómica que puede propiciar la transformación cancerosa de las células.

Reparación de las roturas de hebras

De todas las lesiones que puede experimentar el ADN las más peligrosas son las roturas de las hebras, que pueden ser en una o en las dos, y provocar una falta de continuidad en la estructura de la molécula. Estas roturas pueden producirse accidentalmente por errores durante los procesos donde interviene el ADN o por la acción de agentes externos, sobre todo las especies reactivas del oxígeno, generadas como subproductos del metabolismo celular, o por radiaciones ionizantes.

Los mecanismos para la reparación de estas lesiones son muy complejos y se encuentran muy conservados evolutivamente. Son muchos los productos génicos implicados en esos procesos y la participación exacta de algunos de estos aún se desconoce.

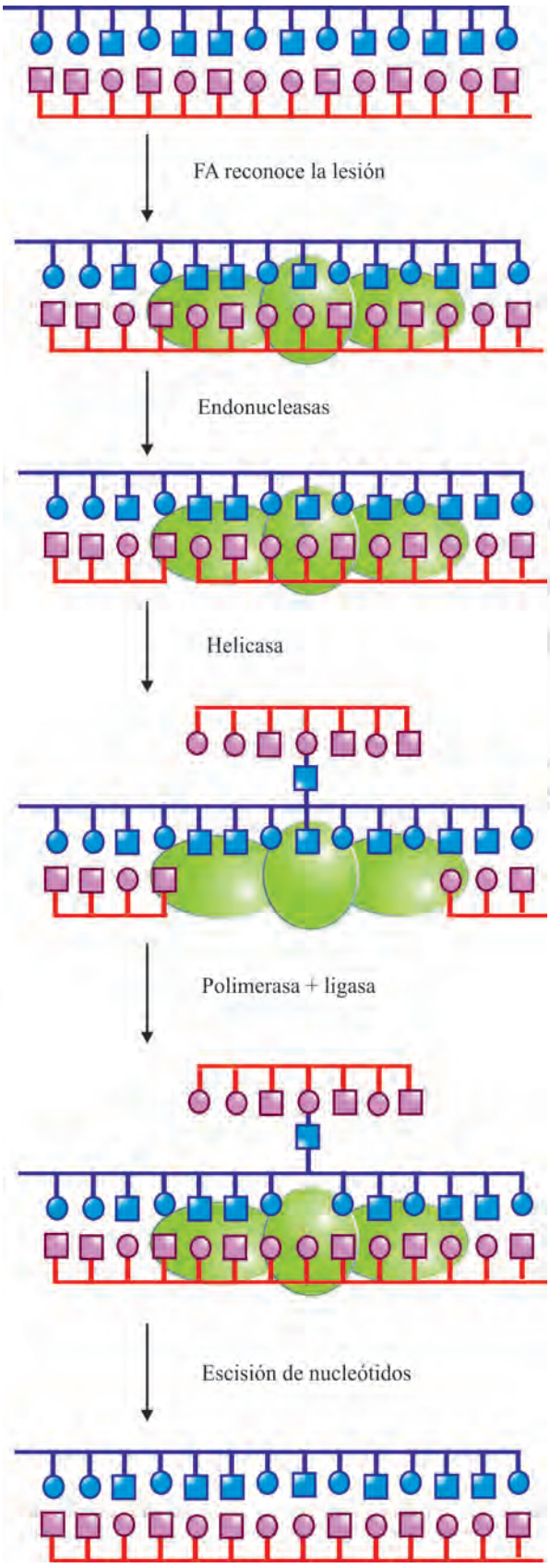


Fig. 33.7. Reparación de enlaces cruzados intercatenarios. Las proteínas del complejo FA (de la anemia de Fanconi) reconocen la lesión y sirven de plataforma para el resto de los componentes del sistema de reparación. Las endonucleasas cortan el ADN a ambos lados de la lesión; las helicasas desenrollan la hélice y el fragmento que contiene el daño queda unido a la hebra complementaria. Las polimerasas que trabajan sobre el molde dañado rellenan la brecha que es sellada por una ligasa. La otra hebra se repara mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos.

Roturas de una hebra

Las roturas de una hebra son discontinuidades en una de las hebras de la doble hélice y generalmente se acompañan por la pérdida de un nucleótido y daños tanto hacia el lado 3´como 5´de la rotura. Una de las causas más frecuentes de roturas de una hebra es el ataque oxidativo por especies reactivas del oxígeno, ROS (del inglés, *reactive oxygen species*).

Las roturas son detectadas inicialmente por las poli (ADP-ribosa)-polimerasas (PARP), que transfieren ADP-ribosa desde el NAD+ hacia proteínas diana tales como las histonas H1 y H2A y la propia enzima. La poli-ADP-ribosa funciona como una plataforma sobre la cual son reclutadas otras proteínas que intervienen en la reparación. Como en los bordes de las roturas aparecen modificaciones es necesario rectificarlas hasta obtener el extremo 3´-OH y 5´-P característicos de los extremos. A continuación se produce el llenado de la brecha que a veces es la ausencia de un solo nucleótido y otras a veces es más largo. Los tramos cortos son llenados por la ADN polimerasa β; otras polimerasas se emplean en las brechas más largas. Por último, la hebra es sellada por una ADN ligasa.

Roturas de las dos hebras

La rotura de las dos hebras se considera la más letal de las lesiones al ADN. Las radiaciones ionizantes son la causa principal de estos daños. La rotura de las dos hebras producidas por las radiaciones ionizantes generalmente contiene extremos 3´ y 5´ monofibrilares. Además, los márgenes de la rotura contienen grupos no convencionales tanto en el lado 3´ como en el 5´ que deben ser removidos antes de la unión de los extremos.

En células humanas existen dos vías principales para reparar las roturas de dos hebras, denominadas unión no homóloga de los extremos NHEJ (del inglés, *non-homologous end-joining*) y la recombinación homóloga HDR (del inglés, *homology-directed repair*). La recombinación homóloga es más fidedigna, pero requiere de una cromátida hermana no dañada que sirva como molde y funcione solamente después de la duplicación del ADN. Por su parte NHEJ es activa durante todo el ciclo celular y se considera como la vía principal para la reparación de la doble ruptura inducida por radiaciones ionizantes en las células humanas. A continuación se hará una exposición simplificada de los mecanismos.

Unión no homóloga de los extremos. El proceso transcurre de la siguiente forma: al producirse roturas cercanas de una hebra en las dos hebras complementarias sucede la separación de las hebras generando extremos monofibrilares con daños a ambos extremos de la hendidura. Esta estructura es reconocida por el dímero Ku70/Ku80 que se enrolla en forma toroidal alrededor del ADN y se desplaza hacia el interior de las hebras dañadas. El dímero Ku recluta hacia el sitio de la lesión a la ADN-PKsc que ocupa los bordes de la lesión y se autofosforila.

El complejo Ku/ADN-PKsc recluta hacia el sitio de la lesión al complejo X4-L4 que a su vez recluta hacia ese sitio a las enzimas que intervienen en el procesamiento de los extremos como Artemisa, etc. Estas enzimas procesan los extremos hasta crear el 3´-OH y el 5'-PO_4, necesarios para la acción de las polimerasas. Durante este paso pueden perderse algunos nucleótidos, pues este mecanismo de reparación es propenso a los errores.

Una vez procesados los extremos, el complejo X4-L4 recluta la ADN polimerasa correspondiente, la cual llena la brecha dejada por la acción de las enzimas procesadoras de los extremos. Cuando concluye la síntesis reparadora, los extremos ya procesados se unen por la ADN ligasa IV.

Como la unión no homóloga de los extremos ocurre en ausencia de un ADN molde o regiones de microhomología, el procesamiento de los extremos tiene el peligro de llevar a la pérdida de nucleótidos, lo que hace que NHEJ sea un proceso inherentemente propenso a errores, demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*. Un resumen del proceso se ilustra en la figura 33.8.

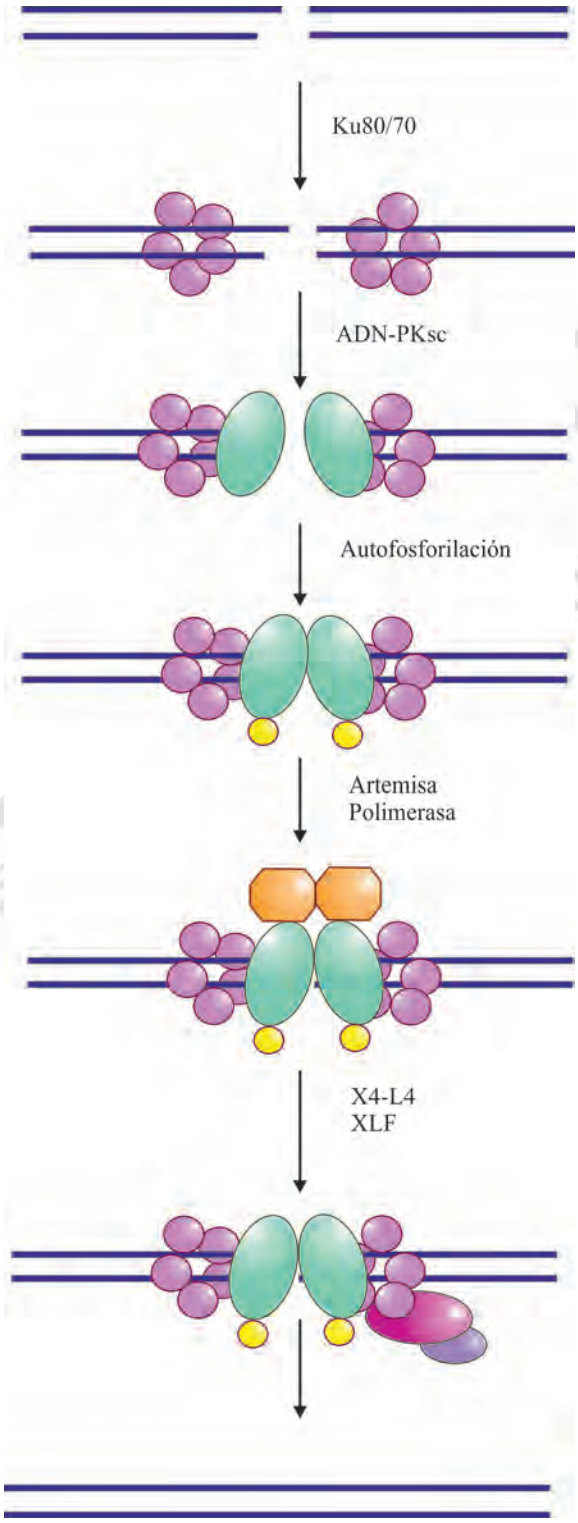


Fig. 33.8. Reparación mediante unión no homóloga de los extremos. Si no existe una molécula homóloga de ADN, se procede a la unión de los extremos. La ADN-PK reconoce la lesión mediante las unidades Ku y por su autofosforilación recluta a Artemisa. Otros componentes sellan la rotura. El proceso se describe con más detalles en el texto.

Reparación por recombinación homóloga. Esta forma de reparación de la rotura de dos hebras solo es posible a partir de la mitad de la fase S, pues se requiere de una molécula de ADN homóloga que solo se produce durante la replicación del ADN. El proceso es altamente complejo, con la participación de un número considerable de proteínas y su estudio detallado está fuera del alcance de este capítulo. A continuación se ofrecerá una versión muy sintetizada del proceso.

En líneas generales el proceso ocurre de la siguiente forma: los bordes de la rotura son procesados por nucleasas generando una zona monofibrilar con un extremo 3´-OH; una de las hebras o las dos invaden a la otra molécula de ADN y buscan la homología de secuencia; cuando las hebras se aparean el extremo 3´-OH es alargado por una ADN polimerasa; la hebra alargada sirve de molde para llenar la brecha producida en la molécula dañada y posteriormente ambas son selladas por una ADN ligasa. Este mecanismo garantiza que en el proceso no haya pérdida de nucleótidos y por tanto de información genética. Una versión simplificada se muestra en la figura 33.9.

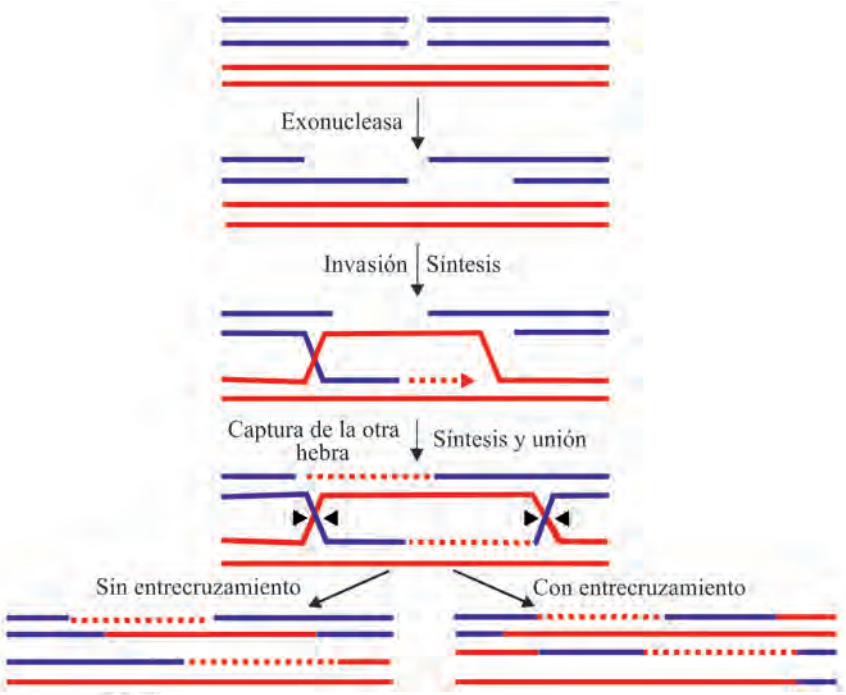


Fig. 33.9. Reparación por recombinación homóloga. Las endonucleasas resecan los extremos de hebras y propician la invasión. La hebra invasora es alargada y capturada formando el intermediario de Holliday. La resolución del intemediarios permite la restitución total del material genético. Para más detalles vea el capítulo 31.

A diferencia del mecanismo anterior, en este no se produce pérdida de material genético. Sin embargo, este proceso es potencialmente dañino pues puede conducir a grandes reordenamientos cromosómicos y la formación de intermediarios potencialmente letales. Por eso no es de extrañar que defectos en la recombinación y procesos asociados estén relacionados con síndromes con predisposición al cáncer, caracterizados por inestabilidad genómica.

Alteraciones de la reparación

En los últimos años el estudio de varias enfermedades genéticas ha llevado a la conclusión de que en algunas de ellas existen alteraciones del sistema de reparación del ADN. En algunos casos parece ser la causa primaria, mientras que en otros se trata solo de una deficiencia secundaria, por ejemplo, el *Xeroderma pigmentosum*, la ataxia telangiectásica, el síndrome de Fanconi y el síndrome de Bloom.

El *Xeroderma pigmentosum* es una enfermedad que afecta la piel y el sistema nervioso. La exposición a la luz solar en los primeros meses causa eritemas que duran varios días y bronceado acentuado. Las lesiones son más intensas y tempranas en las regiones del cuerpo expuestas al sol: cara, cuello, dorso de las manos, etc. La esclerosis dérmica progresiva y las contracturas implican la deformación de la boca, los ojos y la nariz. Comúnmente existe fotofobia con blefaritis, queratitis, opacidades y úlceras. Muchos pacientes mueren antes de los 20 años por neoplasma cutáneo metastásico. En cultivo de células obtenidas de estos pacientes se ha observado una actividad deficiente en cuanto a la reparación del ADN, debido a los daños causados por la luz ultravioleta. La enfermedad se trasmite como un rasgo autosómico recesivo.

El estudio de células en cultivo, procedentes de pacientes con esta enfermedad, ha demostrado que existen, al menos, siete grupos de complementación, lo que equivale a decir que existen, al menos, siete genes involucrados en la causa de la enfermedad; estos genes han sido designados XP-A a XP-G y se ha podido determinar que sus productos participan en los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos.

En Cuba existe un programa especial para el tratamiento de los pocos pacientes que padecen de *Xeroderma pigmentosum*.

En el cáncer de colon de tipo hereditario y no polipósico se ha determinado que su causa esencial radica en la deficiencia del proceso de reparación del mal apareamiento. La mayoría de los casos puede ser atribuida a mutaciones en los genes hMSH2, hMLH1, hPMS1 o hPMS2, los cuales codifican proteínas que intervienen en el proceso de reparación, como fue estudiado en el capítulo 26.

La ataxia telangiectásica comienza en edad temprana y a los 10 años los signos son de inestabilidad total, con hipotonía muscular y abolición de reflejos tendinosos, también existe bajo coeficiente de inteligencia.

La telangiectasia comienza entre los 3 y 4 años de edad, en conjuntiva, orejas y parte expuesta del cuello; se verifica disminución de los niveles de inmunoglobulina A. En el cariotipo pueden aparecer aberraciones cromosómicas variadas. Existe tendencia al desarrollo de linfomas, la muerte ocurre en edad temprana. Los fibroblastos de estos pacientes muestran evidente disminución de la actividad reparadora del ADN, especialmente frente a radiaciones gamma. Se trasmite como un rasgo autosómico recesivo. Parece ser que las alteraciones de la reparación son secundarias y que el defecto principal radica en la mutación de un gen supresor tumoral, denominado ATM (siglas del inglés que significan *mutado en la ataxia telangiectásica*).

El síndrome de Fanconi tiene como signo más sobresaliente la hiperpigmentación y disminución general del número de células sanguíneas (pancitopenia). Los pacientes presentan baja estatura y tendencia a desarrollar leucemia; actividad de reparación del ADN disminuida, sobre todo a la acción de agentes que provocan entrecruzamiento de las hebras. Se trasmite como un rasgo autosómico recesivo. Se han identificado 15 genes (FANCA a FANCP) cuyas mutaciones dan origen a esta enfermedad y siete de estos han sido clonados. También se conocen las proteínas codificadas por esos genes. Estas proteínas participan en las vías de señalización de daños al ADN, producidos por agentes de entrecruzamiento como la mitomicina C. Los pacientes suelen morir en edades tempranas como consecuencia de fallas en la médula ósea.

El síndrome de Bloom se presenta más en los varones que en las hembras. Existe una evidente fotosensibilidad con eritemas persistentes desde el primer mes de vida. Después aparecen las telangiectasias, principalmente en la cara y el dorso de las manos. Prevalece la baja estatura, pero no existe retraso mental y son individuos con reducción de la fertilidad. Hay una disminución de la actividad de reparación del ADN, los linfocitos son particularmente sensibles al sulfonato de etilmetano. Tiene la característica casi única de significativa predisposición a todo tipo de cáncer, incluso leucemias, linfomas y

tumores sólidos. Se trasmite como un rasgo autosómico recesivo. Se ha reportado recientemente que este síndrome está ligado a mutaciones en el gen de una ADN helicasa de la superfamilia RecQ.

Defectos genéticos en los genes CSA y CSB, cuyos productos participan en la REN-AT dan lugar a la aparición del síndrome Cockaine. Este síndrome se caracteriza por un desarrollo prenatal normal, seguido del establecimiento de retardo progresivo del crecimiento, trastornos neurológicos que incluyen degeneración de la retina, hipoacusia y ataxia, todos estos comienzan en el primer año de vida. Aunque los pacientes padecen de fotosensibilidad, lo cual refleja un defecto en la reparación del ADN, no muestran predisposición al cáncer. La muerte ocurre alrededor de los 12 años de edad.

Por último, se ha mencionado que una significativa disminución de la actividad de los sistemas de reparación del ADN, pudiera ser la causa principal de las modificaciones que se observan en los individuos durante el periodo de envejecimiento; este tema se tratará con más detalles en el capítulo 87.

Resumen

No existe otra macromolécula cuya integridad estructural tenga en la célula el significado vital que posee el ADN; su conservación constituye por tanto una actividad principal de la célula, para evitar la contaminación con ADN foráneo y reparar cualquier daño producido en las propias moléculas.

Unas de las primeras características que contribuyen a la conservación del material genético son la propia estructura del ADN, su asociación con proteínas y su ubicación, que en los eucariontes está separado del resto de la célula por una doble membrana.

Otro mecanismo lo constituye el sistema de modificación-restricción, ya que permite la identificación del propio ADN y la degradación de los ADN extraños, evitando la contaminación.

No obstante, el ADN es una molécula que está expuesta a daños como: bases mal apareadas, bases perdidas, alteraciones de bases, rotura de una o de las dos bandas, formación de enlaces entrecruzados, etc. Para casi todos estos daños existen sistemas de reparación que se pueden clasificar en directos e indirectos. En los directos el sistema hace que el ADN vuelva a su estado original y elimine las modificaciones producidas por el agente dañino. A este grupo pertenecen los mecanismos de fotorreactivación y de eliminación de grupos alquilos. En los indirectos se separa un segmento de ADN que contiene la zona dañada y la brecha es llenada por acción de polimerasas y ligasas. Las principales diferencias radican en los mecanismos para la eliminación del fragmento dañado y el tipo de polimerasas y ligasas empleadas. Entre estos se encuentran la escisión de bases, la escisión de nucleótidos y la eliminación de entrecruzamientos intercatenarios. Los daños más graves y los mecanismos más complejos son las roturas de las dos hebras. En dependencia del momento del ciclo celular estas lesiones pueden ser reparadas mediante la unión no homóloga de los extremos, con pérdida de algunos nucleótidos o mediante la recombinación homóloga, sin pérdida de material genético.

Algunas enfermedades en los seres humanos se deben o se acompañan por trastornos en los mecanismos de reparación, entre otras el *Xeroderma pigmentosum*, la ataxia telangiectásica, el síndrome de Bloom, el síndrome de Fanconi y el síndrome Cockaine. Últimamente se ha planteado la posibilidad de que el proceso de envejecimiento esté también relacionado con una especie de agotamiento de los mecanismos de reparación del ADN.

Ejercicios

1. ¿Por qué se afirma que la integridad de ninguna otra molécula tiene tanta importancia para la célula como la integridad del ADN? Puede ofrecer al menos tres razones.
2. Si a una bacteria se le introduce un fragmento de ADN de otra bacteria de la misma línea celular ¿actuará sobre esta el sistema de modificación-restricción?
3. ¿Cuáles son las principales analogías y diferencias estructurales y funcionales entre los tres tipos de endonucleasas de restricción?
4. ¿Por qué cree usted que las roturas en las dos bandas del ADN son el daño más grave que experimenta esta molécula?
5. ¿Qué repercusión tendrá sobre la replicación del ADN el tratamiento de las células con mitomicina C?
6. ¿Qué importancia tiene para el médico el conocimiento de los diferentes mecanismos de reparación del ADN?
7. Un virus al que denominaremos QB tiene dos cepas (QB-A y QB-B) que se originaron por mutación del virus original (QB-wt). El QB-wt puede infectar con éxito una cepa de bacterias y multiplicarse en estas. Dicha propiedad la conserva el mutante QB-B, pero no el QB-A. ¿Puede usted proponer una explicación plausible para este fenómeno?
8. ¿Cuáles son las diferencias de los mecanismos de reparación directos e indirectos?
9. De manera general, ¿cómo se realizan los mecanismos indirectos?
10. ¿Por qué si la reparación de la rotura de las dos hebras mediante la recombinación homóloga es más fidedigna, la célula emplea la unión no homóloga de los extremos?
11. Los signos clínicos que se observan en pacientes con mutaciones en los genes FANC son similares a los que muestran los pacientes con mutaciones en BRCA2. ¿Qué puede usted inferir de estas observaciones?
12. La rotura de las dos hebras del ADN puede repararse por la unión directa de los dos extremos de la rotura. ¿Qué peligros representa este mecanismo para la célula?

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Regulación de la expresión genética

Los seres vivos están en constante intercambio de materia, energía e información con el medio, esta es una característica esencial de la vida, pero dicho intercambio no ocurre de manera similar en todos los organismos.

Las bacterias, por la forma en que viven, están sometidas a cambios pronunciados del medio, del cual extraen sus fuentes de supervivencia. Los eucariontes monocelulares, aunque poseen una estructura más compleja, están en iguales condiciones.

En los organismos pluricelulares más desarrollados no todas las células se encuentran expuestas a grandes cambios en la composición del medio; en el hombre, solo las células del tubo digestivo y el hígado experimentan grandes variaciones en la composición del medio; el resto de las células del organismo se desarrollan en un medio de composición prácticamente constante.

Estas condiciones de vida influyen de manera significativa en los mecanismos utilizados por cada tipo de organismo, que le permiten adaptarse a los cambios ambientales. Los organismos monocelulares deben poseer mecanismos que funcionen de forma rápida, tanto, como cambia el medio, mientras los organismos superiores pueden emplear mecanismos de respuesta más lenta.

La presencia de nutrientes, su tipo y cantidad son algunos de los factores que más influyen en la supervivencia de un organismo; si este no dispone de mecanismos capaces de adaptar su metabolismo cuando suceden cambios negativos de nutrientes en el medio, perecerá en un tiempo más bien corto.

En este capítulo se estudiarán los mecanismos generales de regulación de la expresión de la información genética en los diferentes niveles que permiten a los organismos adaptarse a las condiciones cambiantes del medio. Se comienza por presentarlos en procariontes, donde han sido mejor estudiados, y luego se hacen algunas consideraciones acerca de los conocimientos actuales en los organismos pluricelulares.

Aspectos generales

Los mecanismos de selección natural han ido conservando las formas de vida que presentan mayor eficiencia. Entre los organismos monocelulares, cualesquiera cambios permanente y hereditario que aumenten la eficiencia global del metabolismo celular,

hacen que estos tipos crezcan más rápido que el tipo silvestre. Si se deja pasar un tiempo prolongado la nueva línea celular, desplazará totalmente al tipo silvestre.

A modo de ejemplo, si en una población de 10^9 bacterias que duplican su número en 30 min, una bacteria es alterada de forma que se duplique cada 29,5 min, aproximadamente en 80 días de crecimiento continuo, 99,9 % de la población será del nuevo tipo; este tiempo es quizás muy largo en términos de trabajo de laboratorio, pero es insignificante en cuanto a tiempo evolutivo se refiere, por tanto, sobre esta base es razonable pensar que los sistemas de regulación surgieron y se desarrollaron en el sentido de ganar mayor eficiencia, como consecuencia del proceso de evolución.

Existen algunas características más o menos generales de la regulación intracelular que pueden resumirse en:

- Las moléculas que ocasionalmente se utilizan son sintetizadas solo en el momento para ser empleadas.
- Una actividad enzimática que consume energía de manera inútil en un momento dado, o utiliza una sustancia que es sustrato de otra reacción de mayor prioridad, está frecuentemente inhibida.
- Cuando existen varias vías posibles de producción de energía, la célula utiliza la que produce mayor cantidad por unidad de tiempo.
- La alteración de una vía biosintética, que reduce la producción de moléculas deficientes, resulta eficaz y tiende a conservarse.

La característica esencial de estos mecanismos de regulación es que se conectan y desconectan según la necesidad. No existen ejemplos de mecanismos que estén completamente desconectados y siempre existe un nivel básico de funcionamiento. Por comodidad, para hacer referencia a un sistema que funciona a su nivel básico, se dice que está desconectado.

Regulación de la expresión de la información genética en procariontes

En los sistemas bacterianos, donde varias enzimas actúan de forma sucesiva en una ruta metabólica, es frecuente el hecho de que todas están presentes o todas están ausentes, este fenómeno recibe el nombre de regulación coordinada.

La regulación de la expresión de la información genética puede realizarse al nivel pretranscripcional, transcripcional y postranscripcional; el segundo caso es el más frecuente y económico.

Regulación transcripcional

Los mecanismos moleculares para cada sistema de regulación pueden variar mucho, pero con frecuencia se clasifican en dos grandes tipos: positivos y negativos.

En la regulación negativa, la célula presenta un inhibidor cuya acción determina que la transcripción se encuentre desconectada. En la positiva, existen moléculas que provocan la activación del promotor. Las regulaciones positiva y negativa no son excluyentes, y de hecho existen sistemas que están regulados por las dos formas.

En estos casos es necesaria la existencia de dos efectores. Para evitar confusiones en lo sucesivo, debe tenerse presente la diferencia fundamental entre las dos formas mencionadas. En la regulación negativa la unión del efector (que suele ser una proteína) al ADN provoca la inhibición de la transcripción, en tanto, en la positiva, la unión determina una activación de la transcripción.

A continuación se presenta un estudio más o menos detallado de los principales mecanismos de regulación transcripcional.

Inducción enzimática

Desde principios del siglo xx se conocía que la *E. coli*, cuando crece en un medio que contiene glucosa, no utiliza la lactosa que se añade al medio de cultivo. Si se trasladan las células a un medio carente de glucosa, pero que contiene lactosa como fuente de carbono, a los pocos minutos las células utilizan la lactosa de manera eficiente. Si al medio anterior se añade glucosa, a los pocos minutos las células dejan de utilizar la lactosa y continúan utilizando solo glucosa.

Si se añaden al medio de manera simultánea la glucosa y la lactosa, las células utilizan la glucosa y una vez agotada esta, comienzan a utilizar la lactosa. La primera explicación que se dio a este fenómeno, conocido entonces como adaptación enzimática, fue la existencia en las células de precursores inactivos de las enzimas que utilizaban la lactosa y que esta activaba.

Para investigar la certeza de esta hipótesis se realizó una experiencia que, por su sencillez y claridad, se expone a modo de ilustración.

Se tomó una colonia de *E. coli* y se puso a crecer en un medio que contenía [^{32}S]-metionina, al cual no se añadía lactosa; después de algún tiempo las células fueron lavadas y pasadas a un medio con metionina normal, a los pocos minutos se añadió lactosa; se midió la aparición de las enzimas activas y cuando alcanzaron un valor elevado, se homogenizó el cultivo y se aislaron las enzimas; se midió la radiactividad y se comprobó que no contenían azufre radiactivo.

Se repite la experiencia, pero incorporando la metionina radiactiva junto con la lactosa y después de un procesamiento similar se detecta el azufre radiactivo en las enzimas. Como se deduce de este experimento, las enzimas no existen como precursores inactivos en ausencia de lactosa, sino que son sintetizadas totalmente a partir del momento en que la lactosa es añadida, siempre que el medio no contenga glucosa.

Luego se pudo comprobar que además de la enzima β-galactosidasa, que hidroliza el enlace β-glicosídico de la lactosa y produce galactosa y glucosa, ocurría la inducción de una proteína que fue denominada galactopermeasa, ya que esta forma parte del sistema transportador de membrana para los galactósidos. De manera coordinada se regula la síntesis de las proteínas que favorecen el transporte del azúcar hacia el interior de la célula y las que comienzan su degradación.

Hoy se sabe que existe una tercera enzima implicada en la inducción, denominada galactosa transacetilasa, cuya función en el metabolismo de la galactosa no está totalmente esclarecida.

A este fenómeno mediante el cual la presencia de una sustancia en el medio provoca la síntesis de determinada enzima, o grupo de enzimas, se le da actualmente el nombre de inducción de la síntesis de enzimas o inducción enzimática (Fig. 34.1).

El estudio de distintos microorganismos con medios selectivos ha puesto de manifiesto que la inducción enzimática no es exclusiva de las enzimas del metabolismo de la lactosa, sino que está presente o relacionada con las enzimas que intervienen en el catabolismo de otros azúcares.

Las sustancias capaces de provocar la inducción reciben el nombre de inductores, estos son transformadas por la enzima y sus concentraciones disminuyen con el tiempo. Existen sustancias, relacionadas estructuralmente con los inductores naturales, que tienen un poderoso efecto inductor, pero no son transformadas por las enzimas, denominadas inductores gratuitos, cuyo empleo ha contribuido de manera eficaz al

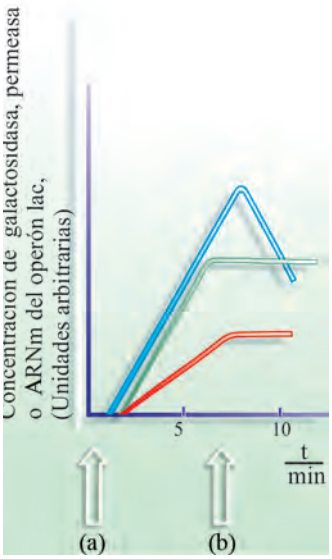


Fig. 34.1. Inducción enzimática. Se representan los resultados de una experiencia típica de inducción de las enzimas del operón *lac*. Como se observa, a los pocos minutos de ser añadida la lactosa (a) comienza la síntesis del ARNm y más tarde de las enzimas correspondientes. Al retirarse la lactosa (b) comenzará el descenso de la concentración del ARNm que será seguido por una disminución de la concentración de las enzimas.

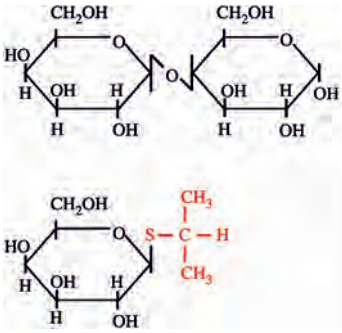


Fig. 34.2. Inductores del operón *lac*. En la parte superior de la figura se muestra la estructura de la lactosa, que es el inductor natural del operón *lac*, y en la parte inferior, la de un inductor gratuito, el isopropiltiogalactósido.

esclarecimiento de estos mecanismos. La estructura de la lactosa, que es el inductor del operón *lac* y del isopropiltiogalactósido, que es un inductor gratuito, son similares (Fig. 34.2).

Modelo del operón

En 1961, después de casi 20 años de trabajo, Francois Jacob y Jacques Monod, del Instituto Pasteur, propusieron un modelo para explicar el mecanismo molecular por el cual se realiza la inducción de la síntesis de proteínas. En las páginas siguientes se ofrece la visión actual del modelo, que lógicamente ha sido enriquecido con nuevos aportes desde el momento en que fue propuesto.

En el ADN bacteriano se distinguen varios sectores desde el punto de vista funcional; aquellos sectores que codifican la síntesis de polipéptidos específicos, reciben el nombre de genes estructurales, además, por la forma en que fueron identificados y localizados originalmente, como consecuencia de una experiencia denominada cis trans, se les da también el nombre de cistrones; de ahí surgen las denominaciones de los ARNm monocistrónicos y policistrónicos (ver capítulo 27).

Adyacente a los cistrones se encuentra otro sector que controla o regula su expresión y recibe el nombre de operador. Como el operador no codifica ningún polipéptido, ni tampoco un ARN, no se trata de un gen, y para referirse a él se dice el *locus* (sitio) operador. El conjunto de segmentos de ADN compuesto por el operador y los cistrones que están bajo su control recibe el nombre de operón; este término también proviene de la informática y se emplea aquí por ser la unidad de operación, lo cual significa que cuando el operón se conecta funcionan todas sus partes como si fueran una sola, igual sucede cuando se desconecta.

Un tercer sector es el promotor, al cual se une la ARN polimerasa. Por último, se distingue un sector que codifica la síntesis de una proteína específica, cuya actividad determina el funcionamiento de los cistrones; este sector recibe el nombre de gen regulador y la proteína codificada por él se denomina proteína represora o represor. El gen regulador puede encontrarse adyacente a los cistrones o alejado de estos.

El funcionamiento del modelo consiste en que la proteína represora es de tipo alostérico y tiene un sitio de elevada afinidad por el ADN del operador en una de sus dos conformaciones (la R), mientras que en la otra conformación (la T) tiene muy poca afinidad. La unión del represor al operador se produce mediante el reconocimiento de una secuencia específica de bases de este sector, que forma un complejo de elevada estabilidad e impide de esta forma el desenrollamiento del ADN, que es imprescindible para la transcripción. Los inductores provocan el desplazamiento del equilibrio conformacional del estado R al T.

Como la unión del represor al operador determina la inhibición de la transcripción, se está en presencia de un sistema de regulación negativa (Fig. 34.3).

Se han estudiado numerosos operones inducibles, casi todos relacionados con la utilización celular de monosacáridos, aunque no exclusivamente. Si bien es cierto que cada uno se corresponde con la situación descrita antes, se tiene en cuenta que cada uno presenta sus particularidades. Para los objetivos de este texto se ha seleccionado aquel que, por ser el primero y más estudiado, ofrece una visión más completa de su mecanismo.

Operón *lac*

La estructura y el funcionamiento del operón *lac* han provocado el interés de muchos científicos en los años posteriores a la proposición del modelo del operón. En la actualidad se tiene una visión completa de todo este complejo sistema (Fig. 34.4).

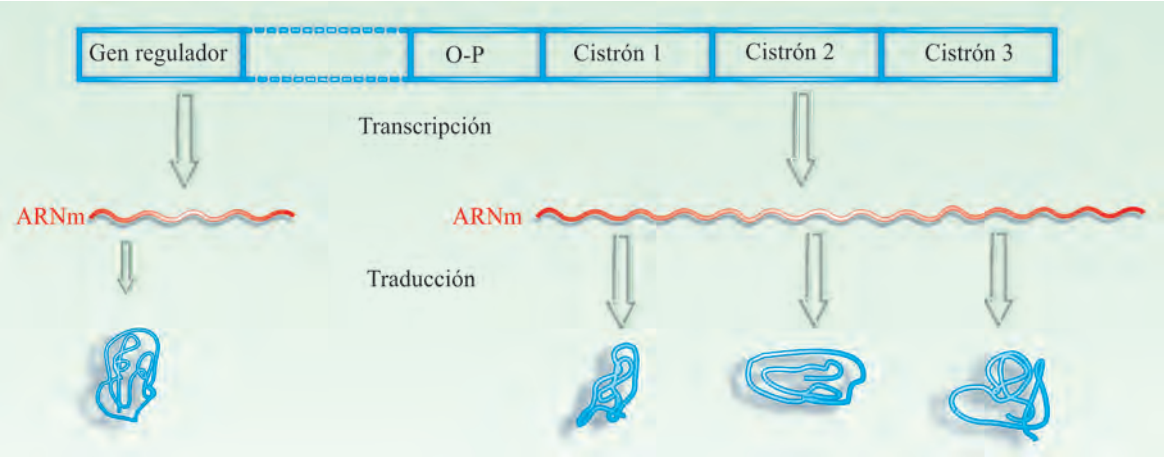


Fig. 34.3. Modelo general del operón. En el ADN se encuentran secuencias con diferentes funciones: el gen regulador que codifica a la proteína represora; la zona del operador-promotor (O-P) donde se une el represor y la ARN polimerasa, así como los genes estructurales o cistrones que codifican la síntesis de proteínas específicas (generalmente enzimas). Cada operón posee un número característico de cistrones.



Pares de bases	1 111	~70	3 060	800	800
Polipéptido	Represor	–	β-galactosida	Permeasa	Acetilasa
Peso molecular	38 000		~125 000	30 000	30 000
Números de aminoácidos	360		1 021	~275	~275
Formas activas	Tetrámero		Tetrámero	Membrana	Dímero
Y su peso	152 000		500 000	30 000	60 000

Fig. 34.4. Estructura del operón *lac*. Se muestran las principales características estructurales del operón *lac* y de sus productos.

La proteína represora tiene características similares a todos los represores conocidos, se trata de un tetrámero formado por subunidades idénticas que presenta una clara simetría molecular (Fig. 34.5).

En el promotor se encuentran las secuencias estudiadas en -35 y en la zona de -4 a -10. El operador, como era de esperar, presenta una secuencia repetida invertida con un centro de simetría, lo que concuerda con la estructura del represor (Fig. 34.5).

El represor *lac* contiene al menos dos sitios: uno de estos le permite la unión al ADN y el otro tiene como ligandos pequeñas moléculas de galactósidos que actúan como inductores. La unión del inductor al represor provoca un cambio de conformación que se trasmite a todas las subunidades, haciendo que todas adopten el estado T, cuya afinidad por el ADN del operador es muy baja. En estas condiciones el represor se disocia del operador, lo que permite la unión de la ARN polimerasa en el *locus* promotor y da inicio a la transcripción. La traducción del ARNm correspondiente da origen a las enzimas que degradan la lactosa, con lo cual la concentración del disacárido disminuye y provoca la separación del inductor. Esta separación hace que la proteína adquiera de nuevo el estado R y en esta forma se une al operador, lo que impide la unión de la ARN polimerasa (Fig. 34.6).

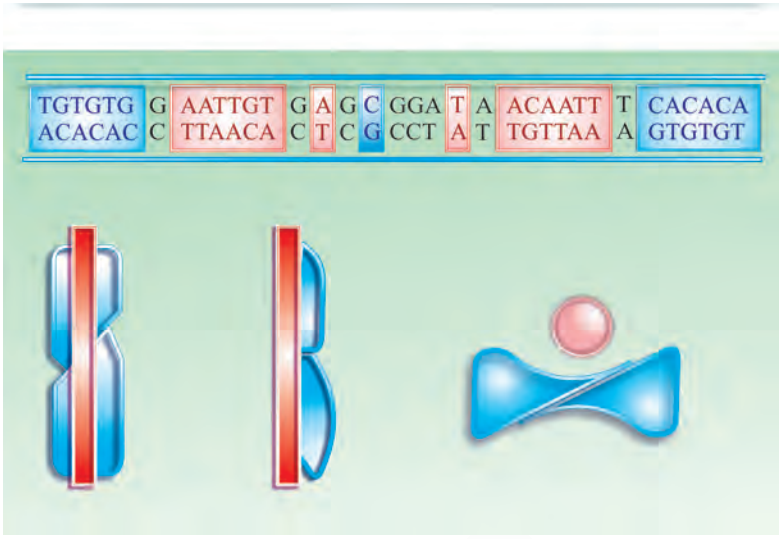


Fig. 34.5. Unión represor operador en el operón *lac*. En la parte superior se muestra la estructura primaria de la zona del operador *lac* con sus zonas de simetría a color. En la parte inferior se observan diferentes vistas del complejo formado entre el operador y el represor del operón *lac*.

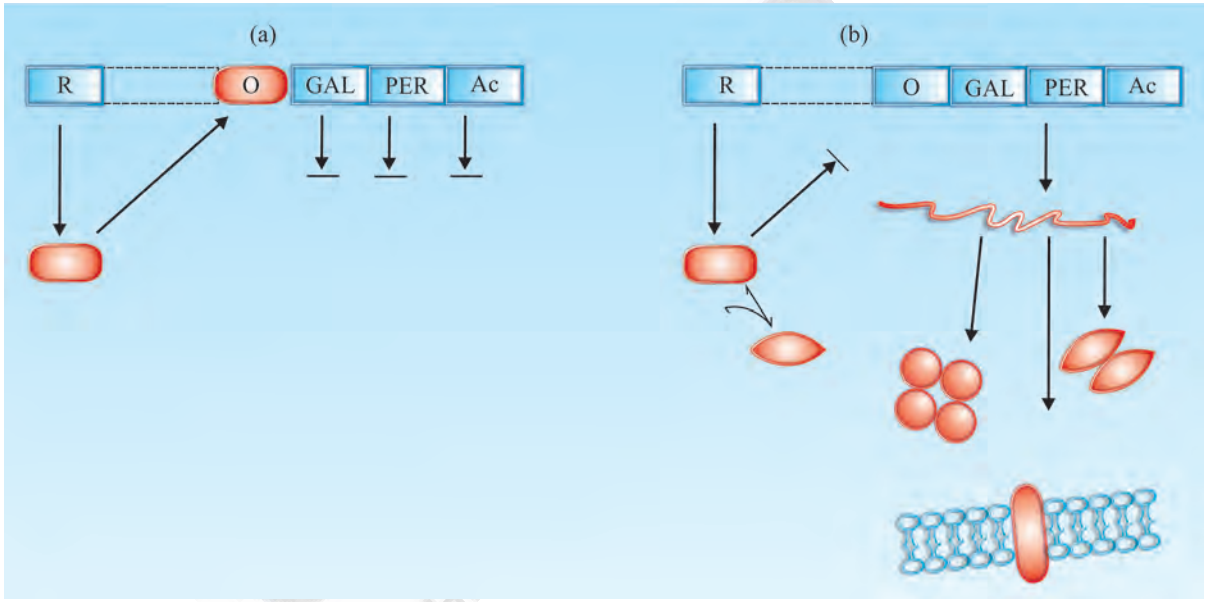


Fig. 34.6. Funcionamiento del operón *lac*. Los dos estados posibles del operón lac. (a) Ausencia de lactosa, el represor posee su conformación activa y se encuentra unido al operador, por lo que no permite la unión de la ARN polimerasa, y (b) se incorpora la lactosa que se une al represor y lo separa del operador, con lo cual permite la unión de la polimerasa y desencadena todo el mecanismo de la síntesis de la β-galactosidasa (GAL), la permeasa (PER) y la acetilasa (Ac).

Como la vida media del ARNm en procariontes es muy corta, estos solo pueden ser traducidos muy pocas veces, además, con la duplicación de las bacterias, la concentración de las enzimas disminuye rápidamente.

La presencia del inductor es la señal que conecta al sistema y su desaparición, lo desconecta; pero queda una interrogante: ¿por qué si la glucosa está presente no sucede la utilización de la lactosa? El estudio detallado del funcionamiento del operón *lac* llevó a la conclusión de que no era suficiente retirar el represor del operador para que la síntesis de enzimas comenzara, había un requerimiento adicional; con la búsqueda de este requerimiento se descubrió que una proteína específica, en su estado activo, se une al ADN en un sitio cercano al promotor y estimula la síntesis del ARNm.

Esta proteína es también del tipo alostérico, con uno de sus sitios con afinidad por el ADN en la conformación R; pero para adquirir esta conformación, es necesario que antes

esté unida a una pequeña molécula, por ejemplo, AMPc. La unión del AMPc aumenta la afinidad de la proteína por el ADN, conocida como proteína activada por catabolito (CAP del inglés, *catabolite activator protein*). La unión del complejo AMPcCAP al ADN estimula la acción de la ARN polimerasa y con ello la transcripción (Fig. 34.7).

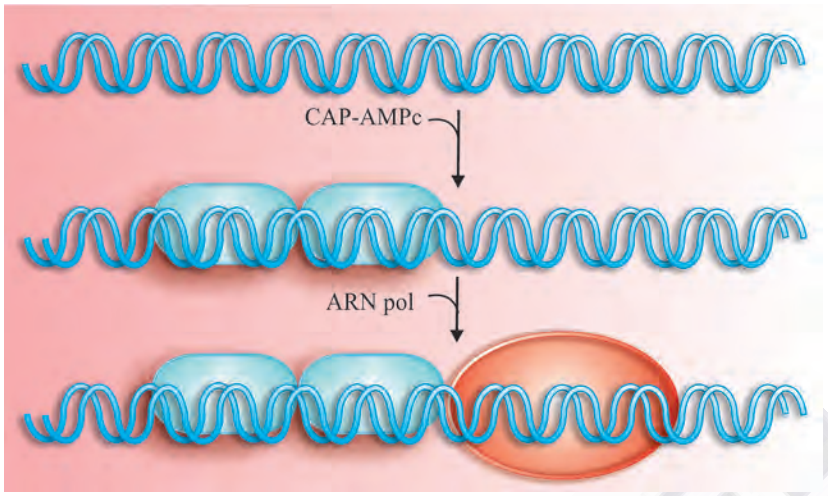


Fig. 34.7. Acción del complejo CAP--AMPc. El complejo formado por CAP (*catabolite activating protein*) y el AMPc se unen al ADN en una zona próxima al promotor y posibilitan la incorporación de la ARN polimerasa en la posición adecuada para comenzar la transcripción, siempre que la zona del operador no esté ocupada por el represor.

El sistema AMPcCAP sirve como regulador positivo de muchos operones relacionados con la utilización de distintos monosacáridos. Cuando falta la glucosa todos estos operones están en condiciones de conectarse, pero solo lo hará el que tenga su inductor presente, debido a que el sistema de transporte de la glucosa y el productor de AMPc están acoplados de tal manera que, cuando se transporta la glucosa, no puede producirse el AMPc y viceversa. De esta forma los niveles intracelulares del nucleótido cíclico son una señal que indica la ausencia del transporte de glucosa a través de la membrana y, por tanto, la célula debe estar preparada para la utilización de otro monosacárido como fuente de energía.

En resumen, cuando existe glucosa en el medio, la célula la usa como fuente de energía y de carbono, lo que disminuye los niveles celulares de AMPc; si se añade lactosa (o algún otro monosacárido) no puede utilizarse, ya que faltaría el complejo AMPcCAP, y si se retira la glucosa del medio o se consume toda la existente, los niveles de AMPc aumentan y favorecen la formación del AMPcCAP, de manera que al añadir la lactosa (u otro azúcar) se inactiva el represor y comienza la transcripción de los cistrones.

Como el represor al unirse al ADN inhibe la transcripción, se trata de un regulador negativo, pero el AMPcCAP lo que hace es activar la transcripción, luego es un regulador positivo, por tanto, en el operón *lac* (y en otros muchos) existe simultáneamente un sistema de regulación que es al mismo tiempo positivo y negativo.

Represión enzimática

Otro fenómeno relacionado con la regulación de la expresión genética surgió con el estudio de las vías biosintéticas en algunas bacterias, especialmente en *E. coli*. Esta bacteria contiene un equipo enzimático que le permite la síntesis de todos los aminoácidos, para formar sus proteínas a partir de una fuente de carbono (puede ser la glucosa) y una fuente de nitrógeno (cloruro de amonio).

Las rutas biosintéticas de algunos aminoácidos son complejas y requieren de numerosas enzimas; cuando algunos de estos aminoácidos son añadidos al medio de cultivo se produce un rápido descenso de las concentraciones intracelulares de las enzimas

relacionadas con la ruta biosintética correspondiente. Como en el caso anterior, esta disminución afecta a todas las enzimas involucradas en la ruta, se trata de una regulación coordinada. Cuando el aminoácido es retirado del medio se produce un incremento de la concentración de las enzimas; igual que en el caso de la inducción, estas variaciones se deben a cambios en la velocidad de síntesis de las enzimas y no de su actividad.

Este fenómeno, en el cual la presencia de una sustancia en el medio es capaz de provocar la inhibición de la síntesis de una enzima o grupos de enzimas, recibe el nombre de represión de la síntesis de enzimas o represión enzimática (Fig. 34.8). La sustancia que provoca la represión se denomina correpresor.

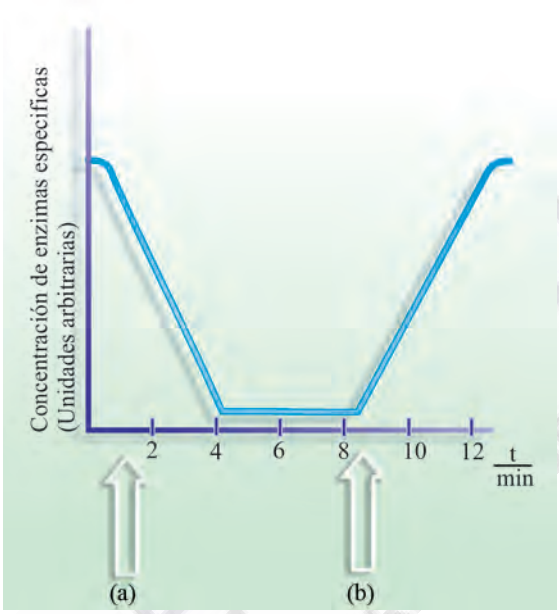


Fig. 34.8. Represión enzimática. La figura muestra los resultados de una experiencia típica de represión enzimática, donde al añadir el correpresor (a) comienza a disminuir la concentración intracelular de la enzima, que solo vuelve a aumentar al retirar el correpresor; (b) estos cambios de concentración obedecen a variaciones en la síntesis de la enzima.

Para explicar el mecanismo de la represión enzimática se utilizará el mismo modelo del operón descrito antes; se tomará como ejemplo el operón que controla la síntesis del triptófano en la *E. coli,* por ser el mejor conocido.

Operón *trp*

En la figura 34.9 se representa la estructura del operón *trp*. El gen regulador codifica la síntesis de la proteína represora, que es también una proteína alostérica con sitios específicos de unión al ADN del operador. Su unión determina la inhibición de la transcripción y con ello se suprime la síntesis de enzimas, se trata de un sistema de regulación negativa.

La diferencia con el sistema del operón *lac* estriba en que en este caso el represor se sintetiza en forma inactiva (conformación T), que presenta muy poca afinidad por el ADN.

La unión del correpresor provoca un cambio de conformación que aumenta extraordinariamente la afinidad por el ADN y favorece la unión con el operador; este correpresor resultó ser el propio triptófano.

Cuando la célula no dispone de triptófano exógeno, su concentración intracelular es tan baja que no existen posibilidades de unión con el represor y, por tanto, los genes son transcriptos de forma continua. La adición de triptófano al medio aumenta de manera brusca su concentración intracelular, favorece su unión al represor y con ello la inhibición de la transcripción. La utilización intracelular del triptófano disminuye su concentración, se vuelve a la situación inicial (Fig. 34.10).

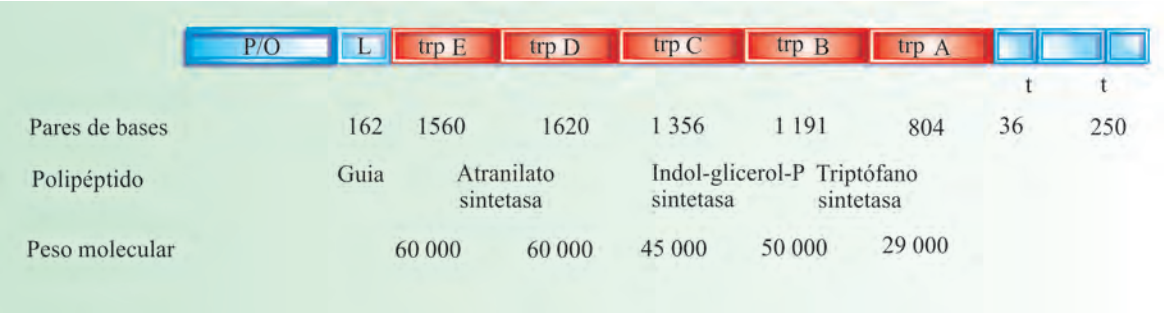


Fig. 34.9. Estructura del operón *trp*. En la figura se muestran las principales características estructurales del operón *trp* y de sus productos. La zona operador-promotor (P/O) no está bien caracterizada. Los 162 nucleótidos que componen la zona guía (L) contienen la secuencia del atenuador. Los genes E y D codifican las dos subunidades de la atranilato sintetasa, y los A y B las subunidades de la triptófano sintetasa. Los sitios t son terminadores, de los cuales existen dos al final del operón.

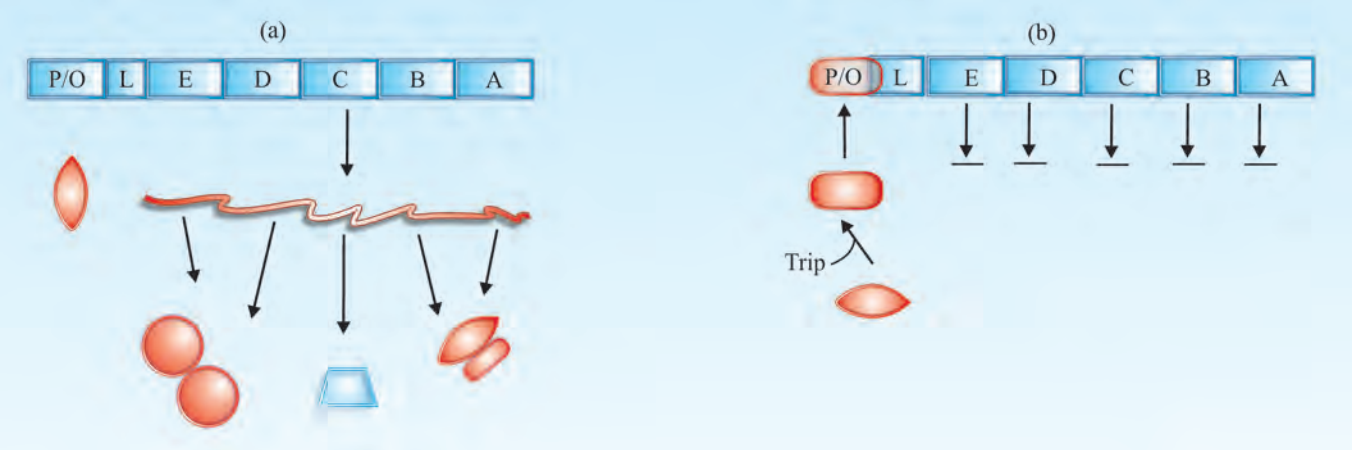


Fig. 34.10. Funcionamiento del operón *trp*. El operón *trp* funciona de acuerdo con la disponibilidad del triptófano. Cuando no existe triptófano en el medio celular (a), el represor es inactivo y no puede unirse al operador, lo cual permite que se realice la transcripción de los genes del operón. La incorporación del triptófano, que actúa como correpresor, cambia la conformación del represor a su forma más activa, que se une al ADN del operador y bloquea la síntesis del ARNm correspondiente.

Existen varios operones represibles bien estudiados y en líneas generales concuerdan con el presentado en este texto, aunque, como era de esperar, tienen algunas características específicas.

Mecanismo de atenuación

Las enzimas que sintetizan triptófano se someten a un segundo tipo de control, en el cual la traducción desempeña una función fundamental. En *E. coli* y otras bacterias, la transcripción y la traducción suelen ocurrir de manera simultánea.

Como se observa en la figura 34.9, entre el operador y el primer cistrón existe una zona designada con la letra L, que corresponde con la zona no traducible del ARNm en su extremo 5'-P; lo sorprendente de este sistema es que, en este caso, esa zona sí se traduce en un péptido de 13 aminoácidos, denominado péptido guía.

¿Cuál es la función de este péptido? La respuesta está en su secuencia de aminoácidos, que incluyendo la metionina iniciadora es:

MetLysAlaIlePheValLeuLysGlyTrpTrpTyrTyrSer

Se observa la presencia de dos *trp* consecutivos en la secuencia. La secuencia conductora del ARNm puede formar estructuras alternativas por apareamiento de bases (Fig. 34.11).

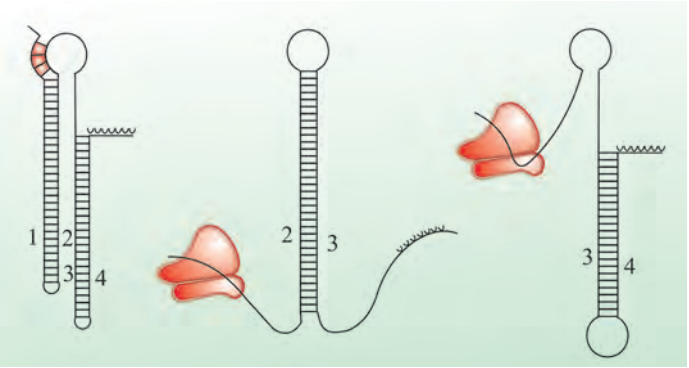


Fig. 34.11. Mecanismo del atenuador. La zona guía del ARNm del operón *trp* puede formar diferentes apareamientos de bases entre las regiones 1 y 2, así como las 3 y 4. Si no hay triptófano disponible, el ribosoma se atasca en la zona 1 y permite el apareamiento 2-3 que facilita a su vez que la transcripción continúe; pero si existe triptófano abundante, el ribosoma pasa rápidamente por la zona 1 y se forma el apareamiento 3-4, que constituye una estructura de terminación para la transcripción.

En el primer caso la zona 1 forma pares de bases con la 2, y la zona 3 con la 4. El apareamiento de las zonas 3 y 4 seguidas de un poli U constituye la estructura esencial para la terminación de la transcripción (capítulo 27).

En el segundo caso, solo se forma apareamiento de bases entre las zonas 2 y 3, por lo que la estructura para la terminación no puede formarse, ambos tipos de estructuras apareadas son excluyentes y solo la formación del apareamiento 3-4 origina la terminación.

¿Qué hace que se forme un tipo de estructura u otra? Recuérdese que en el péptido guía existen dos codones consecutivos para el triptófano.

El triptófano es un aminoácido de los menos abundantes en la *E. coli*; de la concentración intracelular de triptófano depende la formación del triptofanil-ARNt correspondiente.

Es conveniente hacer un análisis por separado de cómo funciona el sistema cuando existe una elevada concentración de triptófano en la célula y qué sucede cuando está baja la concentración; para este análisis se debe olvidar por un momento el mecanismo de represión.

El ARNm del operón *trp* comienza a ser leído por el ribosoma. Al llegar al péptido guía, como la concentración de triptófano es elevada, estos codones son leídos sin dificultad y el ribosoma avanza a su velocidad normal, sobrepasando las zonas 1 y 2 del ARNm conductor; como la zona 2 no puede formar pares de bases con la 3, esta forma apareamiento con la zona 4 y se constituye la estructura necesaria para la terminación de la transcripción.

Por tanto, a elevadas concentraciones intracelulares de triptófano, en caso de que la transcripción se inicie, esta termina antes de que comience la transcripción de los cistrones. A bajas concentraciones intracelulares de triptófano, cuando el ribosoma llega a la síntesis del péptido guía, su movimiento se "atasca", pues no hay *trp*ARNt disponible. Esta reducción evidente en la velocidad del ribosoma provoca un secuestro de la zona 1, pero deja libre la 2 que forma pares de bases con la zona 3. La formación del brazo 2-3 impide la formación del apareamiento 3-4 y, al no producirse esta estructura, la transcripción continúa (Fig. 34.11). A la secuencia de bases que origina la estructura de terminación en la zona conductora se le conoce como secuencia atenuadora y es por ello que el mecanismo recibe el nombre de atenuación.

En el caso de estas enzimas existe un doble mecanismo de control: al nivel del represor y al nivel del atenuador; es posible que en determinados momentos uno de estos no funcione, pero siempre existe la seguridad del funcionamiento del otro. El sistema del atenuador ha resultado ser más general de lo que se pensaba, ya han aparecido varios estudios de secuencias de péptidos guías para diferentes sistemas, incluso, el sistema genético que controla la síntesis de las enzimas relacionadas con la síntesis del aminoácido histidina se controla solo por el mecanismo de atenuación.

Eficiencia del promotor

Las enzimas que no son inducibles ni reprimibles y por tanto su concentración celular es prácticamente constante a lo largo de todo el ciclo celular, reciben el nombre de enzimas constitutivas. El hecho de que su concentración intracelular no varíe con el tiempo, indica que su síntesis sucede de forma continua; en estos casos, la transcripción es ininterrumpida, ya que la vida media de los ARNm es muy corta, es de esperar entonces que todas las enzimas constitutivas estuviesen a la misma concentración; pero esto no ocurre realmente, lo que se mantiene constante a lo largo del tiempo es la proporción entre las distintas enzimas constitutivas, aunque cada una de estas presenta su concentración característica.

La clave del problema está en que no todos los promotores funcionan con igual eficiencia. Existen los promotores fuertes, que se transcriben con más facilidad mayor número de veces durante el ciclo celular. Debido a los factores relacionados con su estructura, existe elevada afinidad entre la ARN polimerasa y las secuencias específicas del promotor. La unión de la enzima con el ADN origina rápidamente un promotor abierto de elevada estabilidad y la transcripción es inmediata. En otros casos los promotores son débiles, se transcriben muy poco. La afinidad de la ARN polimerasa es muy baja por el promotor, y la formación de un promotor abierto estable es un evento poco frecuente, solo en los casos en que esto ocurre se logra la transcripción.

Por supuesto, pueden darse todas las situaciones intermedias; cada promotor funciona como promedio un número fijo de veces por unidad de tiempo –característica de cada uno de ellos– la concentración de cada enzima dependerá de esta, sin embargo, la relación de concentraciones se mantiene invariable.

Regulación postranscripcional

Este tipo de regulación, aun cuando es posible, es al parecer mucho menos frecuente. Existen pocos casos esclarecidos donde la regulación se exprese por variaciones en el mecanismo de la traducción, una vez formado el ARNm correspondiente.

El caso más esclarecido es la regulación de la síntesis de las proteínas que forma parte de los ribosomas en los procariontes, como se vio en el capítulo 29, se encuentran organizados en siete operones.

Es necesario recordar que estos organismos carecen de envoltura nuclear y por ello la transcripción y la traducción están vinculadas directamente. Para formar los ribosomas son necesarias las síntesis de los ARNr y de las diferentes proteínas, por lo que debe ocurrir la transcripción de los ARNm correspondientes a cada uno de los operones y su posterior traducción.

Como cada tipo de ARNr se une a un grupo específico de proteínas durante el proceso de autoensamblaje del ribosoma, debe existir una adecuada proporción entre el número de ambos tipos de moléculas. Cuando se ensamblan muchos ribosomas, el número de ARNr empieza a disminuir y puede existir superproducción de proteínas ribosomales, las proteínas que controlan la expresión de cada uno de los operones se unen al ARNm correspondiente, impidiendo la traducción. Solo si aparecen más moléculas de ARNr puede continuar la traducción, de lo contrario, esta se mantiene inhibida (Fig. 34.12).

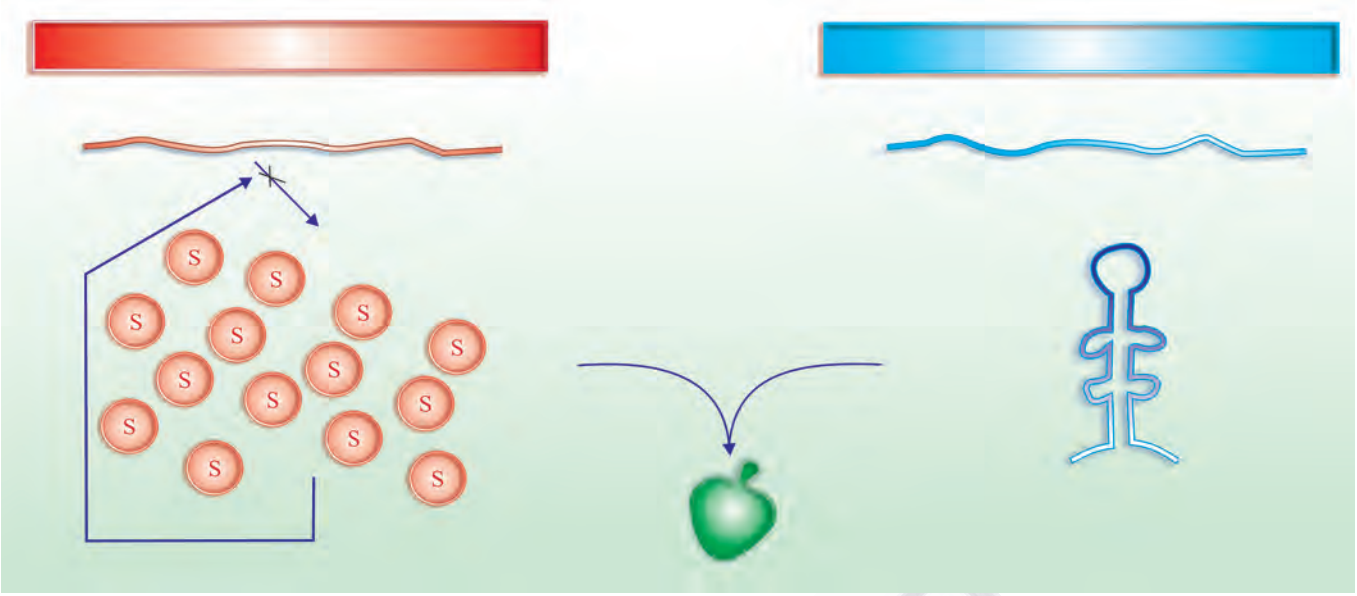


Fig. 34.12. Regulación de la síntesis de proteínas ribosomales. Para la formación de los ribosomas se requiere la síntesis de los ARNr y las proteínas en la proporción adecuada. Si se produce un exceso de proteínas, estas se combinan con su propio ARNm e inhiben la traducción.

Regulación de la expresión de la información genética en eucariontes

Los sistemas reguladores eucariontes pluricelulares son algo diferentes a los procariontes. La existencia de la membrana nuclear hace al ADN menos sensible a los cambios que ocurren en el citoplasma y en el medio. Los requerimientos de las células en organismos pluricelulares son muy diferentes de los procariontes. Las células embrionarias, por ejemplo, se multiplican rápidamente, en tanto las células del organismo adulto en ocasiones solo requieren nutrientes para su mantenimiento, ya que se dividen en casos excepcionales o no se dividen en absoluto.

Hace 20 años los estudios en eucariontes se dificultaban por no existir técnicas que produzcan y aíslen mutantes, separen y manipulen genes, así como extraer y purificar moléculas de ARNm específicas. En estos aspectos se ha avanzado mucho en los últimos años, gracias a la introducción de los procedimientos de la tecnología del ADN recombinante. Por otra parte, la dilucidación de algunos mecanismos reguladores de la expresión genética en eucariontes indica que son numerosas las formas en que este fenómeno se realiza.

Las características de la organización del genoma de los eucariontes, la existencia de la cromatina, la elevada proporción de secuencias no codificantes, la existencia de mecanismos que permiten el reordenamiento de los genes eucariontes y la misma estructura del gen, contribuyen a aumentar las dificultades en el estudio de sus mecanismos de regulación.

Como en el caso de los procariontes, la regulación se ejerce al nivel pretranscripcional, transcripcional y postranscripcional. Se estudiarán ejemplos relevantes de cada uno.

Regulación pretranscripcional

Un primer nivel de regulación está determinado por la selección de los genes que deben transcribirse en un momento dado en cada célula. Por lo tanto el primer nivel de

regulación viene dado por los mecanismos que facilitan o dificultan el acceso a los promotores de la maquinaria de transcripción. A la información contenida en la secuencia de bases del ADN y que codifica, directa o indirectamente, las moléculas que una célula u organismo puede formar en un momento de su vida, se superpone otro tipo de información que está asentada en las modificaciones de las bases del ADN, de las proteínas que forman la cromatina y de la organización tridimensional de esta. A estas modificaciones se les ha denominado epigenéticas, de las cuales algunas son heredables y constituyen la herencia epigenética. Existen, al menos, tres tipos de mecanismos epigenéticos interrelacionados: la metilación del ADN, la impronta genómica y la modificación de las histonas.

Metilación del ADN. Las diferencias en el estado de metilación del ADN se han relacionado con la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y el desarrollo embrionario. La metilación del ADN se ha vinculado con síndromes del desarrollo del sistema nervioso, como el síndrome de Rett y el de frágil X. Por lo tanto, la metilación del ADN y las proteínas que la realizan y median sus efectos son de crucial importancia en el desarrollo, las enfermedades genéticas y el cáncer.

La metilación del ADN es importante para la represión genética en mamíferos, en los cuales dicha modificación está dirigida hacia la citosina del dinucleótido CpG y en menor medida a CpA. El patrón de metilación del ADN genómico no está distribuido al azar. Más bien regiones discretas, incluyendo la mayoría del ADN repetitivo y parásito, están hipermetiladas, mientras otras regiones como los islotes CpG, a menudo asociadas con regiones de regulación génica, están hipometiladas. No todos los dinucleótidos CpG son metilados, por lo tanto debe existir alguna señal que indique cuáles sí y cuáles no.

La metilación del ADN es un proceso complejo, realizado por las ADN metil transferasa, DNMT. Este proceso reprime genes por medio de varios mecanismos, reclutamiento de proteínas con el dominio de unión a metil-CpG, MBD (del inglés, *methyl CpG binding domain*) que reconocen selectivamente los CpG metilados y pueden reclutar proteínas represoras o también porque la metilación impide la unión de proteínas a secuencias de ADN que presenten la citosina metilada (Fig. 34.13).

La metilación del ADN contribuye a la información epigenética que regula la expresión de los genes, especialmente durante el desarrollo, pero las instrucciones para esa regulación no se encuentran en la secuencia de bases del ADN, sino en marcas que se hallan por encima de esta y por lo tanto son epigenéticas.

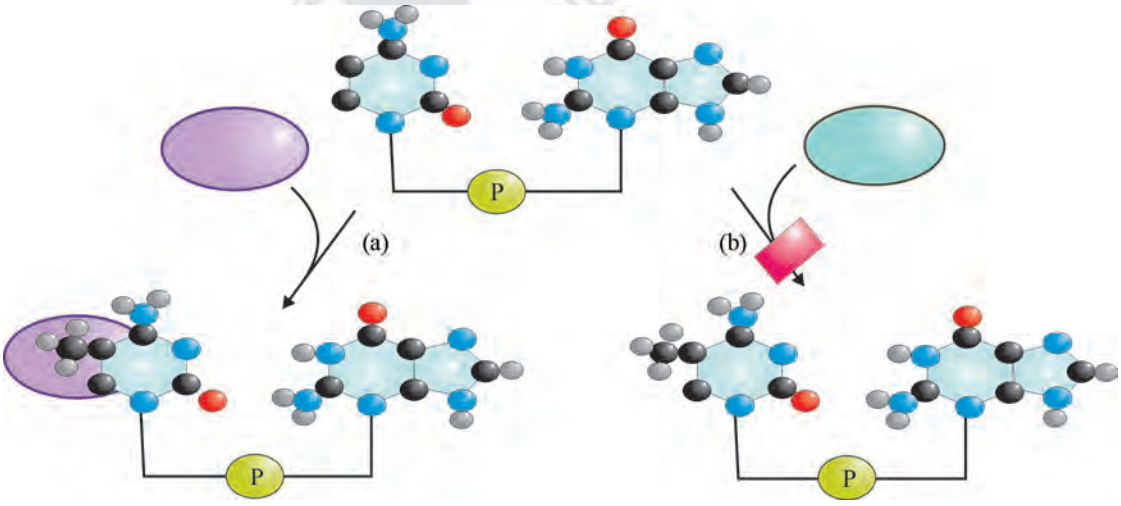


Fig. 34.13. Metilación del ADN. El ADN es metilado en la posición 5 de la citosina que forma parte del dinucleótido CpG. Esta metilación puede traer como consecuencias que proteínas específicas se unan a la citosina metilada (a) o bien que no puedan unirse porque el grupo metilo representa un obstáculo para la unión, y (b) en cualquiera de los dos casos los efectos son de regulación de la expresión de genes.

Impronta genómica. El término impronta genómica en los mamíferos se refiere al hecho de que secuencias idénticas del ADN son tratadas de una forma diferente por la maquinaria de transcripción celular, sencillamente debido a que son heredadas del padre o de la madre. La impronta genómica es un mecanismo epigenético de actuación en *cis* que resulta de la expresión específica parental de unas pocas decenas de genes de nuestro genoma.

La impronta genómica produce en los mamíferos un alto riesgo para las enfermedades genéticas complejas, porque una mutación en uno de los alelos puede dar como resultado la ausencia de uno o más productos génicos que pueden conducir a síndromes muy conocidos como el Beckwith-Wiedemann, el Prader-Willi y el Angelman.

El grupo mejor estudiado de genes marcados se ubica en el cromosoma 15 (PWS/ /AS), donde se han localizado los síndromes Prader-Willi y Angelman. Es por esta razón que dicha región se ha estudiado intensamente, sobre todo en los seres humanos. El PWS/AS es un grupo grande, que se localiza en la región del cromosoma humano 15q12, 15q11-q13.

En los seres humanos, el fallo en el establecimiento correcto de la impronta en este grupo da lugar a la aparición de dos síndromes. La causa más frecuente de estos síndromes es cuando, por accidentes en la gametogénesis, el cigoto se forma con dos cromosomas 15, provenientes del mismo progenitor. Este fenómeno se denomina isodisomía uniparental. El Prader-Willi se debe a la pérdida de la expresión de los genes paternos y el Angelman, de los maternos (Fig. 34.14).

Modificación de las histonas. Las histonas experimentan un grupo considerable de modificaciones postraduccionales que al parecer tienen implicaciones sobre la expresión de los genes. Este amplio grupo de modificaciones les confiere un potencial enorme para respuestas funcionales, pero es bueno señalar que no todas las modificaciones están presentes en la misma histona, en el mismo tiempo. El momento de aparición de una modificación específica depende de la existencia de señales dentro de las células.

Estas modificaciones son dinámicas y cambian rápidamente. Muchas aparecen y desaparecen en cuestión de minutos, con posterioridad a la llegada del estímulo a la superficie celular. Por lo tanto, el análisis de las modificaciones en un momento y bajo condiciones específicas solamente identificaría una fracción de las modificaciones posibles.

Las modificaciones de las histonas operan por dos mecanismos sobre la expresión de los genes: en un caso se produce la disrupción de los contactos entre nucleosomas, que permite el descubrimiento del ADN, y en otro por el reclutamiento de proteínas no histonas hacia la cromatina, este caso es el mejor caracterizado. Las modificaciones permiten el reclutamiento de proteínas o bien no permiten la interacción de otras proteínas con la cromatina. Este reclutamiento se justifica por el hecho de que los procesos donde interviene el ADN requieren de un orden en la incorporación de los diferentes participantes.

La mayoría de las modificaciones se realizan en las colas N-terminal de las histonas que forman parte de los nucleosomas, pues estas no tienen una estructura secundaria y contienen numerosos residuos de lisina, arginina, glutámico, serina y treonina, susceptibles de metilación, acetilación, fosforilación, etc. Se ha postulado la existencia de un "código histona" que se origina por combinaciones de estas modificaciones en una o varias histonas sobre el nucleosoma y la existencia de proteínas capaces de descifrar el código y desencadenar efectos específicos.

Para referirse a las modificaciones de las histonas se emplea una nomenclatura que consiste en tres símbolos: primero se escribe la histona que es modificada; segundo, el residuo blanco de la modificación utilizando el código de una letra de los aminoácidos, y tercero, una abreviatura que identifica al grupo añadido. Así, la adición de un grupo acetilo a la lisina 5 (el símbolo de la lisina es K) de la histona H4, se representa como H4K5ac.

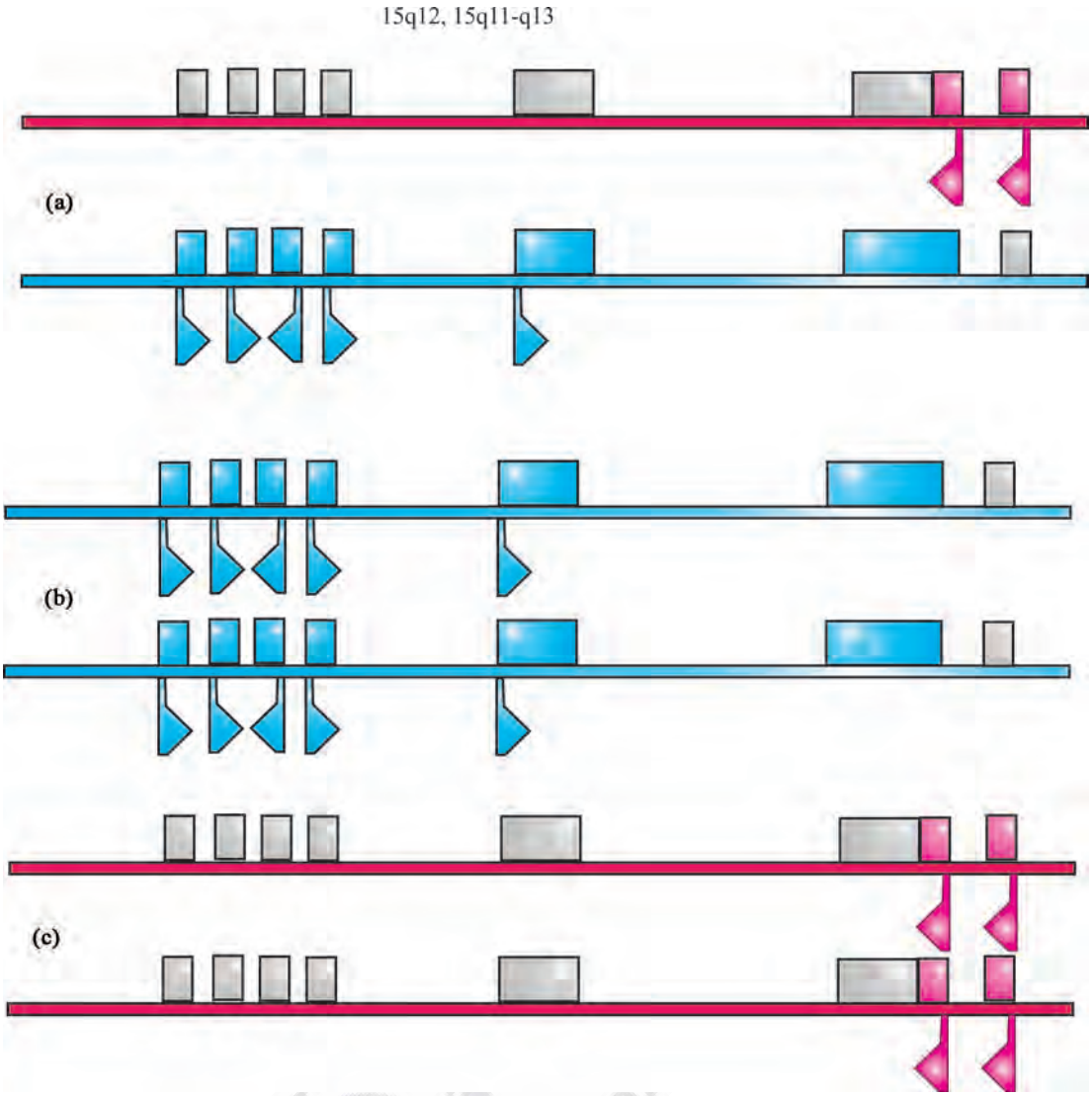


Fig. 34.14. Impronta genómica. En la región cromosómica 15q12-15q1-q13 existe un grupo de impronta. El grupo de origen paterno aparece en azul y el materno, en rosado. Los genes que tienen el color correspondiente son los que se expresan. Se observa que del par de alelos solo uno de estos es expresado. En (a) se representa la situación normal; en (b) se han heredado los dos grupos del padre, lo que da como resultado la aparición del síndrome de Angelman, y en (c) los dos grupos provienen de la madre y será la causa del síndrome de Prader-Willi.

La acetilación y la desacetilación han sido las modificaciones más caracterizadas en cuanto a su efecto sobre el acceso al ADN. Las lisinas acetiladas pueden disminuir las interacciones entre las histonas y el ADN, y facilitar el acceso al ADN de las proteínas de la transcripción. La hipoacetilación trae como resultado la disminución del espacio entre el nucleosona y el ADN que está enrollado a su alrededor. Esta unión más firme disminuye la accesibilidad para los factores de transcripción y conduce a la represión de la transcripción. En líneas generales, la acetilación de las histonas favorece la expresión génica, en tanto que la desacetilación es un factor desfavorable para esta.

Las histonas pueden ser metiladas en residuos de lisina y arginina, cada uno de los cuales tiene un significado diferente. Tres sitios de metilación (K3K4, H3K36 y H3K79) se relacionan con la activación de la transcripción y dos de estos (H3K4 y H336) con la elongación. Asimismo existen tres sitios (H3K9, H3K27 y H4K20) relacionados con la represión. La metilación de argininas específicas en H3 y H4 se relaciona con el estado activo de la transcripción. La metilación en H4R3 facilita la acetilación de H4 y potencia la activación de la transcripción por receptores hormonales nucleares.

El resto de las modificaciones no han sido lo suficientemente estudiadas para conocer sus efectos sobre la expresión de la información genética. En la figura 34.15 se muestra un resumen de las modificaciones principales que experimentan las histonas.

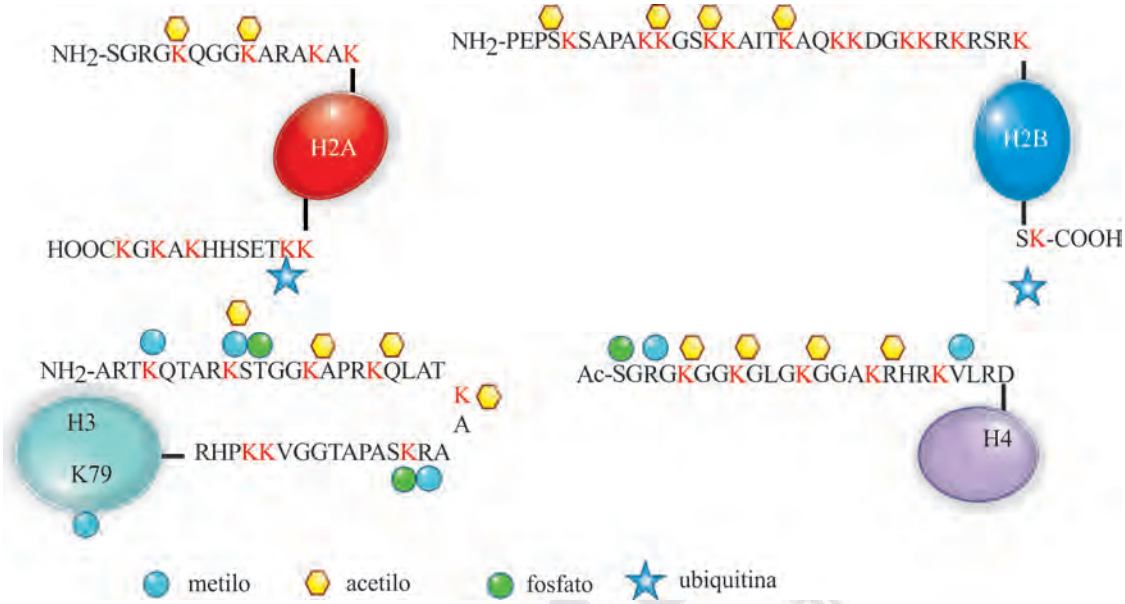


Fig. 34.15. Modificaciones de las histonas. Se presenta un resumen de las principales modificaciones en las histonas que forman el núcleo del nucleosoma. No todas aparecen simultáneamente, pero sí están relacionadas con la expresión de los genes que se encuentran en su vecindad.

Regulación transcripcional

El nivel más estudiado es el transcripcional, especialmente el de la ARN polimerasa II que sintetiza los ARNm. El promotor de estos genes es complejo y presenta una estructura modular con dos tipos de elementos principales. Cerca del sitio de iniciación de la transcripción se encuentra el elemento central del promotor, que en muchos casos contiene la secuencia consenso TATAAT y es el sitio de unión de los factores generales de transcripción (capítulo 27). Más hacia la izquierda estos promotores contienen varias secuencias denominadas elementos distales del promotor, que también constituyen sitios de unión de proteínas y son diferentes para los distintos genes transcriptos por la ARN polimerasa II. La unión a estos sitios de proteínas específicas en unos casos origina el incremento de la transcripción, o sea, ocurre el fenómeno de la inducción, mientras que en otros hay decremento de la intensidad del proceso, que implica represión. A diferencia de los procariontes, donde los nutrientes son esenciales en la regulación, en los organismos superiores las sustancias determinantes son mensajeros químicos como las hormonas, que por variados mecanismos favorecen la unión de esos factores de transcripción génico-específicos a sus sitios correspondientes; así, la insulina favorece la unión de una proteína específica en el gen de la glucoquinasa en el hígado y en las células β del páncreas, lo que induce la síntesis de esta enzima.

La complejidad del promotor permite que a este se unan proteínas que pueden tener efectos contrarios sobre la transcripción, cuando esto sucede una de ellas es dominante sobre la otra; por ejemplo, el gen de la fosfoenolpirúvico carboxiquinasa del hígado contiene dos sitios de unión para el receptor del cortisol, que actúa como un factor génico específico y estimula la transcripción del gen. Más hacia la izquierda, también presenta un sitio de unión para la proteína activada por la insulina, esta unión inhibe la transcripción. Cuando las dos proteínas se encuentran unidas se produce la inhibición del proceso, lo cual significa que la acción de la insulina es dominante sobre la del cortisol.

Un ejemplo claro es la regulación de la expresión de la información genética por el adenosín-monofosfato cíclico (AMPc). La estimulación de las células por hormonas, como el glucagón, activa a la enzima adenilato ciclasa que cataliza la conversión de ATP en AMPc, la que a su vez activa a la proteína quinasa A. La subunidad catalítica de esta enzima es transportada al núcleo, donde fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc CREB (del inglés, *cAMP response element* [CRE] *binding protein*), que actúa como un factor de transcripción génico específico que tiene bajo su control varios genes cuyos productos intervienen en el metabolismo celular. La activación de CREB se muestra de manera esquemática en la figura 34.16.

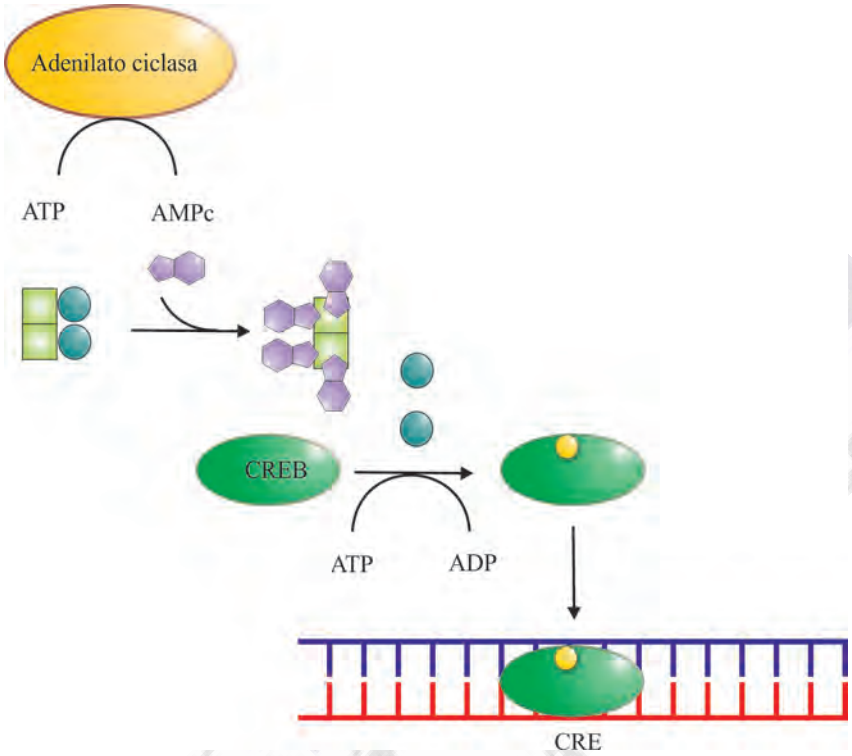


Fig. 34.16. Regulación transcripcional. El AMP cíclico (AMPc) se forma como respuesta a diferentes estímulos en una reacción catalizada por la adenilato ciclasa. El AMPc actúa sobre la proteína quinasa A, formada por dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C), lo que hace que se disocien y se activen las subunidades catalíticas que fosforilan a CREB que se une al elemento de respuesta al AMPc (CRE) en el ADN y regula la expresión de numerosos genes.

Regulación postranscripcional

Se ha sugerido la existencia de mecanismos de control en el procesamiento de los ARNm, pues algunas de las proteínas que intervienen en el proceso están sometidas a ciclos de fosforilación y desfosforilación, sin embargo, los mecanismos no están totalmente dilucidados. También se ha señalado que puede ser un punto de control el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma.

Una vez en el citoplasma, el ARNm se une a proteínas y se mantiene almacenado hasta el momento de la traducción. Algunos ARNm presentan secuencias específicas a las cuales se unen proteínas reguladoras que estimulan o inhiben la traducción, según sea el caso; el ejemplo más conocido es el de los ARNm de proteínas que están relacionadas con el metabolismo del hierro.

Un componente esencial en el control de la traducción es la proteína quinasa blanco de la ripamicina en mamíferos, mTOR (del inglés, *mammalian tanget of ripamicin*). Se trata de una proteína quinasa controlada por la disponibilidad de nutrientes, especialmente de la leucina. Cuando se activa, esta quinasa fosforila a la proteína de unión al eFI-4E (ver capítulo 30) y propicia su disociación del eFI-4E que se une al casquete para dar inicio a la síntesis de proteínas. Esta quinasa también se puede activar como respuesta a la insulina y los factores de crecimiento. En la figura 34.17 se presenta un resumen del mecanismo de mTOR.

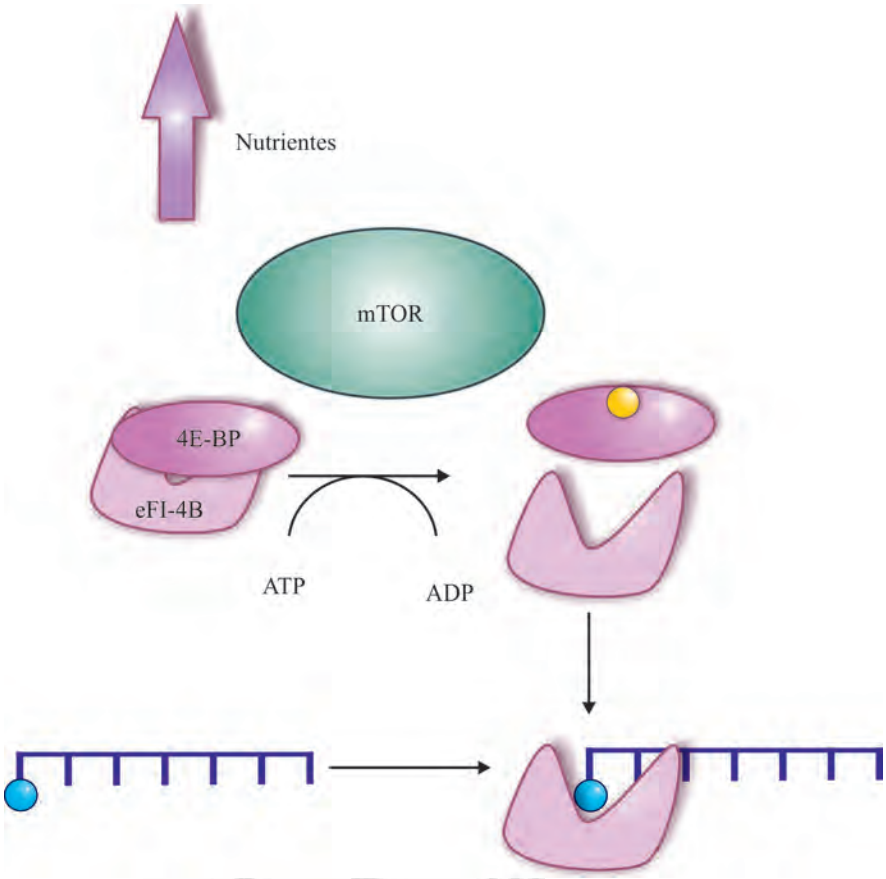


Fig. 34.17. Regulación postranscripcional. Ante la disponibilidad de nutrientes se activa la quinasa mTOR que fosforila a la proteína de unión al eFI-4E (4E-BP) haciendo que se separe de este y se una al casquete del ARNm y facilitar así el inicio de la traducción.

Por otra parte, son numerosos los factores de traducción que sufren ciclos de fosforilación-desfosforilación durante la vida celular y esto puede indicar que están sometidos a mecanismos de regulación.

Existen mecanismos que regulan el destino final de las proteínas sintetizadas. Todos los estudios realizados señalan que las proteínas contienen secuencias específicas de aminoácidos o estructuras tridimensionales típicas que indican su lugar de destino: el citosol, el núcleo, los organitos citoplasmáticos o el espacio extracelular.

Todos estos mecanismos están bajo intensas investigaciones y es de esperar que en los próximos años se pueda contar con una visión mucho más aproximada de los mecanismos que regulan la expresión de la información genética en los organismos superiores, especialmente en el hombre.

Resumen

La dependencia manifiesta que existe entre los organismos vivos y el medio donde se desarrollan trae aparejada la necesidad de la existencia de mecanismos de regulación de la expresión de la información genética, que permite la adaptación del complejo metabólico celular a los cambios constantes del medio. Estos mecanismos difieren de acuerdo con el tipo de organismo que se trate, ya que pueden estar expuestos a mayores o menores variaciones de las características del medio, sobre todo respecto a la obtención de nutrientes.

En general estos mecanismos de regulación se caracterizan por la síntesis de una proteína específica, solo en el momento que es necesaria; la inhibición de actividades enzimáticas que representan mayor gasto de energía o mayor producción de desechos y

vías productoras, con mayor cantidad de energía metabólica en tiempos menores. Otra característica relevante es la existencia de la regulación coordinada que permite ejercer de manera simultánea el mecanismo sobre varias enzimas que intervienen en la misma secuencia metabólica.

La regulación de la expresión genética se puede realizar en tres niveles fundamentales: pretranscripcional, transcripcional y postranscripcional. El primero está poco estudiado en procariontes.

El nivel transcripcional se refiere a los mecanismos que actúan directamente, estimulando (positivo) o inhibiendo (negativo) la síntesis de los ARNm. En los procariontes existen dos variantes: la inducción y la represión enzimáticas. También el mecanismo de atenuación.

La inducción enzimática se caracteriza porque la presencia de una sustancia (inductor) estimula la síntesis de proteínas específicas; en la represión, la presencia de determinada sustancia (correpresor) provoca la inhibición de la síntesis de proteínas, también específicas. Estas dos situaciones recibieron una explicación molecular con la aparición del modelo del operón, según el cual en el ADN celular se pueden distinguir diferentes sectores funcionales: el gen regulador, el promotor, el operador y los genes estructurales (cistrones).

El gen regulador codifica la proteína represora que se une al operador y bloquea la síntesis de los ARNm. La interacción del represor con moléculas pequeñas puede hacer que este se separe del operador (inducción) y con ello se comience la síntesis de ARNm, o por el contrario puede ser necesaria esa interacción para que el represor pueda unirse al operador (represión), con lo cual la síntesis de ARNm se inhibe.

La atenuación se caracteriza por la existencia de una zona del ARNm, denominada guía (leader), que contiene varios codones para un aminoácido determinado; si al traducirse esa zona el aminoácido está abundante en la célula, la transcripción se inhibe; en caso contrario continúa.

Muchos operones de inducción requieren, además, la participación del complejo CAP-AMPc para poder funcionar aún en presencia del inductor.

El ejemplo más sobresaliente de regulación postranscripcional en procariontes es la síntesis de proteínas ribosomales, las cuales actúan como inhibidores de su propia formación.

La regulación de la expresión genética en los eucariontes pluricelulares resulta mucho más compleja que en los unicelulares.

La regulación pretranscripcional se basa fundamentalmente en los mecanismos que determinan el acceso al ADN de la maquinaria molecular de la transcripción. Existen tres mecanismos fundamentales que por no modificar la secuencia de bases del ADN se conocen como epigenéticos. Estos son la impronta genómica, la metilación del ADN y la modificación de las histonas. La impronta genómica es el mecanismo por el cual existe la expresión monoalélica de un gen, en dependencia de si ha sido heredado del padre o de la madre. La metilación del ADN crea sitios específicos que pueden facilitar o dificultar la unión de proteínas reguladoras al ADN. Las histonas pueden ser modificadas de múltiples maneras. Unas modificaciones facilitan el reclutamiento de proteínas que favorecen la transcripción, mientras que en otros casos esas proteínas constituyen un impedimento para el proceso.

La regulación transcripcional está muy relacionada con el estado de la cromatina. De esta forma la mayor parte de las unidades de transcripción se encuentra en la eucromatina, la cual se transcribe de forma activa, mientras la heterocromatina apenas lo hace. Los genes transcritos por la ARN polimerasa II presentan promotores complejos que permiten la unión no solo de los factores generales de transcripción, sino, además, de factores génicos específicos que unas veces estimulan el proceso y otras veces lo

inhiben. La activación o la inhibición de la expresión de los genes eucariontes se realiza por mecanismos totalmente diferentes a la inducción y represión de los procariontes. En ocasiones, un mismo gen puede estar bajo el efecto de varios factores de transcripción (activadores e inhibidores), cuya combinación ejerce un fino control sobre su expresión. También parecen ser puntos de control el procesamiento del ARNm y su transporte hacia el citoplasma.

La regulación postranscripcional se realiza mediante el control de la traducción (ver capítulo 30). Varias proteínas no ribosomales se modificadan como respuesta a diferentes estímulos. Estas modificaciones pueden influir no solo en la velocidad del proceso, sino además en la selección del ARNm que debe ser traducido.

Los estudios que se realizan en la actualidad auguran que en los próximos años se tendrá una información más detallada de los mecanismos de regulación de la expresión genética en los organismos superiores, sobre todo en el hombre, tal vez ello pueda contribuir a su bienestar y felicidad.

Ejercicios

1. ¿Qué repercusión podría tener sobre el mecanismo de regulación del operón *lac*, una mutación en el gen regulador que produzca una modificación en la conformación de la proteína represora? Discuta, por lo menos, dos posibilidades.
2. ¿Cómo se podría afectar el funcionamiento del operón *lac*, si ocurriera una mutación en la zona del operador-promotor? Discuta, al menos, tres posibilidades.
3. ¿Cómo repercutiría sobre el funcionamiento del operón *lac* una mutación que diera origen a la aparición de un codón de terminación en la zona central del cistrón de la β-galactosidasa?
4. ¿Qué características debe poseer una sustancia para poder actuar como inductor gratuito de un operón determinado?
5. Si en la zona guía del ARNm del operón *trp* ocurriera una mutación, que diera lugar a la aparición de un tercer codón para el triptófano, ¿influiría esto en la sensibilidad del mecanismo de atenuación a los cambios de concentración del aminoácido en la célula?
6. ¿Cree usted que el mecanismo de regulación postranscripcional utilizado en la síntesis de proteínas ribosomales pudiera ser igualmente efectivo en otras proteínas conjugadas?
7. ¿Cuáles son las características del material genético de eucariontes que hacen más complejos los mecanismos de regulación?
8. ¿Por qué la acetilación de las histonas favorece los mecanismos de expresión de los genes?
9. ¿Cuál de los principios de la bioquímica se hace evidente en el hecho de que sea la transcripción el blanco principal de los mecanismos de regulación de la expresión de los genes?
10. ¿Por qué se considera que la impronta genómica es un mecanismo de regulación de la expresión genética?

Tecnología del ADN recombinante

Entre las ciencias teórica y técnica existe una relación dialéctica. La teoría busca el conocimiento de las leyes generales de la naturaleza a partir del estudio detallado de numerosos fenómenos, en tanto la técnica persigue el objetivo de convertir esos conocimientos en instrumentos prácticos, vinculados directa o indirectamente con la producción material.

Esta interacción, tan evidente en las últimas décadas, gracias a la revolución científico-técnica, ha llevado a formular la tesis de la conversión de la ciencia en una fuerza productiva; pero existe también la relación inversa, o sea, los avances tecnológicos contribuyen, de manera considerable, al desarrollo de la ciencia teórica con la producción de instrumentos que cada vez alcanzan un grado más elevado de perfección y sirven para profundizar aún más en el conocimiento de la naturaleza. A esta situación no escapan algunos campos, al parecer tan alejados de la vida práctica como la genética molecular.

Existen muchos ejemplos de cómo en los últimos 40 años, el desarrollo tecnológico ha conducido a gigantescos pasos de avance en el conocimiento de la biología molecular. La difracción de rayos X permitió a los investigadores tener una visión detallada de la estructura de las macromoléculas, así como la técnica de centrifugación en gradientes de densidad de CsCl abrió las puertas al conocimiento del mecanismo de replicación del ADN. La adquisición más reciente lo constituye la técnica para unir moléculas de ADN *in vitro*, denominada tecnología del ADN recombinante. Esta técnica básica y sus múltiples variantes han revolucionado el estudio de la genética de los eucariontes y proporcionado fuentes de proteínas específicas en cantidades consideradas anteriormente casi imposibles.

En este capítulo se estudiarán los procedimientos generales de esta tecnología y otras basadas en el ADN, así como algunas implicaciones de sus procedimientos, en especial aquellos que están más vinculados con la práctica médica. Así mismo, no se pretende hacer un análisis pormenorizado de este tema, que por lo demás está en constante crecimiento, ni siquiera describir sus múltiples procedimientos. El objetivo principal es brindarle al estudiante una idea de cómo estos conocimientos del nivel molecular de la biología se pueden utilizar en la práctica.

Procedimiento general

Existen numerosos procedimientos para la manipulación de los genes, de acuerdo con los objetivos que se persigan. Un procedimiento general para la obtención de cantidades apreciables de productos génicos se puede dividir en las etapas siguientes:

- Obtención de un segmento de ADN, o sea, un gen, a partir del genoma de un organismo dado.
- Unión de este gen a una molécula de ADN capaz de replicarse.
- Establecimiento de un medio adecuado que permita la propagación de la unidad de ADN así formada.

La molécula de ADN utilizada para la propagación del gen deseado se refiere entonces como vector; este es el vehículo molecular que porta la información genética, en la cual se está interesado. Cuando el gen deseado se propaga en ese medio y se replica, se llegan a obtener numerosas copias, se dice entonces que el gen ha sido clonado, y por ende, este proceso recibe el nombre de clonación. Dicho término se utilizó por primera vez para describir el fenómeno por el cual se obtienen numerosas células a partir de un antepasado único, por tanto, aquí solo se ha hecho una extensión de este concepto al campo del conocimiento molecular.

A continuación se hará una somera descripción de cada una de estas etapas, con énfasis en la estrategia que se debe seguir mediante los procedimientos técnicos indispensables para la comprensión general del proceso (Fig. 35.1).

Obtención de genes específicos

El mayor impacto de esta tecnología fue sobre los mecanismos de las células eucariontes, por eso solo se hará referencia a la obtención de genes eucariontes en forma simplificada, ya que en ocasiones la complejidad del proceso rebasa los límites de este texto.

El primer intento de obtención de un gen eucarionte fue directamente de la célula; se extraían las moléculas de ADN y se exponían a la acción de una enzima de restricción (ver capítulo 33); los fragmentos que se obtenían solían ser muy grandes y era necesario volver a fragmentarlos mediante una endonucleasa con especificidad diferente a la primera; esto podía repetirse varias veces hasta obtener fragmentos de tamaño adecuado para su manipulación. El estudio de los puntos de corte de varias enzimas sobre una molécula de ADN origina los mapas de restricción, que consisten en la representación de la molécula de ADN, señalando los puntos donde es cortada por cada una de las endonucleasas ensayadas. Cuando se tenía el fragmento deseado se procedía a su inserción en un vector. Pero este procedimiento no dio los resultados esperados; a partir de experiencias de este tipo quedaron establecidos el carácter discontinuo de los genes eucariontes y la existencia de los intrones, estas características entorpecían la expresión de los genes eucariontes en bacterias.

El segundo procedimiento consistió en no aislar al gen, sino al ARNm transcrito a partir de este, para ello generalmente se seleccionaba una célula especializada en la síntesis de determinada proteína, de manera que la concentración del ARNm fuera lo más elevada posible, por ejemplo, los reticulocitos para el ARNm de la globina, las células β del páncreas para ARNm de insulina, etc. Este procedimiento tiene la ventaja de que ya han sido eliminados los intrones. Para la obtención del gen se incuban el

ARNm con los cuatro dNTP y una enzima que se obtiene de retrovirus, que es capaz de formar una molécula de ADN, tomando como molde una de ARN, por lo cual se le ha denominado ADN polimerasa dependiente de ARN, transcriptasa inversa o enzima de Temin, en honor a Howard Martin Temin, quien la descubrió en 1970. En este procedimiento se obtiene el ADN complementario (ADNc), en el cual se conserva la información necesaria para la síntesis de proteínas, pero se han eliminado los intrones y, por tanto, no se requiere del procesamiento del transcrito primario.

El tercer procedimiento consiste en hacer la síntesis artificial del gen; en estos casos se parte de la secuencia de aminoácidos del péptido, pues la síntesis de ADN muy largos no ha sido posible aún y se deduce la secuencia de bases del ADN mediante el código genético.

Esta secuencia no necesariamente es igual a la del gen natural debido al carácter degenerado del código. Por procedimientos complicados de síntesis artificial se logra una copia del gen con la secuencia de bases específicas.

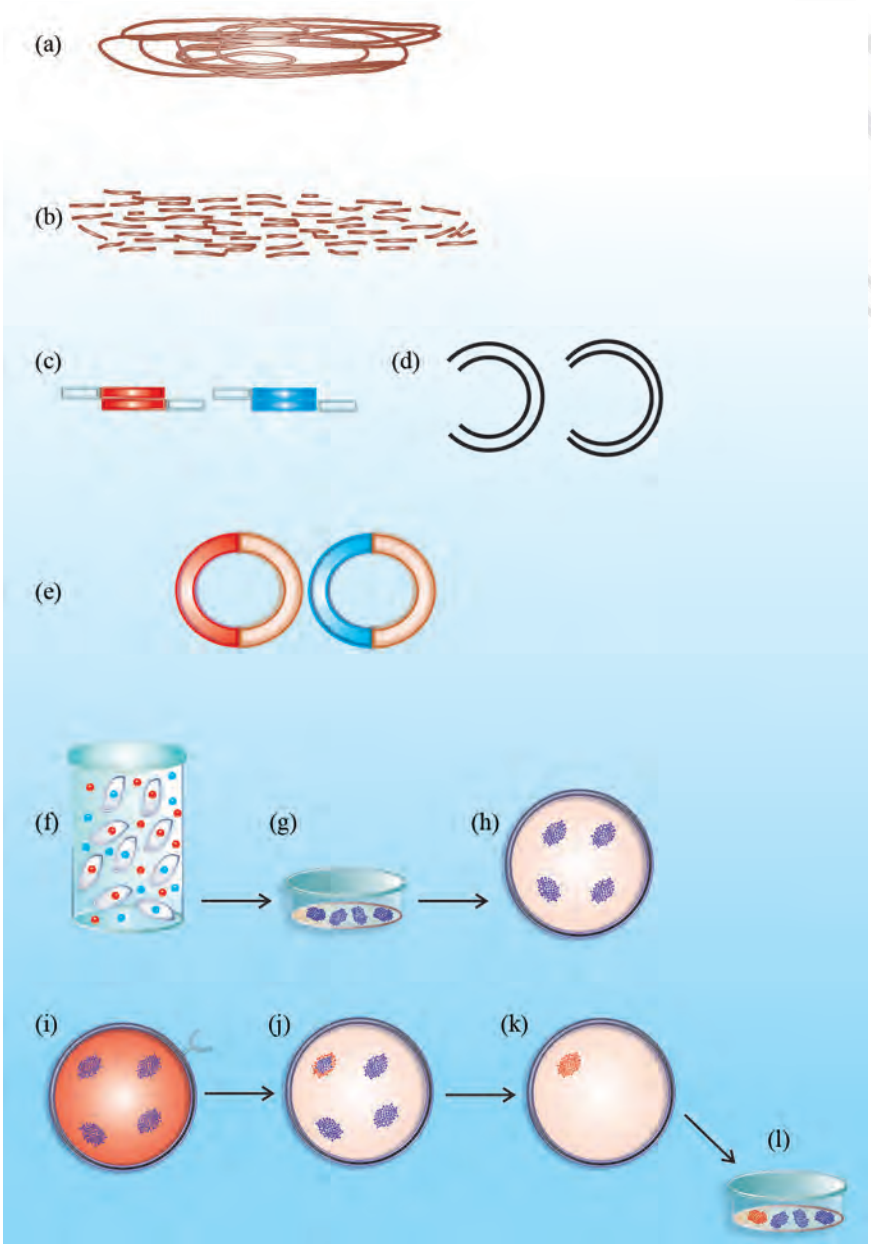


Fig. 35.1. Procedimiento general. El ADN del genoma de una célula de mamífero (a) es fragmentado por la acción de una enzima de restricción (b), algunos de esos fragmentos pueden incluir el gen deseado (c), a color. Numerosas copias de un plásmido son tratadas con la misma enzima (d). Los plásmidos y los fragmentos del genoma se mezclan y se unen por acción de la ADN ligasa (e) y estos plásmidos recombinados se introducen en las bacterias (f). Las bacterias se siembran en una placa (g), suficientemente separadas, como para que cada una pueda dar origen a una colonia en la que todas las células sean descendientes de una sola, o sea, formen un clon. Solo algunos clones celulares contendrán el plásmido con el gen deseado. Existe una forma muy simple de localizar ese clon, si se posee el ARNm derivado del gen, y se puede utilizar como una sonda. Una muestra de las colonias se transfiere a un papel de filtro, las células son rotas para exponer su ADN (h) y se le añade el ARNm sonda marcado con un isótopo radiactivo (i), que se hibrida con el ADN deseado solamente, y el exceso es descartado (j). Se realiza entonces la autorradiografía del papel de filtro (k) y, comparando la aparición de la marca radiactiva con la posición de las colonias en la placa original, se identifica la colonia buscada (l).

Recombinación *in vitro*

Para el proceso de recombinación *in vitro* son necesarias las enzimas de restricción, que ya fueron estudiadas en el capítulo 33. A los efectos de este procedimiento solo se tendrán en cuenta las enzimas del tipo II (ver capítulo 33), pues estas cortan el ADN en el mismo sitio de reconocimiento. Existen dos grupos: aquellas que al producir el corte sobre las dos hebras del ADN lo hacen de forma que originan pequeños fragmentos monofibrilares, y las que cortan en el mismo sitio las dos hebras, sin dejar en el producto este tipo de fragmento; esta distinción se hace porque, de acuerdo con el tipo de enzima empleada, el procedimiento que se debe seguir será diferente.

En el primer caso se opera de la forma siguiente: se extrae el ADN de la célula y se digiere con una enzima de restricción, sea la EcoR1, de esta forma se obtienen numerosos fragmentos. El vector que se va a emplear se digiere igualmente con la misma enzima; se trata de que el vector empleado solo tenga un sitio sensible a la acción de la endonucleasa empleada; después se incuban juntas las dos muestras de ADN para permitir su recombinación y se añade ADN ligasa para sellar las brechas y dejar la molécula insertada en el vector (Fig. 35.2).

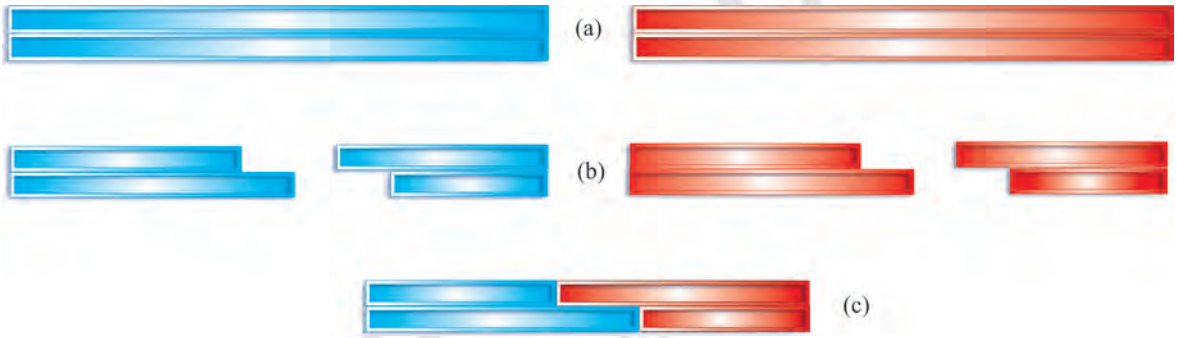


Fig. 35.2. Recombinación con enzimas que originan fragmentos monofibrilares. Como se muestra en la figura, si dos ADN son tratados con una misma enzima de restricción (a), de las que originan fragmentos monofibrilares (b), al mezclar las dos muestras en presencia de ADN ligasa la recombinación ocurre fácilmente (c).

En el segundo caso se requiere una enzima que es algo excepcional y se obtiene de algunos tejidos animales, se trata de la nucleotidil transferasa terminal TdT (del inglés, *terminal desoxynucleotidyl transferase*), la cual es una ADN polimerasa que añade desoxinucleótidos (a partir de dNTP) al extremo 3'-OH de un fragmento de ADN de cadena simple, con el hecho sobresaliente de que no requiere un molde para su acción.

El procedimiento entonces sería como sigue: se extrae el ADN de una célula y se digiere con una enzima de restricción, la HaeI; los fragmentos se someten a la acción de una 5'-exonucleasa específica para eliminar algunos de los nucleótidos terminales y originar un fragmento monocatenario con el extremo 3'-OH. Como la TdT añade los desoxinucleótidos al azar, pues su acción no está dirigida por un molde o plantilla, el ADN así tratado se incuba con uno de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados, puede ser dTTP, de manera que la enzima alarga las hebras con el extremo 3´-OH, con el mismo dNTP formando, según nuestra elección, una cola de poli(T). El vector puede ser cortado con cualquier enzima del mismo tipo, se trata con la 5'-exonucleasa y después se incuba con la nucleotidil transferasa terminal y el desoxinucleótido complementario al empleado en el caso anterior (dATP) y se formará una cola de poli(A) en ambos extremos 3'-OH del vector. Por último, se incuban el ADN tratado y el vector, y se dejan un tiempo en este proceso, de manera que se puedan formar los puentes de hidrógeno entre las dos colas que son complementarias. Al final se añade la ADN ligasa y se produce la recombinación (Fig. 35.3).

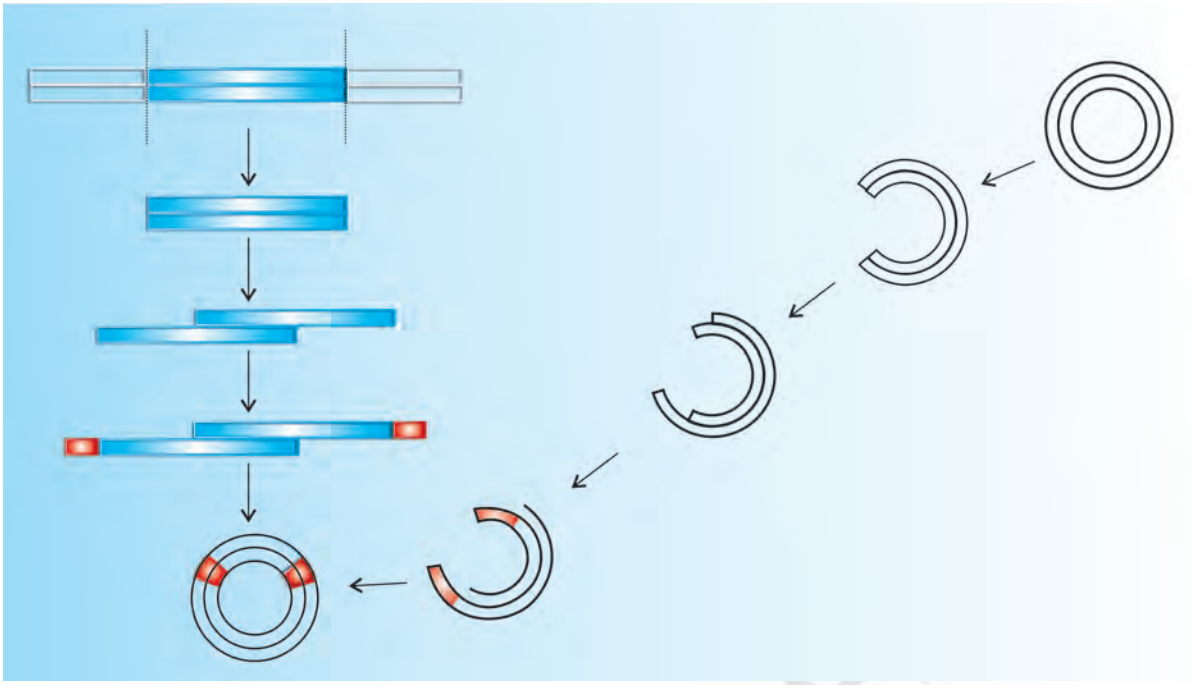


Fig. 35.3. Recombinación con enzimas que no originan fragmentos monofibrilares. Cuando la enzima de restricción no origina fragmentos monofibrilares es necesaria la acción de la 5'exonucleasa que crea un pequeño fragmento monofibrilar, que será utilizado por la nucleótido transferasa terminal para añadir nucleótidos al extremo 3'-OH. Si al fragmento de ADN de nuestro interés y al plásmido que usaremos en la recombinación se añaden nucleótidos de bases complementarias, se generan fragmentos monofibrilares que son complementarios y al mezclarlos en presencia de ADN ligasa recombinan fácilmente.

La recombinación *in vitro* también ha permitido un modo relativamente fácil para la obtención de genes. En ocasiones es más sencillo trabajar con el genoma completo que con un gen particular, sobre todo si este último es desconocido; este proceso se logra de la forma siguiente: se extrae el ADN celular y se corta en fragmentos, utilizando enzimas de restricción en fases sucesivas hasta que los fragmentos tengan un tamaño de fácil manipulación; estos fragmentos se aíslan unos de otros y cada uno es recombinado con un ADN viral, generalmente de fagos. Las colonias de fagos bien identificadas se conservan y pueden servir para la identificación de genes específicos; a esta colección del genoma de una célula en fragmentos guardados en vectores específicos, casi siempre en virus, se le da el nombre de genoteca.

¿Cómo buscar un gen en una genoteca? Existen varios procedimientos, pero solo se hará referencia a uno de estos, un ejemplo hipotético será más ilustrativo: suponga que un tipo de bacteria sintetiza una sustancia, denominada Pq, que es necesaria para su crecimiento y reproducción, y se obtiene un mutante de fenotipo Pq, que no sintetiza esa sustancia (que denotaremos como Pq^-). Si se tiene una genoteca de la bacteria Pq^+ se puede aislar el gen mutado. Para ello se hacen crecer las bacterias Pq^- en varias colonias y se le añade al medio de cultivo la sustancia Pq, luego se infecta cada una de las colonias con un virus de la genoteca, portador de un fragmento del ADN. Si se elimina la sustancia Pq del medio de cultivo, solo podrán crecer aquellas bacterias que han incorporado de la genoteca la versión normal del gen. Como el fragmento está identificado, se puede fragmentar con enzimas de restricción y hacer una subgenoteca, que vuelve a probarse en otros cultivos y así sucesivamente hasta obtener el gen que se busca. Por un procedimiento similar a este se pudo descubrir y aislar el oncogen ras.

Otros procedimientos de recombinación *in vitro* no serán discutidos.

Vectores

En el acápite anterior se hizo referencia a los vectores; se entiende por vector una molécula de ADN que se emplea para introducir el gen deseado en una célula. Para que un vector sea útil debe reunir las condiciones siguientes:

– Debe ser capaz de replicarse.
– Debe existir algún procedimiento para detectar su presencia.
– Debe haber alguna forma de introducir el vector en una célula.

Los tres tipos fundamentales de vectores empleados en estos procedimientos y que, por tanto, cumplen estos requisitos son los plásmidos, algunos virus –especialmente los bacteriófagos– y los denominados cromosomas artificiales de levadura.

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico, que se encuentran en muchas bacterias y en algunas especies de eucariontes monocelulares. Muchos plásmidos contienen genes que son esenciales en determinados medios, por ejemplo, los plásmidos del tipo R contienen genes que aportan a la célula la resistencia a determinados antibióticos, que pueden aparecer en el medio por acción humana o por la presencia de otros microorganismos que los producen. Los plásmidos de este y otros tipos son generalmente identificados por los genes que portan, sin embargo, en ocasiones el plásmido es encontrado de manera accidental como una pequeña molécula circular de ADN, presente en una muestra aislada de un extracto celular.

Los plásmidos tienen por lo regular una sola molécula de ADN, cuyo peso molecular está entre 10^6 para los menores y 10^8 para los mayores.

Los plásmidos solo se pueden replicar dentro de su propia célula, pero la forma en que lo hacen no es necesariamente igual a la que se utiliza en los cromosomas, incluso, dos plásmidos de una misma célula suelen adoptar formas distintas de replicación. Se pueden distinguir dos tipos de plásmidos de acuerdo con el control de su replicación: los de control estricto y los de control relajado. Los del primer tipo existen en muy pocas copias por célula y su replicación se realiza junto con el ADN cromosómico, y al dividirse la célula se reparten de forma equitativa entre las dos células hijas; los del segundo tipo existen en un número mayor y su replicación es independiente de la del ADN cromosómico. Si se inhibe la síntesis de proteínas, estos plásmidos se multiplican rápidamente y pueden llegar a haber cientos por célula, por lo que son preferidos para ser empleados como vectores.

Muchos plásmidos suelen transferir una réplica de ellos desde una célula donante a una receptora; por ejemplo, si una sola célula de *E. coli* que contiene el plásmido F se añade a un cultivo de células tipo F^- que no contengan el plásmido, después de varias generaciones una gran proporción de células contendrá el plásmido F, o sea, se ha realizado la transferencia de una réplica del plásmido F, de una célula F^+ a una célula F^-, sin que la célula inicial haya perdido el suyo. Como después de la transferencia, F se replica, con cada transferencia aparecen más células donantes y como el fenómeno ocurre de una a dos veces por generación, el plásmido se propaga rápidamente en el cultivo. Estas características de los plásmidos, así como su posibilidad de conjugación (capítulo 31) hacen de estos unos magníficos portadores de genes para la tecnología del ADN recombinante.

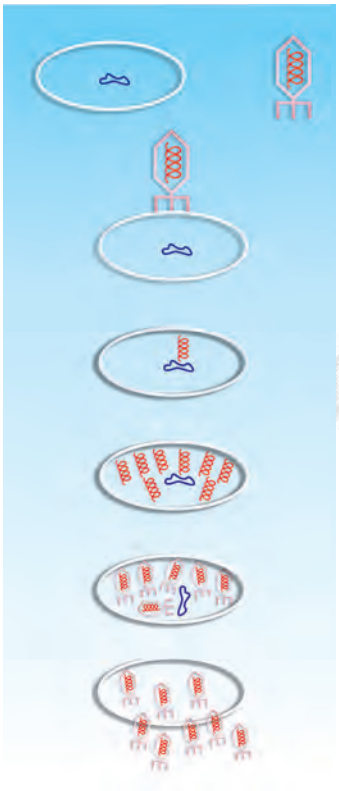


Fig. 35.4. Mecanismo de la penetración de un virus. Los virus se fijan a la pared de las células bacterianas e inyectan su material genético al interior de la célula, en tanto las proteínas que forman la cubierta de virus se quedan en el exterior; esto hace que los virus puedan ser utilizados eficientemente como vectores en las experiencias de ADN recombinante.

Los demás vectores más empleados son los virus, estos se encuentran formados por una molécula de ADN y una cubierta de proteínas. Cuando un virus se añade a un cultivo bacteriano, este se fija a la pared celular e inyecta su ADN al interior, en tanto las proteínas de la cubierta quedan fuera, como se muestra en la figura 35.4.

Dentro de la célula el virus utiliza el aparato metabólico de esta para la replicación de su ADN y la síntesis de las proteínas virales, de manera que con un solo virus que

penetre en una célula pueden obtenerse cientos de copias del ADN viral, que después suelen recuperarse con relativa facilidad. El procedimiento es similar al de los plásmidos. El ADN de interés se inserta en el ADN viral y este se introduce en una bacteria apropiada. El ADN viral dirigirá su duplicación y la síntesis de sus proteínas empleando el aparato metabólico de la célula, con lo cual en pocos minutos se obtienen cientos de copias del ADN deseado.

Los cromosomas artificiales de levadura son grandes moléculas de ADN, que se construyen con los centrómeros y los telómeros de cromosomas de levaduras y segmentos de ADN extraño; también contienen las secuencias necesarias para la replicación. El criterio de selección del vector está determinado esencialmente por el tamaño del gen deseado. Los plásmidos son capaces de acomodar los genes más pequeños, en tanto los cromosomas artificiales de levadura acomodan los de gran tamaño y los virus, los de tamaño intermedio.

Una vez que el gen deseado ha quedado incorporado al vector, este debe ser transferido al interior de una célula, lo cual en el caso de los plásmidos puede hacerse mediante sales de calcio que aumenten la permeabilidad de las membranas de las células bacterianas.

En el interior de la célula el ADN se replica muchas veces, por lo que se originan numerosas copias del gen deseado, o sea, el gen ha sido clonado.

Reacción en cadena de la polimerasa. Si el gen no es muy grande, se puede realizar la clonación *in vitro* mediante el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*). Para ello es necesario contar con dos pequeños oligonucleótidos que sean complementarios a los extremos 5' del gen, los cuales tendrán la función de servir de iniciadores. Se procede de la forma siguiente: el ADN se calienta a una temperatura alrededor de 94 °C para provocar su desnaturalización, después se añaden los oligonucleótidos y se enfría lentamente hasta unos 56 °C, para permitir la hibridación de los oligonucleótidos a los extremos 5' de las dos hebras del ADN desnaturalizado; entonces se añade una ADN polimerasa y la temperatura se eleva a 72 °C para realizar la elongación del iniciador. En los primeros momentos este procedimiento resultaba engorroso, pues como las enzimas se desnaturalizan por el calor, en cada ciclo había que añadir la enzima que era una variante corta de la ADN polimerasa I de *E. coli*.

Un paso de avance extraordinario se logró con la introducción de la ADN polimerasa de *Termophilus aquaticus* (*Taq*) que, por ser resistente al calor, permite incorporar de una vez todos los componentes del sistema, incluso los cuatro desoxinucleósidos trifosfatados. Con posterioridad se han construido equipos que realizan todo el proceso de manera automática. El primer ciclo demora casi 90 s, aunque para los siguientes se pueden utilizar entre 50 y 60 s; se debe tener en cuenta que en cada ciclo, el número de moléculas de ADN presentes se duplica, por lo cual existe un crecimiento exponencial del tipo 2^n, donde n es el número de ciclos. Por este procedimiento se pueden obtener numerosas copias del gen en escasos minutos. En la actualidad existen numerosas variantes del procedimiento, que permiten alcanzar objetivos diferentes a la simple clonación del gen. Por la invención del método de la reacción en cadena de la polimerasa, Kary B. Mullis recibió el Premio Nobel de Química en 1993.

Identificación del gen recombinado

El plásmido más empleado para la clonación es el pBR322 de *E. coli*, que tiene un peso molecular de $2{,}9 \times 10^6$ y porta los genes para la resistencia a la tetraciclina (tet) y a la ampicilina (amp), por lo cual las bacterias que contienen el plásmido pueden ser

detectadas al hacerlas crecer en un medio que contenga esos antibióticos. Además, este plásmido presenta siete sitios de restricción para otro tanto número de enzimas.

El método más empleado para detectar el plásmido recombinante es el de inactivación por inserción. Los sitios para las enzimas BamHI y SalI están dentro del gen tet, luego si se produce la recombinación utilizando cualquiera de estas enzimas, el plásmido se torna amp^+ y tet, o sea, ha ocurrido una inactivación del gen tet por la inserción del ADN que se quiere clonar.

El estudiante debe tener en cuenta que estos procedimientos se hacen "a ciegas". Se tiene una solución donde existen numerosas moléculas del plásmido. Al añadir la enzima de restricción (BamHI o SaII) estas actúan sobre algunos de los plásmidos, pero no en todos, es decir, solo un número de moléculas del plásmido es cortado. Por un proceso de desnaturalización y resuspensión las enzimas son eliminadas. Entonces se añade el gen deseado y de igual forma algunos de estos se unen al plásmido, es decir, se produce la recombinación, pero otros no. Al añadir la ADN ligasa, esta solo puede unir los genes que están insertados en el plásmido. Al final del procedimiento se obtiene una mezcla que contiene los plásmidos originales, los plásmidos recombinantes y los plásmidos con una recombinación fallida. Esta solución es la que se añade al cultivo de bacterias.

Para proseguir se emplean bacterias que sean amp-/tet-. El procedimiento sigue siendo a ciegas. Por lo tanto, al añadir la solución con los plásmidos, algunas bacterias incorporan el plásmido original y serán amp+/tet+; otras incorporan el plásmido recombinado y serán amp+/tet-; unas incorporan plásmidos de recombinación fallida y otras no incorporan ningún plásmido y serán amp-/tet-. El paso siguiente es identificar cuáles fueron las bacterias que incorporaron el plásmido recombinado.

Después de esperar un tiempo adecuado para permitir la penetración del plásmido, las células se transfieren a un medio que contiene cicloserina y tetraciclina. La cicloserina mata las células que crecen y se multiplican, así como las que son resistentes a la tetraciclina, es decir, las que no incorporaron el plásmido recombinado. Las que contienen el plásmido recombinado o no adquirieron ninguno pueden crecer por la presencia de tetraciclina en el medio; luego de un tiempo prudencial las células se lavan y se cambian a un medio que contiene ampicilina. La ampicilina mata las células que no adquirieron el plásmido, no así las que incorporaron el plásmido recombinante, pues son resistentes a ese antibiótico. De esta manera solo se seleccionan aquellas bacterias que contienen el plásmido recombinado y por lo tanto el gen de nuestro interés (Fig. 35.5).

.

Problemas en la producción de proteínas eucariontes

La utilización de bacterias para la producción de proteínas eucariontes origina los problemas siguientes:

- Las ARN polimerasas bacterianas no reconocen los promotores de eucariontes.
- Los ARNm transcritos de genes eucariontes no contienen en el extremo conductor la secuencia rica en purinas, que permite a los ARNm de procariontes unirse específicamente al ribosoma.
- Las proteínas eucariontes sufren modificaciones postraduccionales específicas.
- Las bacterias contienen proteasas que reconocen como extrañas las proteínas eucariontes y las hidrolizan.

Los dos primeros problemas pueden eliminarse si el gen se une previamente a un promotor bacteriano, por ejemplo, el promotor del operón *lac*.

El procesamiento de las proteínas en general se realiza *in vitro*. La protección contra las proteasas se logra, en ocasiones, por la obtención de bacterias mutantes que carecen

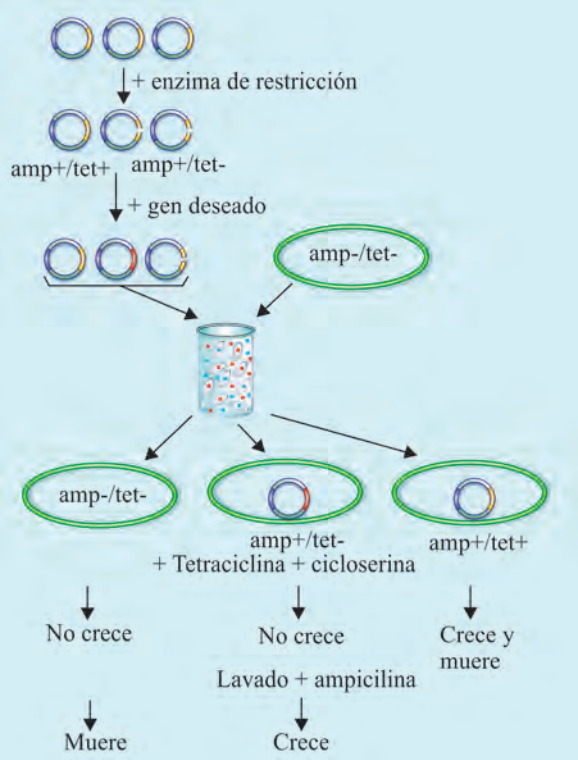


Fig. 35.5. Identificación del plásmido recombinado. Al añadir la enzima de restricción algunos plásmidos son cortados y otros no. Igual sucede al añadir el gen deseado. Al transferir los plásmidos a las bacterias, se originan tres tipos de construcciones: las bacterias sin plásmido; las que tienen el plásmido original y las que poseen el plásmido recombinante. El empleo adecuado de los antibióticos en una y otra etapas del procedimiento permite seleccionar el plásmido que contiene el gen de nuestro interés. El cultivo posterior de estas bacterias producirá la clonación del gen.

de esa actividad específica, o por el empleo de inhibidores. Aun así, en los primeros momentos no era fácil lograr todas las condiciones requeridas para un caso específico, de ahí que el número de experiencias exitosas no fuera aún muy elevado. Con el decursar del tiempo los procedimientos se han ido refinando y muchos se han automatizado, con lo cual los resultados exitosos ya son numerosos.

Expresión de genes clonados

Para la expresión de los genes clonados es necesario que estos sean transcritos y traducidos, para eso debe construirse el vector de expresión.

Si el vector utilizado en la clonación contiene un promotor cerca del sitio de inserción, este promotor puede ser empleado, pero en muchos casos el vector carece del promotor adecuado, entonces es necesario reconstruirlo de forma que contenga, además del gen de interés, el promotor adecuado. En estos casos se trata de emplear un promotor fuerte para hacer máxima la transcripción, o un promotor que presente alguna característica especial.

El procedimiento comúnmente utilizado es rediseñar un plásmido, de manera que contenga la región promotor operador del operón *lac* y hasta un pequeño sector del gen de la β-galactosidasa, seguido del gen deseado. En estas condiciones la adición del inductor conectará el sistema que producirá la proteína deseada, y la adición de glucosa desconectará el sistema al aumentar la concentración intracelular del AMPc (ver capítulo 34).

El trabajo más difícil consiste en la purificación de la proteína producida, ya que es una tarea muy laboriosa que requiere gran destreza y en la mayoría de los casos no poca imaginación.

A pesar de todos estos recursos no siempre se logra la expresión del gen; solo una de las dos hebras del ADN se utiliza como molde en la transcripción, y en el proceso de recombinación artificial se introduce ADN de doble hebra. Como los dos extremos

son iguales, por la simetría de la secuencia, existe la posibilidad de que el apareamiento se produzca de forma que coincida la cadena codificadora del promotor con la no codificadora del gen insertado, en este caso la expresión es imposible.

Basta que una o varias células logren la incorporación del gen en la forma adecuada, para que al cabo de algunas horas se tengan tantas copias como se quiera; la *E. coli* tiene un tiempo de duplicación de 30 min.

Experiencia típica

Una vez conocidos todos los elementos de trabajo, así como las dificultades que encierran estos experimentos, se describirá una experiencia exitosa de síntesis de un producto eucarionte por medio del aparato metabólico de *E. coli*, se trata de la somatostatina, una hormona polipeptídica de 14 aminoácidos que se sintetiza normalmente en el hipotálamo y el páncreas.

Como el número de aminoácidos es pequeño, se procedió a la síntesis artificial del gen que contiene 51 pb, cuya secuencia en la banda codificadora sería:

T A C-(las 42 bases que codifican la somatostatina)-A C T A C T

La secuencia de bases en el ARNm sería:

A U G-(las 42 bases de la somatostatina)-U G A U G A.

Así, este ARNm tiene un codón para la metionina (que no se emplea en la iniciación), la secuencia codificadora y dos codones de terminación consecutivos.

Se utilizó como vector un plásmido de *E. coli* que fue reconstruido con un segmento del operón *lac* y que contenía la zona del promotor operador, así como un pequeño sector del extremo N-terminal de la β-galactosidasa. El vector fue cortado mediante una enzima de restricción y recombinado con el ADN sintetizado.

Una vez lograda la incorporación del plásmido a la bacteria, estas fueron colocadas en un medio de cultivo carente de glucosa al que se adicionó isopropiltiogalactósido (IPTG), un inductor gratuito del operón *lac* (ver capítulo 34).

Cuando se produce la inducción se obtiene una proteína que contiene un segmento del extremo N-terminal de la β-galactosidasa, unido a la somatostatina mediante la metionina, y que finaliza gracias a la doble señal de terminación del ADN sintetizado. Esta proteína es purificada y tratada con bromuro de cianógeno, un agente que provoca la ruptura de enlaces peptídicos del lado carboxílico de la metionina, de esta forma la metionina ligante queda unida al extremo de la galactosidasa y se libera la somatostatina (Fig. 35.6).

El empleo de la metionina como ligante puede ser útil en la síntesis de péptidos pequeños, a menos que la metionina forme parte de la estructura del péptido.

En la actualidad se han logrado sintetizar otras proteínas de eucariontes mediante procedimientos similares al descrito, como son: la insulina; la hormona pancreática, de gran importancia en el tratamiento de la diabetes mellitus; la ovoalbúmina y especialmente el interferón humano, un potente agente antiviral y posiblemente antitumoral. Esta proteína se produce desde hace años en Cuba, por diferentes procedimientos como la ingeniería genética, y fue utilizada en el tratamiento de la epidemia de dengue hemorrágico, introducida de manera criminal en Cuba, que costó la vida a más de 100 personas, entre ellas a muchos niños. Desde entonces la biotecnología ha alcanzado un notable desarrollo en nuestra nación y se ubica entre las más destacadas del mundo.

En principio, cualquier proteína eucarionte puede ser producida mediante esta tecnología con un sistema apropiado.

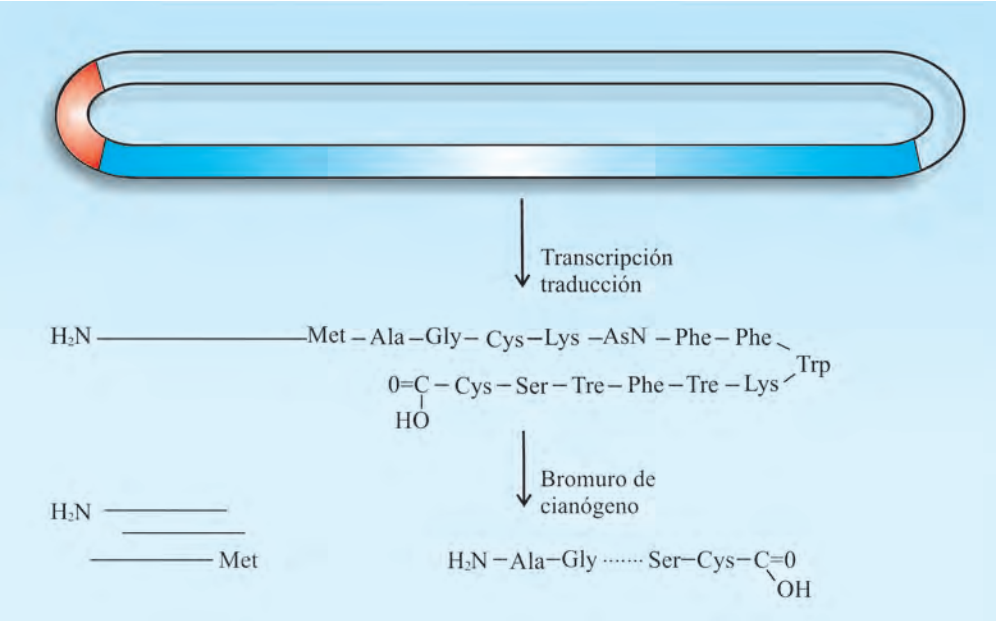


Fig. 35.6. Síntesis de la somatostatina. El plásmido fue reconstruido con el gen de la somatostatina, sintetizado artificialmente, y el promotor del operón *lac*. El codón para la metionina permitió que al tratar el producto con bromuro de cianógeno se liberara la somatostatina del segmento de β-galactosidasa que tenía unido.

Empleo diagnóstico

La presencia de formas alélicas de un gen en un individuo, que en algunos casos pudiera ser causa de una enfermedad, se detecta habitualmente por electroforesis o métodos antigénicos de las variantes de proteínas, aun cuando se sabe que ello se debe, en última instancia, a variaciones en la secuencia de bases del ADN en los *loci* cromosómicos correspondientes. Recientemente métodos derivados de la tecnología del ADN recombinante han permitido el análisis directo de las secuencias del gen, así como determinar sus alteraciones específicas que provocan cambios estructurales de una proteína particular. La utilidad de esta técnica es que permite la distinción entre dos copias de un *locus* particular del genoma humano.

El método más utilizado en la práctica para el estudio de las variaciones génicas es el uso de las enzimas de restricción; como estas enzimas realizan su acción en sitios específicos del ADN, un cambio en la secuencia puede conducir a la aparición o desaparición de un sitio particular y, por tanto, se altera el tamaño de los fragmentos que se obtienen cuando el ADN es digerido utilizando esa enzima; lo mismo ocurre si existen deleciones o inserciones.

La diferencia en los tamaños de los fragmentos de una región determinada de cromosomas homólogos puede ser detectada, con lo que se determina la existencia de los alelos.

Suponga que un gen presenta dos alelos A1 y A2, en el A1 existen dos sitios reconocidos por una enzima de restricción, separados por una distancia de 20 kb; pero en A2, producto de las mutaciones, ha aparecido un nuevo sitio de restricción para la misma enzima entre los dos anteriores, de manera que la acción de la enzima dará lugar a dos fragmentos de 8 kb y 12 kb, respectivamente (Fig. 35.7).

Si el ADN de una célula se extrae y fragmenta con la enzima de restricción, se obtendrán numerosos fragmentos que deben ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa para separarlos de acuerdo con su tamaño.

Se prepara un polinucleótido que contenga una secuencia de bases similar a la del fragmento con tamaño de 8 kb, utilizando dNTP marcado con fósforo radiactivo, que recibe el nombre genérico de sonda.



Fig. 35.7. Alelos que difieren en sus sitios de restricción. Los genes A1 y A2 son alelos que se diferencian porque en unos de estos la mutación ha originado un nuevo sitio de restricción. Así, cuando el ADN es tratado con esa enzima, el alelo A1 originará un solo fragmento de restricción de 20 kb, en tanto que A2 origina un fragmento de 8 kb y otro de 12 kb.

Una vez terminada la electroforesis, la placa de agarosa se transfiere a un soporte sólido embebido en una solución que contiene la sonda y se da el tiempo suficiente para permitir la hibridación entre la sonda y el ADN fragmentado. El soporte se separa de la solución y se cubre con una placa fotográfica (autorradiografía) que, al ser revelada, muestra la posición de los fragmentos de interés. Como la sonda solo puede hibridarse en la zona del fragmento de 8 kb, aparecerá unida tanto al alelo A1 como al fragmento pequeño del alelo A2, que por ser de diferentes tamaños aparecen en distintos sitios en la autorradiografía (Fig. 35.8).

Si una familia es portadora de una enfermedad genética producida por genes de este tipo, puede hacerse el diagnóstico prenatal mediante la obtención de células del líquido amniótico y procesándolas de esta manera. En Cuba se introdujo hace algunos años, un procedimiento similar para el diagnóstico prenatal de la drepanocitosis. Procedimientos de este tipo pueden ser utilizados en los departamentos de trasplante de órganos para realizar una caracterización más profunda de la compatibilidad entre los donantes y los receptores. También este procedimiento puede ser utilizado en medicina legal, siempre que en un hecho delictivo queden como huellas células de los delincuentes, como en el caso de homicidios, violaciones, etcétera.

El ADN y los problemas de identificación

Uno de los usos más extendidos de las tecnologías basadas en el ADN es la solución de problemas de identificación. Los procedimientos utilizados con anterioridad eran en general pruebas de exclusión. Esto quiere decir que, si por ejemplo, una mujer reclamaba que un hombre era el padre de su hijo, las pruebas solamente podían demostrar que no lo era, pero no podían afirmar que sí lo era. Con el uso de las pruebas basadas en ADN se pueden afirmar las dos alternativas, es decir, lo es y no lo es.

En 1985 el científico inglés Alec Jeffreys resolvió un litigio de maternidad por medio del ADN y de entonces a la fecha las pruebas de identificación empleando diferentes propiedades del ADN se ha vuelto un hecho cotidiano.

Las pruebas de identificación basadas en el ADN se basan en el hecho de que las moléculas de ADN son extremadamente polimórficas. Esto significa que en regiones de cada uno de los cromosomas existen zonas que difieren de un individuo a otro.

Las moléculas de ADN contienen regiones en las cuales pequeñas secuencias se repiten muchas veces una detrás de la otra (agrupación en tándem) y el número de estas repeticiones difiere de un individuo a otro. Una combinación de varios de estos fragmentos que contienen repeticiones en tándem permite una discriminación sin equívocos entre individuos. El análisis del número variable de repeticiones en tándem (VNTR, del inglés, *variable number of tandem repeats*) se basa en el estudio de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés, *restriction fragment length polymorphism*).

Para el estudio del RFLP se obtiene el ADN y se fragmentos utilizando una batería de enzimas de restricción y posteriormente el producto de la digestión del ADN por estas enzimas se somete a una electroforesis en gel de agarosa. Como las repeticiones

tienen diferentes tamaños en cada individuo y la electroforesis distribuye los fragmentos de la digestión del ADN de acuerdo con su tamaño, se obtiene un patrón de fragmentos que puede ser comparado con la muestra obtenida de otra persona. El patrón de estos fragmentos se conoce como "huella digital" del ADN (DNA fingerprint). El poder de discriminación de este procedimiento se calculó en 85% por lo cual en algunos países solamente se emplea en litigios civiles pero no en los criminales.

El análisis directo de los VNTR da una discriminación mucho mayor que, en algunos casos puede llegar al 99.99 %.

Una región VNTR típica está representada por un fragmento de ADN de unos pocos miles de pares bases que contiene un gran número de secuencias idénticas repetidas en tándem. Típicamente, la unidad de repetición es de 8 a 80 pb. Un ADN marcador se localiza generalmente en una región no codificante del genoma, que se refiere como locus. Diferentes loci se localizan en diferente cromosomas y su combinación debe poseer un gran poder de discriminación. Los resultados obtenidos mediante la combinación de esos loci recibe el nombre de perfil del ADN.

Las muestras de ADN obtenidas por los criminalistas en el lugar del hecho pueden proceder de diferentes fuentes y, aunque las más comunes son la sangre y el semen, otros tejidos y fluidos corporales pueden también ser usados. El material biológico debe ser cuidadosamente colectado, el ADN se extrae y se cuantifica, y posteriormente se amplifica por PCR. Actualmente se dispone de set comerciales para la amplificación simultánea de múltiples fragmentos que contienen iniciadores específicos para los VNTR que se desea amplificar marcados fluorescentemente con distintos colores. Estos productos permiten la coamplificación de 8 a 16 marcadores. Cuando se emplean varios marcadores (en Estados Unidos se usan 13), la probabilidad de coincidencia es prácticamente cero.

Los perfiles de ADN pueden almacenarse en una base de datos para ser consultados en cualquier momento o para compartir información con otros laboratorios de criminalista del país o del extranjero.

En la figura 35.9 se muestra en una forma más didáctica los resultados que pudieran obtenerse en un caso de un homicidio donde se encontró una muestra de sangre y se comparan los perfiles de ADN de la muestra y de tres sospechosos solamente para cuatro *loci.*

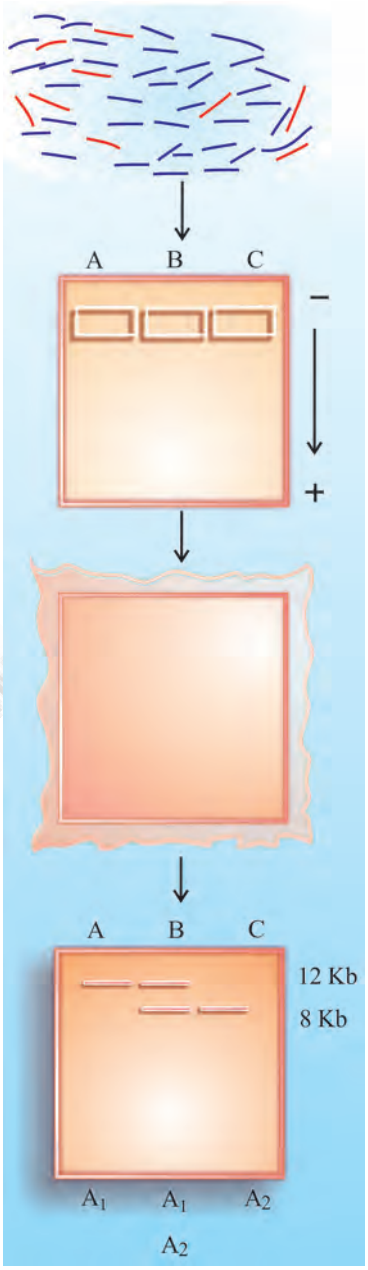


Fig. 35.8. Identificación de fragmentos de restricción. El ADN genómico de tres individuos es fragmentado mediante una enzima de restricción. Los fragmentos se someten a una electroforesis en gel de agarosa que los separa de acuerdo con su longitud. Se transfieren a un soporte sólido y se embeben en una solución que contiene la sonda radiactiva durante el tiempo necesario para permitir la hibridación; después se somete a un proceso de autorradiografía que revela la posición de las zonas híbridas. Como se observa en los resultados, el sujeto A es homocigótico para el alelo A1 (de 20 kb), el sujeto C es homocigótico para el alelo A2 y el B es heterocigótico, ya que presenta tanto el alelo A1 de 20 kb como el A2 que origina el fragmento de 8 kb.

Perspectivas

Muchos son los campos del quehacer humano donde la tecnología del ADN recombinante puede dar grandes resultados. La introducción de genes específicos en bacterias puede ser de gran utilidad, si estos organismos con su actividad provocan un mejoramiento del suelo, un incremento en la fijación de nitrógeno u otras modificaciones que hagan que se obtengan cosechas más productivas, tanto cualitativa como cuantitativamente.

La producción de agentes biológicos, que ayudan al hombre a combatir las enfermedades en formas inocua y económica, es también una de las posibilidades de estas técnicas.

La producción de microorganismos que ayuden a combatir la contaminación ambiental, tanto de la atmósfera como de los mares y ríos, propiciaría que el hombre pueda vivir en un planeta con ambiente menos agresivo; esta, entre otras producciones, constituyen posibilidades casi inmediatas de la tecnología del ADN recombinante.

Aun cuando en estos momentos no se vislumbra, puede que en un futuro no lejano esta técnica sea capaz de enfrentar el tratamiento de enfermedades hereditarias, al producir rectificaciones de los genes alterados mediante su sustitución por los normales.

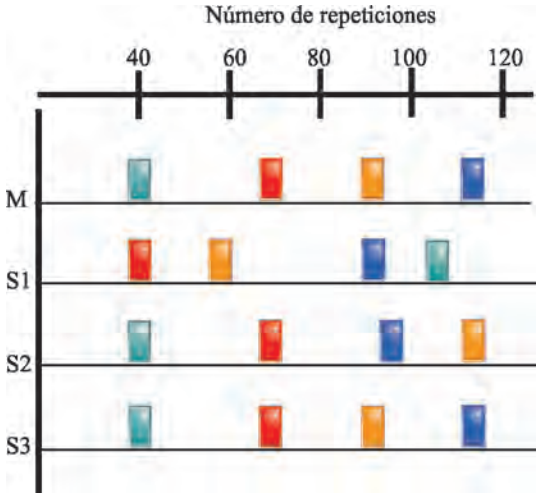


Fig. 35.9. Resultados de un perfil de ADN. Se muestra el perfil de ADN de una muestra encontrada en el lugar del hecho (M) y de tres sospechosos (S1, S2 y S3). En verde se indica el número de repeticiones en el *locus* 1, en azul las repeticiones del *locus* 2, en rojo el *locus* 3 y en naranja el 4. Aunque en algunos casos coinciden, el perfil general es diferente. Si se incrementa el número de marcadores la certeza puede llegar al 99,99 %.

Se requieren muchos años de investigación y trabajo para que la humanidad agote las posibilidades de esta nueva conquista de la ciencia.

Es lamentable que la ingeniería genética también pueda ser utilizada en contra de los hombres. La creación de organismos productores de enfermedades con elevada capacidad inefectiva, contra los cuales no existen tratamiento, y la contaminación del ambiente con productos residuales del metabolismo de bacterias alteradas, son ejemplos menores de cómo pueden utilizarse las manipulaciones genéticas contra sus propios descubridores.

Estos hechos no deben llevar a suspender las investigaciones en este campo, ya que el uso que se dé a sus resultados no depende de los procedimientos empleados, sino de las concepciones ético-políticas de los gobernantes de los países donde se desarrolle esta importante tecnología.

La explosión de la bomba atómica en Hiroshima y Nagasaki, con toda su secuela de muerte y destrucción que se extiende hasta nuestros días, y las grandes centrales átomo-eléctricas que existen en numerosos países que han llevado la comodidad y el desarrollo a grandes núcleos de población, ejemplifican de forma clara que el peligro no está en las fuerzas de la naturaleza que el hombre descubre, sino en el empleo que el propio hombre hace de ellas.

En todo caso nuestra posición, desde el punto de vista ético, implica condenar el uso de estas –y de cualquier otra– conquistas de la ciencia como instrumento para provocar la destrucción de la humanidad, en vez de hacerlo para su bienestar y desarrollo.

Resumen

Uno de los éxitos más sobresalientes de la genética molecular ha sido la introducción de la tecnología del ADN recombinante, que ha permitido obtener proteínas eucariontes en cantidades antes insospechadas y al mismo tiempo un análisis del gen al nivel molecular.

El procedimiento general consiste en la obtención de un gen particular, su incorporación a un vector y su propagación. Los genes pueden obtenerse por fragmentación del ADN, por aislamiento del ARNm y síntesis del gen por la transcriptasa inversa o por síntesis artificial del gen. Los vectores más empleados son los plásmidos, los virus y los cromosomas artificiales de levadura. La unión del gen al vector puede ocurrir de dos formas, según el tipo de enzima de restricción empleada en el proceso. Cuando la enzima no da fragmentos monofibrilares se requiere el concurso de la nucleotidil transferasa terminal.

La producción de proteínas eucariontes en bacterias presenta varias dificultades, pero basta con obtener algunas células recombinantes que, proporcionándoles el medio adecuado, en pocas horas se tendrán tantas como se quiera.

Mediante estos procedimientos se han obtenido numerosas proteínas, entre estas la somatostatina, la insulina y el interferón, el cual se obtiene con éxito en nuestro país desde hace algunos años.

La tecnología del ADN recombinante puede ser útil en el análisis del genoma y proporciona un procedimiento preciso para el diagnóstico prenatal de algunas enfermedades genéticas; también puede ser utilizada en los departamentos de trasplante y en medicina legal.

Tal vez el empleo más difundido de las tecnologías basadas en el ADN son las pruebas de identificación. Estas se basan en el carácter ampliamente polimórfico del ADN. Detectando las variaciones individuales de ese polimorfismo se puede identificar, sin equívocos, a qué persona pertenece.

Amplias son las perspectivas de esta tecnología para la agricultura, el saneamiento ambiental y la medicina. No obstante, también puede ser empleada en perjuicio del hombre, dependiendo de quienes sean los que la empleen y no de los procedimientos técnicos. La humanidad debe condenar enérgicamente el empleo criminal de estos procedimientos.

Ejercicios

1. ¿Cuáles cree usted que son las características que presentan los plásmidos que les permite servir de vectores en los procedimientos del ADN recombinante?
2. Haga un diseño de un experimento para recombinar *in vitro* un gen con un plásmido, utilizando alguna de las enzimas de restricción que aparecen relacionadas en el capítulo 33.
3. ¿Cuál fue el principal inconveniente encontrado al utilizar directamente los genes eucariontes para la recombinación *in vitro*? ¿Cómo pueden eliminarse esos inconvenientes?
4. ¿Por qué no siempre se logra la expresión de los genes aún cuando han sido incorporados al vector y este se multiplica en la célula receptora?
5. ¿Qué ventaja representa la incorporación del promotor lac en los vectores?
6. ¿Cómo puede la tecnología del ADN recombinante favorecer el desarrollo de un departamento de trasplante de órganos?
7. ¿El hecho de que los procedimientos del ADN recombinante puedan ser utilizados para causar daño a la humanidad, debe indicarnos que hay que concluir las investigaciones en este campo?
8. ¿Qué perspectivas representa la tecnología del ADN recombinante para los países subdesarrollados?

Resumen de la sección V

Esta sección se ha dedicado al estudio de los principales aspectos relacionados con la información genética interpretándolos desde el punto de vista de la estructura, las propiedades y las funciones de las macromoléculas.

La información genética es una de las formas de expresión de la información molecular que puede ser de tipo secuencial y conformacional, por lo que no se trata de un nuevo tipo de información, que distinguirla cualitativamente solo pretende realzar su significado para la vida de las células. No obstante la diversidad de procesos y mecanismos, se pueden encontrar algunas generalidades que a manera de resumen general se exponen a continuación.

Toda la información genética que determina la identidad de cada organismo está codificada en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN y por tanto es esencialmente de tipo secuencial. Pero el ADN contiene además en su estructura las instrucciones para su lectura, dadas por las irregularidades estructurales que surgen a lo largo de la molécula, de acuerdo con la secuencia de bases en sectores específicos. Todo el proceso de surgimiento y transformación de los seres vivos durante el período evolutivo alcanzan su última expresión en la lucha entre la estabilidad y la mutabilidad de esa secuencia de bases.

Sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado la existencia de otro tipo de información superpuesta a la del ADN y denominada por ello epigenética. Si en el ADN están codificadas todas las proteínas que una célula puede formar, los mecanismos epigéticos son los que determinan cuándo, dónde y con qué intensidad se expresan los genes. Por otra parte, los mecanismos epigenéticos son más susceptibles de ser influidos por el ambiente reforzando la necesaria interacción entre el ser vivo y su ambiente.

Conservar la información genética de un organismo y garantizar que este origine siempre descendientes iguales a sí, implica conservar inalterada la secuencia de bases de su ADN. Por el contrario, la aparición de variedades en la forma o las funciones de los organismos significa la alteración de la secuencia de bases de su ADN con respecto a la de sus progenitores. La existencia de secuencias no codificantes, de genes repetidos y los mecanismos de modificación-restricción por una parte y el complejo mecanismo de replicación del ADN, que implica una elevada fidelidad de copia, así como los de reparación aseguran la estabilidad del material genético; mientras que las mutaciones y la recombinación genética contribuyen a la mutabilidad del mismo. Es evidente que aquí solo se hace referencia a lo que sucede en el organismo, ya que las condiciones del medio influirán decisivamente en determinar cuáles serán los organismos que permanecerán y cuáles no. De esta forma a la lucha entre la estabilidad y la mutabilidad del material genético se suma la lucha permanente entre el genoma y el ambiente, ambas han contribuido de forma decisiva al desarrollo histórico natural de los seres vivos, desde las formas más simples hasta las más complejas.

A pesar de las diferencias evidentes que existen entre todos los procesos de transferencia de información genética, hay en ellos una uniformidad fundamental. El mecanismo básico que se pone en juego en los diferentes fenómenos relacionados con la información genética es el apareamiento de bases que es muy estricto en el ADN y menos en el ARN. Este mecanismo es el que sirve de base a la replicación, la transcripción, la recombinación y la reparación, también está presente en la traducción, pues la colocación de los aminoácidos en la cadena polipeptídica depende del apareamiento de bases entre el codon y el anticodon. Es por ello que en todos estos procesos siempre se utiliza una secuencia de bases que dirige el orden en que los diferentes componentes deben ser organizados.

La parte activa de todos los mecanismos la representan proteínas, un grupo de estas tiene la característica de reconocer secuencia de bases específicas y proceder de acuerdo

con ellas. El origen de replicación, el promotor, el operador, el terminador, las secuencias iniciales y finales de los intrones son algunos de estos ejemplos donde secuencias específicas de bases son reconocidas por proteínas específicas y ese reconocimiento es indispensable para su actividad. Otras tienen actividades enzimáticas especiales que se ajustan perfectamente a las características estructurales de los ácidos nucleicos y que no son posibles encontrar en enzimas que actúen con otros sustratos. En casi todos los casos estas proteínas se asocian y forman grandes complejos multiproteínicos que por sus diferentes actividades y su organización supramacromolecular constituyen verdaderos organitos subcelulares.

Por la importancia que tienen para la vida y por su elevado grado de complejidad, todos estos procesos necesariamente tienen que estar sometidos a finos mecanismos de regulación, que permitan que ellos se realicen en el momento y en el lugar adecuados; este control se ejerce a varios niveles y responde a numerosas señales que forman vías de transferencia de información que van desde el entorno hasta el núcleo celular. Por los conocimientos actuales se sabe que esas vías forman verdaderas redes que convergen o divergen de nudos de acumulación de información y que muchas veces tienen carácter redundante. En estos momentos los mecanismos mejor conocidos son los de control transcripcional.

A pesar del avance alcanzado en los últimos años, el conocimiento actual que se tiene de estos fenómenos no permite arribar a otras conclusiones, ya que en todos los mecanismos quedan aún aspectos importantes por dilucidar, sobre todo en lo referente a las propiedades de las proteínas que participan en ellos y a sus mecanismos de regulación.

Se espera que con la introducción de los procedimientos de la tecnología del ADN recombinante en los próximos años, muchos de estos aspectos queden esclarecidos, aunque de seguro el carácter inagotable del conocimiento de la naturaleza planteará problemas que hoy son totalmente desconocidos.

ecimed
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

BIBLIOGRAFÍA

Adelman, D. C., Aminoff, M. J., Baron, R. B., Bashore, T., Berger, T. C., et al. (2006). *Harper's Illustrated Biochemistry*. 27th ed. The McGraw-Hill Companies.

Alberts, B. (2003). *Molecular biology of the cell.* NCBI Garland Publishing. Taylor & Francis Group.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1983). *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc.

Alberts, B. y Bray, D. (2006). *Introducción a la biología celular.* Ed. Médica Panamericana.

Allen, G. C. and Kornberg, A. (1993). Assembly of primosome of DNA replication in Escherichia coli. J Biol Chem, 268: 19204-9.

Anderson, J. T. and Wang, X. (2009). Nuclear RNA surveillance: no sign of substrates tailing off. Critic Rev Biochem Mol Biol, 44(1): 16-24.

Baute, J. and Depicker, A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. Critic Rev Biochem Mol Biol, 43: 239-76.

Balbuider, E. and Waldren, C. (1991). A review of DNA metabolism in Escherichia coli. Cell Biol Rev, 25:105-55.

Bear, D. G. and Peadbody, D. S. (1988). The E. coli rho protein: an ATPase that terminates transcription. Trends BiochemSci, 13: 343-7.

Beckmann, H., Chen, J. L., O'Brien, T. and Tjian, R. (1995). Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. Science, 70: 1506-9.

Bell, S. P. and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. Ann Rev Biochem, 71: 333-74.

Belting, M. and Wittrup, A. (2008). Nanotubes, exosomes, and nucleic acid binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. JBC, 183(7): 1187-91.

Bernstein, B. E., Meissner, A. and Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. Cell, 128: 669-81.

Besse, F. and Ephrussi, A. (2008). Translational control of localized mRNAs: restricting protein sintesis in space and time. Nature Rev Mol Cell Biol, 9: 971-80.

Bhaumik, S. R. and Malik, S. (2008). Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex.Critic Rev Biochem Mol Biol, 43: 419-33.

Bjorklund, S. and Kim, Y. (1996). Mediator of transcriptional regulation. TrendsBiochem Sci, 21: 335-37.

Blackburn, E. H. (1984). The molecular structure of centromeres and telomeres. Ann Rev Biochem, 53: 163-94.

Blackburn, E. H. (1992). Telomerases. Ann Rev Biochem, 61: 113-29.

Boehme, K. A. and Blattner, C. (2009). Regulation of p53-insights into a complex process. Critic Rev Biochem Mol Biol, 44(6): 367-92.

Bollmann, F. M. (2008). The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. Bio Essays, 30: 728-32.

Branzei, D. and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. Nature Rev Mol Cell Biol, 9: 297-308.

Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. Ann Rev Biochem, 50: 349-83.

Breitbart, R. E., Andreadis, A. and Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple proteins isoforms from single genes. Ann Rev Biochem, 56: 467-95.

Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1995). Nitric oxide: a physiological messenger molecule. Ann Rev Biochem, 63: 451.
Brown, P. H., Tiley, L. S. and Cullen, B. R. (1991). Effect of RNA secondary structure on polyadenylation site selection. Gene Develop., 5: 1277-84.
Bukau, B., Weissman, J. and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. Cell, 125: 443-51.
Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K. and Turner, J. M. A. (2007). The management of DNA doublestrand breaks in mitotic G2, and in mammalian meiosis viewed from a mitotic G2 perspective. Bio Essays, 29: 974-86.
Burley, S. K. and Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). Ann Rev Biochem, 65: 769-99.
Busch, H., Reddy, R., Rothblum, L., Yong, C. and Choi. (1982). SnRNAs, SnRNPs, and RNA Processing. Ann Rev Biochem, 51: 617-54.
Campbell, J. L. (1986). Eukaryotic DNA replication. Ann Rev Biochem, 55: 733-71.
Campbell, P. N. (2006). *Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica.* Elsevier, España.
Carter, C. W. Jr. (1993). Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. Ann Rev Biochem, 62: 715-48.
Cech, T. R. and Bass, B. L. (1986). Biological catalysis by RNA. Ann Rev Biochem, 55: 599-629.
Chase, J. W. (1986). Single-stranded DNA binding proteins require for DNA replication. Ann Rev Biochem, 55: 103-36.
Christian, L. C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. Nature Rev Genetics, 8: 104-15.
Clark, B. F. C. and Marker, K. A. (1968). How protein start. Sci Amer, 218(1): 36-42.
Clayton, D. A. (1984): Transcription of the mammalian mitochondrial genome. Ann Rev Biochem, 53: 573-94.
Cleaver, J. E. and Hultner, M. L. (1995). Transcription-related human disorders. Am J Hum Gebet, 56: 1257-61.
Cole, C. N. and Scarcelli, J. J. (2006). Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. Curr Opin Cell Biol, 18: 299-306.
Conaway, J. W. and Conaway, R. C. (1991). Initiation of eukaryotic messenger RNA synthesis. J Biol Chem, 266: 17721-4.
Copeland, W. C. (2012). Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. Critic Rev Biochem Mol Biol, 47(1): 64-74.
Coverley, D. and Laskey, R. A. (1994). Regulation of eukaryotic DNA replication. Ann Rev Biochem, 63: 745-76.
Cox, M. M. (1987). Enzymes of general recombination. Ann Rev Biochem, 56: 229-62.
Crick, F. H. C. (1962). The genetic code I. Sci Amer 207(4): 66-74.
Crick F. H. C. (1966). The genetic code III. Sci Amer 215(4): 55-62.
Darnell, J. E. Jr. (1983). The processing of RNA. Sci Amer, 294(2): 90-100.
Das, A. (1993). Control of transcription termination by RNA-binding proteins. Ann Rev Biochem, 62: 893-930.
Davis, L. I. (1996). The nuclear pore complex. Ann Rev Biochem, 64: 865.
Deckbar, D., Jeggo, P. A. and Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation--induced cell cycle checkpoints. Critic Rev Biochem Mol Biol, 46(4): 271-83.
Delaval, B. and Doxsey, S. J. (2010). Pericentrin in cellular function and disease. JCB, 188(2): 181-90.
De Robertis, E. D. P. y De Robertis, E. M. F. (1984). *Biología celular y molecular.* Ed. Revolucionaria.
Deuerling, E. and Bukau, B. (2004). Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. Critic Rev Biochem Mol Biol., 39: 261-77.
Devlin, T. M. (1992). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations.* 3rd ed. Wiley--Liss, A. John Wiley and sons Inc. Publications.

De Pamphillis, M. L. (1993). Origin of DNA replication in metazoan chromosomes. J Biol Chem, 268: 1-4.
Ding, Q. and MacAlpine, D. M. (2011). Defining the replication program through the chromatin landscape. Critic Rev Biochem Mol Biol, 46(2): 165-79.
Doerfler, W. (1983). DNA methylation and gene activity. Ann Rev Biochem, 52: 93-124.
Doma, M. K. and Parker, R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. Cell, 131: 660-8.
Douglas, J., Civelli, O. and Herbert, E. (1984). Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. Ann Rev Biochem, 53: 665-715.
Dressler, D. and Potter, H. (1982). Molecular mechanism in genetic recombination. Ann Rev Biochem, 51:727-61.
Echevarria, M., Windhager, E. E., Tate, S. S. and Frindt, G. (1994). Cloning and expression of AQP-3 a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. Proc Natl Acad Sci USA., 91: 10997-11001.
Echevarría, M., Ramírez-Lorca, R., Hernández, C. S., Gutiérrez, A. M., Méndez-Ferrer, S. et. al. (2001). Identification of a new water channel (RP-mip) in the malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. Pflügers Arch, 383: 165-71.
Echols, H. and Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. Ann Rev Biochem, 60: 477-511.
Ehrenhofer-Murray, A., Gossen, E. M. D., Pak, T. S., Botchan, M. R. and Rine, J. (1995). Separation of origin recognition complex functions by cross-species complementation. Science, 270: 1671-4.
Engstrom, J. U., Suzuki, T. and Kmiec, E. B. (2009). Regulation of targeted gene repair by intrinsic cellular processes. Bio Essays 31: 159-68.
Falaschi, A., Abdurashidova, G. and Biamonti, G. (2010). DNA replication, development and cancer: a homeotic connection? Critic Rev Biochem Mol Biol, 45(1): 14-22.
Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post- transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nature Rev Genetics, 9: 102-14.
Friedberg, E. C. (1996). Relationships between DNA repair and transcription. AnnRev Biochem, 65: 15-42.
Furne, C., Corset, V., Hérincs, Z., Cahuzac, N., Hueber, A. O. and Mehlen, P. (2006). The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. Proc Natl Acad Sci USA, 103(11): 4128-33.
Garg, P. and Burgers, P. M. J. (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. Critic Rev Biochem Mol Biol, 40: 115-28.
Gavin, K. A., Hidaka, M. and Stillman, B. (1995). Conserved initiator proteins in eukaryotes. Science, 270: 1667-71.
Gesteland, R. F. and Atkins, J. F. (1996). Recoding: dynamic reprogramming of translation. Ann Rev Biochem, 65: 741-68.
Gilson, E. and Géli, V. (2007). How telomeres are replicated. Nature RevMol Cell Biol, 8: 825-38.
González, J. M., Arilla, E., Rodríguez-Segade, S. y Sánchez, A. (1998). *Bioquímica Clínica*. McGraw-Hill/Interamericana.
Gorlichaud, D. and Mattaj, I. W. (1996). Nucleo cytoplasmic transport. Science, 271 (5255).
Granneman, S. and Baserga, S. J. (2005). Crosstalk in gene expression: coupling and co--regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. Curr Opin Cell Biol, 17: 281-6.
Gossen, M., Pak, D. T. S., Hansen, S. K., Acharya, J. K. and Botchan, M. R. (1995). A Drosophila homolog of the yeast origin recognition complex. Science, 270: 1674-77.
Greenblatt, J. (1991). RNA polymerase-associated transcripction factors. Trend Biochem Sci, 16: 408-11.
Greider, C. W. (1996). Telomere length regulation. Ann RevBiochem, 65: 337-65.
Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. Genes & Develop, 17: 1691-702.
Gruss, C. and Sogo, J. M. (1992). Chromatin replication. Bio Essays, 14: 1-8.
Gusella, J. F. (1986). DNA polymorphism and human disease. Ann Rev Biochem, 55: 831-54.

Gutiérrez, A. M., González, E., Echevarría, M., Hernández, C. S. and Whittembury, G. (1995). The proximal straight tubule (PST) basolateral cell membrane water channel: selectivity characteristics. J Membr Biol, 143: 189-97.
Hanawalt, P. C. and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. Nature Rev Mol Cell Biol, 9: 958-70.
Hartlerode, A. J. and Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. Biochem J, 423: 157-68.
Hegde, R. S. and Kang, S. W. (2008). The concept of translocational regulation. JCB, 182(2): 225-32.
Hernández, C S., Gutiérrez, A. M., Ruiz, V., González, E., Echevarría, M. et al. (2002). Canales de agua (aquaporinas) y riñón. AVFT, 21(1). Caracas, ISSN 0798-0264, *versión impresa.*
Hill, A. E. (1994). Osmotic flow in membrane pores of molecular size.J Membrane Biol, 137: 197-203.
Hill, A. E. (1995). Osmotic flow in membrane pores. International Review of Cytology, 163: 1-42.
Hille, B. (2001). *Ionic channels of excitable membranes.* Sinnauer Associates, Sunderland. M. A.
Hirsberg, C. B. and Snider. M. D. (1987). Topography of glycosilation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Ann Rev Biochem, 56: 63-87.
Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T. and Sjöberg, B. M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. Critic Rev Biochem Mol Biol, 47(1): 50-63.
Hoffmann, A., Chiang, C. M., Oelgeschlager, T., Xie, X., Burley, S. K. et al. (1996). A histone-like structure within TFIID. Nature, 380: 356-65.
Horvath, M. P. (2011). Structural anatomy of telomere OB proteins.Critic Rev Biochem Mol Biol, 46(5): 409-35.
Hübscher, U., Maga, G. and Spadori, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. Ann Rev Biochem, 71: 133-63.
Ileng Kumaran, R. I., Thakar, R. and Spector, D. L. (2008). Chromatin dynamics and gene positioning. Cell, 132: 929-34.
Indiani, C. and O'Donnell, M. (2006). The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. Nature Rev Mol Cell Biol, 7: 751-61.
Jacob, F. and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. J Mol Biol, 3: 318-56.
Janetopoulos, C. and Devreotes, P. (2006). Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. JCB, 174(4): 485-90.
Jones, R. M. and Petermann, E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. Biochem J, 443: 13-26.
Josef, J J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. Nature Rev Mol Cell Biol, 7: 335-46.
Joyce, C. M. and Steitz, T. A. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. Ann Rev Biochem, 63: 777-822.
Juárez Oropeza, M. A. (2007). *Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida.* McGraw-Hill.
Kadonaga, J. T. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. Cell, 116: 247-57.
Kaiser, K. and Meisterernst, M. (1996). The human general cofactors. Trends Biochem Sci, 21: 342-5.
Kantidze, O. L. and Razin, S. V. (2009). Chromatin loops, illegitimate recombination, and genome evolution. Bio Essays, 31: 278-86.
Kapp, L. D. and Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. Ann Rev Biochem, 73: 657-704.
Karlson, S., Arthur, W. and Nienhuis. (1985). Developmental regulation of human globin genes. Ann Rev Biochem, 54: 1071-1108.
Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: Structure and function of a chromosomal replicating machine. Ann RevBiochem, 64: 64-71.
Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. Cell, 116: 259-72.

King, L. S. and Agre, P. (1996). Pathophysiology of the aquaporin water channels. Ann Rev Physiol, 58: 619-48.
King, L. S., M. Choi, P. C. Fernández PC, J. P. Cartron, and P. Agre (2001). Defective urinary--concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin. N Engl J Med, 345: 175-9.
Kornberg, A. (1968). The synthesis of DNA. Sci Amer, 219(4): 64-70.
Kornberg, A. (1988). DNA replication. J Biol Chem, 263: 1-4.
Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. Ann Rev Biochem, 65: 367-409.
Kutik, S., Guiard, B., Meyer, H. E., Wiedemann, N. and Pfanner, N. (2007). Cooperation of translocase complexes in mitochondrial proteinimport. JCB, 179(4): 585-91.
Lake, J. A. (1981). The ribosome. Sci Amer, 245(2): 84-97.
Lake, J. A. (1985). Envolving ribosome structure: domains in Archaebacteria, Eubacteria, Eocytes and Eukaryotes. Ann Rev Biochem, 54: 507-30.
Leff, S. E. and Rosenfeld, M. G. (1986). Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. Ann Rev Biochem, 55: 1091-1117.
Le Hir, H. and Séraphin, B. (2008). EJCs at the heart of translational control.Cell, 133: 213-6.
Lehninger, A. (1985). Principles de Biochimie. Flammarion Medicine Sciences.
Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox. M. M. (1995). *Principios de Bioquímica.* 2da. ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.
Lindahl, T. and Barnes, D. E. (1992). Mammalian DNA ligases. Ann Rev Biochem, 61: 251-81.
Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. and Medema, R. H. (2009): The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network.JCB, 185(2): 193-202.
Liu, J., Ehmsen, K. T., Heyer, W. D. and Morrical, S. W. (2011). Presynaptic filament dynamics in homologous recombination and DNA repair.Critic Rev Biochem Mol Biol, 46(3): 240-70.
Li, X. and Manley, J. L. (2006). Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. Genes & Dev., 20: 1838-47.
Lohman, T. M. and Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. Ann Rev Biochem, 65: 169-214.
Lyndaker, A. M. and Alani, E. (2009). A tale of tails: insights into the coordination of 3´-end processing during homologous recombination. Bio Essays, 31: 315-21.
Mahaney, B. L., Meek, K. and Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. Biochem J, 417: 639-50.
Mahler, H. R. y Cordes, E. H. (1971). *Química Biológica.* Ed. Omega.
Maitra, U., Stringer, E. A. and Chaudhuri, A. (1982). Initiation factors in protein biosynthesis. Ann Rev Biochem, 51: 869-990.
Maquat, L. E., Tarn, W. Y. and Isken, O. (2010). The pioneer round of translation: features and functions. Cell, 142: 368-74.
Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. Ann Rev Biochem, 61: 673-719.
Martin, D. W. Jr., Mayes, P. A. and Rodell, V. W. (1982). Bioquímica de Harper. El Manual Moderno, S. A.
Martin, D. et al. (1983). Harper's Review of Biochemistry. 19th ed. California: Lange Medical Publications.
Mattick, J. S., Amaral, P. P., Dinger, M. E., Mercer, T. R. and Mehler, M. F. (2009). RNA regulation of epigenetic processes. Bio Essays, 31: 51-9.
McClure. W. R. (1985). Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Ann Rev Biochem, 54: 171-204.
McKusick, V. A. (1980). The anatomy of human genome. Amer J Med, 69: 267-76.
Meselson, M. and Stahl, F. (1958). The replication of DNA in Escherichia coli. Proc Nat Acad Sci (USA), 44: 671-82.
Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function.Cell, 128: 787-800.
Modrich, P. and Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. Ann Rev Biochem, 65:101-33.
Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. Ann Rev Biochem, 54: 1109-49.

Müller-Esterl, W. (2009). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida.* Reverte.
Muniandy, P. A., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S. and Seidman, M. M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. Critic Rev Biochem Mol Biol, 45(1): 23-49.
Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P. et al. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin1. Nature, 407: 599-605.
Murray, R. K., Granner, D. K. and Rodwell, V. W. (2006). *Harper's Illustrated Biochemistry.* 27th ed. McGraw-Hills.
Nelson, D. L. and Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 4th ed.
Nevins, J. R. (1983). The pathway of eukaryotic mRNA formation. Ann Rev Biochem, 52: 441-66.
Newport, J. W., Douglas, J. and Forbes (1987). The nucleous: structure, function and dynamics. Ann Rev Biochem, 56: 535-65.
Newton, C. S. (1993). Two jobs for the origin recognition complex. Science, 262: 1830-1.
Nielsen, S. B., Smith, L., Christensen, E. L., Knepper, M. A. and Agre, P. (1993). CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. J Cell Biol, 120: 371-83.
Niemela, P. S., Ollila, S., Hyvönen, M. T., Karttunen, M. and Vattulainen, I. (2007). Assessing the nature of lipid raft membranes. Comput Biol 3(2): 34:10-12.
Nirenberg, M. W. (1963). The genetic code II. Sci Amer, 208(3): 80-94.
Noller, H. F. (1984). Structure of ribosomal RNA. Ann Rev Biochem, 53: 119-62.
Nomura, M. (1984). The control of ribosome synthesis. Sci Amer, 250(1): 72-83.
Nomura, M., Gourse, R. and Baughman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal componentes. Ann Rev Biochem, 53: 75-117.
Norbury, C. and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their regulation. Ann Rev Biochem, 61: 441-70.
Nossal, N. G. (1983). Prokaryotic DNA replication systems. Ann Rev Biochem, 52: 581-615.
Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C. (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. Cell, 131: 223-5.
Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. Genes & Develop, 10: 2657-83.
Otera, H. and Mihara, K. (2011). Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. J Biochem, 149(3): 241-51.
Pabo, C. O. (1984). Protein-DNA recognition. Ann Rev Biochem, 53: 293-321.
Pabo, C. O. and Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. Ann RevBiochem, 61: 1053-95.
Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S. and Sharp, P. A. (1986). Splicing of messenger RNA precursors. Ann Rev Biochem, 55: 1119-50.
Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T. and Kadonaga, J. T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. Ann Rev Biochem, 63: 265-97.
Parry, H. D., Scherly, D. and Mattai, I. W. (1989). Snurpogenesis: the transcription and assembly of UsnRNP components. TrendsBiochem Sci, 14: 15-9.
Papp, S., Dziak, E., Michalak, M. and Opas, M. (2003). Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca^{2+}-handling proteins. JCB, 160(4): 475-9.
Payton, R. O. and McEwen, J. E. (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. Sciences, 271(5255): 563-607.
Pfeffer, S. R. and Rothman, J. E. (1987). Byosinthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. Ann Rev Biochem, 56: 829-52.
Platt, T. (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann Rev Biochem, 55: 339-72.
Polacek, N. and Mankin, A. S. (2005). The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. Critic Rev Biochem Mol Biol 40: 285-311.
Powell, K. (2006). Lipid raft idea is floated. JCB 172(2): 166-7.
Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. and Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. Science, 256: 385-7.

Prieto, J., Molina, R. and Montoya, G. (2012). Molecular scissors for *in situ* cellular repair. Critic Rev Biochem Mol Biol, 47(3): 207-21.
Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. Biochem, J 403: 217-34.
Rando, O. J. and Verstrepen, K. J. (2007). Timescales of genetic and epigenetic inheritance. Cell, 128: 655-68.
Reines, D., Conaway, J. W. and Conaway. R. C. (1996). The RNA polymerase II general elongation factors. Trends Biochem Sci, 21: 351-5.
Rhoads, R. E. (1988). Cap recognition and the entry of mRNA into the protein synthesis initiation cycle. Trends Biochem Sci, 13: 52-6.
Roeder, R. C. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem Sci, 21: 327-35.
Sancar, A. (1996). DNA excision repair. Ann Rev Biochem, 65: 43-81.
Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. Ann Rev Biochem, 60: 39-71.
Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y. et al. (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. Nature Rev Genetics, 8: 424-36.
Saparov, S. M., Kozono, D., Rothe, U., Agre, P. and Pohl, P. (2001). Water and ion permeation of aquaporin-1 in planar lipid bilayers. Major different structural determinants and stoichiometry. J Biol Chem, 276: 31515-20.
Sasaki, S., Ishibashi, K. and Marumo, F. (1999). Aquaporin-2 and -3: representatives of two subgroups of the aquaporin family co-localized in the kidney collecting duct. Ann Rev Physiol, 60: 199-220.
Saver, F., Hansen, S. K. and Tjian, R. (1995). Multiple TAFIIs directing synergistic activation of transcription. Science, 270:1783-8.
Sawadogo, M. and Sentenac, A. (1990). RNA polymerase B (II) and general transcription factors. Ann Rev Biochem, 59: 711-54.
Schatz, G. and Robberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. Science, 271(5255): 1519-25.
Schimmel, P. (1987). Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationship in the polypeptides and recognition of transfers RNA. Ann Rev Biochem, 56: 125-58.
Schoenberg, D. R. and Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. Nature Rev Genetics 13: 246-59.
Schramm, L. and Hernández, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. Genes & Develop, 16: 2593-620.
Shaikh, S. R. and Edidin, M. A. (2006). Membranes are not just rafts. Chem Phys Lipids, 144: 1-3.
Simons, K. and Vaz, W. L. C. (2004). Model system, lipid rafts, and cell membranes. Ann Rev Biophys Biomol Struct, 33: 269-95.
Smith, M. et al. (1982). *Human Biochemistry.* McGraw-Hill.
Sommer, P. and Nehrbass, U. (2005). Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. Curr Opin Cell Biol, 17: 294-301.
Stark, G. R. (1984). Gene amplification. Ann Rev Biochem, 53: 447-91.
Steitz, T. A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. Nature Rev Mol Cell Biol, 2008; 9: 242-53.
Stryer, L. (1982). *Bioquímica*. Ed. Reverté S.A.
Sung, P. and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. Nature Rev Mol Cell Biol, 7: 739-50.
Sütterlin, C. and Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. JCB, 188(5): 621-8.
Taussing, R. and Gilman, A. G. (1995). Mammalian membrane-bound adenyl cyclases. J Biol Chem, 270: 1-4.
Thomas, M. C. and Chiang, C. M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. Critic Rev Biochem Mol Biol, 41: 105-78.

Tomilin, N. V. (2008). Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. Bio Essays, 30: 338-48.
Turchi, J. J., Siegal, G. and Bambara, R. A. (1992). DNA helicase E and DNA polymerase? functionally interact for displacement synthesis. Biochemistry, 31: 9008-15.
Vainio, S., Jansen, M., Koivusalo, M., Róg, T., Karttunen, M. et al. (2006). Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. J Biol Chem, 281: 348-55.
Valencia-Sánchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. and Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes. & Develop, 20: 515-24.
Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inzé, D. and De Veylder, L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. Critic Rev Biochem Mol Biol, 44(4): 143-68.
Venkitaraman, A. R. (2010). Modifying chromatin architecture during the response to DNA breakage. Critic Rev Biochem Mol Biol, 45(1): 2-13.
Venters, B. J. and Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. Critic Rev Biochem Mol Biol, 44(2-3): 117-41.
Vinciguerra, P. and Stutz, F. (2004). mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. Curr Opin Cell Biol, 16: 285-92.
Voet, D. and Voet, J. G. (1995). *Biochemistry.* 2nd. ed. John Wiley and sons. Inc. Bioquímica.
Voet, D. and Voet, J. G. (2006). *Bioquímica.* Ed. Médica Panamericana.
Von Hippel, P. H., Bear, D. G., Morgan, W. D. and McSwiggen, J. A. (1984). Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. Ann Rev Biochem, 53: 389-446.
Waldman, A. S. (2008). Ensuring the fidelity of recombination in mammalian chromosomes. Bio Essays, 30: 1163-71.
Walker, G. C. (1985). Inducible DNA repair systems. Ann Rev Biochem, 54: 425-57.
Wang, J. C. (1996). DNA topoisomerases. Ann Rev Biochem, 65: 635-92.
Wang, L. C. and Gautier, J. (2010). The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. Critic Rev Biochem Mol Biol, 45(5): 424-39.
Wang, T. S. F. (1991). Eukaryotic DNA polymerases. Ann Rev Biochem, 60: 513-52.
Warren, B. (1996). Membrane partition during cell division. Ann Rev Biochem, 62: 19.
Waring, M. J. (1981). DNA modifications and cancer. Ann Rev Biochem, 50: 159-92.
Watson, J. (2006). *Biología molecular del gen.* Ed. Médica Panamericana.
Weinberg, R. A. (1985). The molecules of life. Sci Amer, 253(4): 48-57.
West, S. C. (1992). Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. Ann Rev Biochem, 61: 603-40.
White, R. J. and Jackson, S. P. (1992). The TATA-binding protein: a central role in transcription by RNA polymerases I, II and III. Trends Genet, 8: 284-8.
Whittembury, G., González, E., Hernández, C. S., Gutiérrez, A. M. and Echevarría, M. (1997). Length of the selectivity filter of aquaporin-1. Biology of the cell, 89: 299-306.
Whittembury, G., González, E., Hernández, C. S., Gutiérrez, A. M. and Echevarría, M. (1997). Transport of water in proximal kidney tubules. From whole tubules to single channels: length and section of the selectivity filter of aquaporin-1. Wien Klin Wochenschr, 109: 477-84.
Whittembury, G. and Hill, A. (2000). Coupled transport of water and solutes across epithelia. I
Whittembury, G., Sugino, N. and Solomon, A. K. (1960). Effect of antidiuretic hormone and calcium on the equivalent pore radius of kidney slicesfrom Necturus. Nature, 187: 699-703.
Wilson, D. N. and Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. Critic Rev Biochem Mol Biol, 40:243-67.
Wittmann, H. G. (1982). Components of bacterial ribosomes. Ann Rev Biochem, 51: 155-83.
Wittmann, H. G. (1983). Architecture of prokaryotic ribosomes. Ann Rev Biochem, 52: 35-65.
Wold, F. (1981). In vivo chemical modifications of proteins. Ann Rev Biochem, 50: 783-814.
Wood, R. D. (1996). DNA repair in eukaryotes. Ann Rev Biochem, 65: 135-67.
Wu, T. T. (2002). Analytical molecular biology. Kluwer Academy Publishers. New York.
Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. Cell, 124: 471-84.

ÍNDICE ALFABÉTICO

A

ácido/ 380, 382, 386, 407, 522, 539, 540, 572, 586, 596, 614, 628, 643, 650
  desoxirribonucleico/ 406
  hialurónico/ 386
  siálico/ 382
acoplamiento/ 494, 525, 573, 575, 619
  vacilante/ 573, 575
actina/ 416, 417, 418, 419, 424, 425, 444, 447
  F/ 417
  G/ 417, 418
  globular/ 417
  polimerizada/ 417
actinomicina D/ 522
activación/ 383, 416, 444, 480, 481, 487, 499, 500, 501, 503, 509, 510, 516, 531, 545, 596, 616, 617, 619, 658, 676, 689, 691, 694
acuaporina (aquaporina)/ 391, 393
adenina/ 463, 494, 517, 531, 535, 545, 551, 553, 554, 560, 574, 586, 603, 642, 643, 644, 654, 656, 657, 661
adenosín/ 691
  difosfato. *Véase* ADP
  monofosfato. *Véase* AMP
  monofosfato cíclico. *Véase* AMPc
  trifosfato. *Véase* ATP
ADN/ 385, 427, 428, 429, 430, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 448, 450, 452, 453, 454, 455, 456, 459, 460, 461, 463, 464, 466, 467, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 479, 480, 485, 486, 487, 488, 489, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 539, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 551, 553, 554, 555, 556, 558, 559, 563, 564, 565, 569, 573, 575, 576, 577, 580, 587, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 636, 637, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 646, 647, 650, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 676, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 685, 686, 687, 688, 689, 691, 693, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711
  circular/ 497, 498
  complementario/ 697
  doble hélice del/ 496, 524, 541, 543, 564
  helicasa/ 672
  ligasa/ 500, 508, 510, 511, 519, 525, 623, 624, 626, 628, 629, 631, 661, 663, 666, 668, 670, 697, 698, 699, 702
  polimerasa/ 492, 497, 499, 500, 501, 504, 505, 509, 511, 515, 519, 522, 626, 627, 628, 633, 661, 662, 663, 668, 670, 697, 698, 701
    dependiente de ARN/ 697
    I/ 492, 500, 626, 627, 628, 701
    III/ 497, 499, 500
  ribosomal/ 541
  satélite/ 459, 460, 461
  topoisomerasa/ 440, 487, 497, 498, 502, 503, 506, 508, 522, 525, 626, 629, 633, 636, 637
  topoisómeros del/ 496
ADNr/ 464, 541
ADP/ 619, 668
agentes/ 379, 383, 453, 487, 639, 641, 643, 644, 646, 650, 653, 656, 657, 658, 660, 661, 665, 666, 671, 707
  alquilantes/ 657, 660
  mutagénicos/ 644, 650
alelos/ 456, 457, 458, 621, 632, 688, 689, 705, 706
aminoacil-ARNt sintetasas/ 596, 597, 617
AMP/ 510, 596, 597, 616, 691
AMPc/ 681, 691, 693, 703
anafase/ 446, 447, 449, 484, 485, 500, 632, 633
análogos de bases/ 642, 650, 657
anfipáticos/ 377, 378, 398
aniones/ 395
antibióticos/ 524, 558, 591, 617, 618, 619, 665, 700, 702, 703
  actinomicina D/ 522
  cloranfenicol/ 617

estreptomicina/ 591, 617, 619
puromicina/ 617
rifampicina/ 558, 559, 560
tetraciclina/ 701, 702
anticodón/ 573, 574, 575, 576, 584, 586, 590, 597, 600, 606, 609, 612
anticuerpos/ 582, 630
antígenos/ 383, 459
antiporte/ 394, 395
aparato de Golgi/ 401, 405, 406, 407, 408, 412, 413, 414, 444, 447, 448, 450, 615
ARN/ 427, 428, 435, 436, 437, 438, 439, 448, 454, 455, 456, 460, 461, 463, 466, 467, 469, 470, 472, 476, 478, 489, 495, 497, 499, 500, 504, 505, 506, 515, 516, 524, 525, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 547, 549, 551, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 565, 573, 577, 578, 579, 580, 581, 584, 586, 587, 588, 593, 606, 615, 653, 663, 678, 679, 680, 681, 685, 690, 693, 697, 702, 710
de interferencia/ 461, 529
iniciador/ 495, 499, 500, 506, 516, 524, 525
largos no codificantes/ 461
mensajero/ 427, 435, 436, 448, 452, 461, 462, 463, 464, 465, 467, 468, 472, 527, 528, 529, 537, 539, 543, 545, 547, 548, 549, 551, 553, 554, 555, 557, 559, 560, 563, 564, 565, 567, 568, 570, 571, 573, 574, 575, 576, 577, 580, 581, 585, 586, 587, 589, 594, 596, 598, 599, 600, 601, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 612, 613, 614, 615, 617, 618, 619, 630, 649, 677, 678, 679, 680, 683, 684, 685, 686, 690, 691, 692, 693, 694, 696, 697, 702, 704, 708
nucleares cortos/ 461, 529, 549, 551, 560
polimerasa bacteriana/ 528
polimerasa I/ 461, 470, 540, 541, 542, 543, 559, 560, 587
polimerasa II/ 455, 461, 540, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 552, 553, 554, 555, 558, 559, 560, 587
polimerasa III/ 461, 540, 541, 556, 557, 558, 559, 560, 587
telomérico/ 461
transferencia/ 435, 436, 451, 456, 461, 466, 467, 472, 476, 488, 497, 523, 525, 527, 528, 537, 538, 539, 545, 556, 557, 558, 559, 560, 565, 567, 570, 573, 574, 575, 576, 578, 581, 585, 586, 590, 593, 594, 596, 597, 598, 599, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 608, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 623, 633, 660, 684, 700, 711
ARNr/ 437, 438, 461, 464, 466, 467, 469, 470, 528, 529, 537, 539, 541, 542, 556, 557, 559, 560, 578, 579, 580, 581, 582, 584, 586, 587, 588, 589, 590
ásteres/ 446
ATP/ 395, 396, 408, 417, 418, 419, 420, 436, 441, 445, 479, 481, 482, 483, 496, 508, 510, 529, 533, 536, 539, 545, 551, 578
ATPasa Na+-K+ dependiente/ 395, 397, 398
autofagia/ 410, 411
autofagosomas/ 409, 410

B

bacteriófagos/ 497
balsa lipídica/ 383
bases nitrogenadas/ 453, 454, 469, 471, 472, 492, 496, 498, 506, 523, 527, 538, 546, 575
bicapa/ 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 387, 388, 398, 402, 406
biogénesis/ 540, 577, 587, 590
bombas/ 394, 398

C

canales/ 380, 381, 383, 384, 385, 387, 388, 389, 397, 421, 433, 439, 540
cargas eléctricas/ 395
carioesqueleto/ 438
cariotipo/ 440, 442, 443, 449
casquete/ 543, 547, 548, 549, 550, 555, 560
catalasa/ 412
cationes/ 395
caveolas/ 383
caveolinas/ 383
célula eucariota/ 401
células bacterianas/ 497
celulosa/ 386
centríolos/ 407, 420, 421, 425, 445, 446
centro celular/ 420
centros organizadores/ 420, 425
ciclinas/ 444, 480, 481, 482, 485, 487, 488, 489, 500
ciclo celular/ 439, 443, 444, 448, 451, 455, 468, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 499, 502, 514, 519, 521, 524, 525, 590
ciclosis/ 419
cilios/ 415, 419, 421, 425
cinetocoro/ 445, 446, 447
cisternas/ 403, 404, 407, 408
cistrón/ 683, 694
citidín
monofosfato. *Véase* CMP
trifosfato. *Véase* CTP
citocalasina/ 425, 426
citocentro/ 420
citocromo P450/ 407
citoesqueleto/ 415
citoplasma/ 397, 404, 411, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 432, 435, 436, 437,

438, 448, 449, 462, 470, 479, 527, 529, 530, 542, 547, 551, 553, 555, 558, 577, 578, 580, 587, 588, 589, 590, 606, 625, 686, 691, 694
soluble/ 416
citoquinesis/ 632
citosina/ 494, 512, 513, 517, 533, 574, 642, 643, 654, 656, 657, 659, 661, 687
citosol/ 406, 415, 416, 424, 446, 560, 615, 692
Cl-/ 395, 397
clatrina/ 412
clonación/ 696, 701, 703
in vitro/ 701
cloranfenicol/ 617
cloroplastos/ 401, 413, 577, 590
código genético/ 452, 563, 564, 565, 567, 568, 569, 570, 572, 573, 575, 594, 644, 645, 697
carácter degenerado/ 565, 570, 572, 576, 644, 645, 697
carácter quasiuniversal/ 576
estructura del/ 570, 576
necesidad del/ 563
codón/ 537, 555, 564, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 581, 584, 586, 590, 594, 597, 600, 601, 602, 603, 604, 606, 608, 609, 611, 612, 613, 619, 641, 645, 649, 694, 704, 705
de iniciación/ 569
de terminación/ 569, 572, 576, 604, 612, 613, 619, 645, 694
codones/ 555, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 594, 596, 601, 603, 604, 608, 612, 614, 618, 619, 645, 646, 649, 684, 693, 704
de terminación/ 555, 570, 572, 604, 612, 614, 619, 645, 704
sinónimos/ 564, 570, 575
cohesinas/ 440, 444, 445, 520, 521, 524, 525
colchicina/ 419, 426, 475
colesterol/ 377, 378, 379, 380, 383, 385
complejo/ 376, 401, 406, 413, 430, 432, 433, 434, 435, 437, 438, 439, 445, 446, 447, 455, 468, 479, 482, 484, 485, 486, 487, 488, 491, 497, 499, 500, 501, 502, 503, 506, 507, 508, 509, 510, 514, 520, 521, 523, 524, 525, 528, 532, 533, 534, 542, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 551, 552, 554, 555, 558, 559, 567, 587, 588, 589, 590, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 605, 606, 608, 609, 610, 614, 615, 616, 617, 618, 621, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 636, 643, 655, 661, 663, 665, 666, 667, 668, 670, 678, 680, 681, 687, 690, 692, 693, 710
de preiniciación/ 499, 501, 524, 528, 544, 545, 598
de reconocimiento del origen/ 500, 502
mediador/ 544
prerreplicativo/ 499, 500, 501, 502, 503, 510, 521, 524, 525
promotor de la anafase/ 446, 484, 500
SCF/ 484
componentes moleculares/ 377, 415, 472, 473, 475, 476, 478, 485, 577
composición molecular/ 578, 579
concentración iónica/ 395
extracelular/ 395
intracelular/ 395
condensinas/ 441, 444, 445, 448
conjugación/ 623, 636, 700
correpresor/ 682, 683, 693
cotransporte/ 394
cromátidas/ 440, 441, 444, 445, 446, 447, 449, 489, 520, 521, 632, 633
cromatina/ 427, 429, 431, 438, 439, 440, 441, 445, 446, 448, 449, 455, 465, 469, 471, 479, 489, 499, 500, 519, 520, 539, 540, 541, 543, 547, 551, 559, 686, 687, 688, 693
cromosomas/ 421, 427, 428, 432, 437, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 454, 455, 456, 460, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 479, 485, 491, 500, 512, 514, 515, 520, 528, 541, 587, 621, 622, 623, 625, 632, 633, 634, 635, 636, 657, 688, 700, 701, 705, 706, 707, 708
acrocéntricos/ 467
autosómicos/ 455, 466
cariotipo/ 440, 442, 443, 449, 671
centrómeros/ 419, 439, 442, 445, 447, 460, 467, 469, 499, 520, 701
metacéntricos/ 443
satélites/ 439, 442, 460
sexuales/ 443, 455, 466
submetacéntricos/ 443
telómeros/ 439, 440, 460, 467, 469, 479, 499, 512, 514, 515, 516, 517, 525, 529, 701
CTP/ 417, 528, 529
cuerpo residual/ 410

D

daños al ADN/ 473, 489, 656, 657, 658, 661, 671
deleción/ 518, 640, 641, 646, 648, 650, 656
desmosomas/ 397
despolarización/ 397
despolimerización de la actina/ 417
dictiosomas/ 407, 413
diferenciación de la membrana plasmática/ 397
difosfatidil glicerol/ 390, 392, 393
difusión simple/ 387, 388, 389, 394, 398, 399, 434
dímeros/ 431, 440, 547, 548, 579, 657, 659, 663, 665
de pirimidina/ 641
de timina/ 657, 659, 663, 665
dineína/ 420
disponibilidad de áreas de superficie/ 450
división mitótica/ 427, 442
doble hélice del ADN/ 496, 524, 541, 543, 564

E

endocitosis/ 385, 387, 398, 419
endomembranas/ 377, 401, 402, 403, 412, 413
endonucleasas de restricción/ 673
endoplasma/ 416
envoltura nuclear/ 389, 402, 416, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 453, 527, 589, 632, 685
enzimas/ 375, 376, 380, 381, 383, 385, 393, 398, 402, 403, 406, 407, 408, 409, 410, 412, 414, 416, 422, 423, 424, 425, 446, 448, 450, 455, 459, 468, 471, 481, 482, 487, 492, 494, 495, 496, 506, 511, 517, 523, 524, 528, 529, 530, 539, 540, 547, 548, 550, 565, 586, 596, 597, 614, 615, 617, 619, 623, 626, 629, 654, 655, 656, 661, 665, 668, 676, 677, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 693, 696, 698, 699, 701, 702, 705, 706, 709, 711
  de restricción/ 654, 655, 656, 698, 699, 705, 706, 709
  hidrolíticas/ 408
  lisosomales/ 408, 409, 410, 414
epigenética/ 687, 710
esfingolípidos/ 377, 378, 383
esfingomielina/ 378
espacio/ 383, 387, 388, 395, 396, 402, 403, 405, 418, 428, 429, 430, 434, 435, 436, 437, 440, 448, 450, 499, 512, 523, 539, 540, 572, 626, 689, 692
  extracelular/ 395, 692
  intermembranas/ 430
  intermembranoso/ 448
  intranuclear/ 430
  perinuclear/ 430, 437
ésteres/ 377, 481
estreptomicina/ 591, 617, 619
exocitosis/ 387, 408, 419, 421
exones/ 462, 463, 468, 469, 470, 543, 548, 551, 552, 553, 555, 560, 649
exoplasma/ 416

F

factores/ 417, 422, 435, 437, 453, 455, 480, 485, 488, 498, 501, 518, 523, 524, 528, 530, 539, 540, 541, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 553, 557, 558, 560, 575, 585, 595, 598, 599, 601, 602, 603, 604, 606, 608, 609, 613, 618, 619, 646, 675, 685, 689, 690, 691, 692, 693, 694
  de iniciación/ 585, 595, 598, 606, 618
  de liberación/ 595, 604, 613, 619
  de traducción/ 595, 692
  de transcripción/ 435, 539, 540, 541, 543, 545, 557, 558, 689, 690, 694
factor rho/ 536
fagocitosis/ 387, 418, 425
familias/ 464, 465, 466
  génicas/ 464
fases del ciclo celular/ 444, 487
  G0/ 479
  G1/ 474, 475, 477, 479, 481, 482, 485, 486, 487, 488, 501, 502, 510, 521, 524, 525, 537
  G2/ 444, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 482, 485, 486, 488, 516, 537, 632, 713
  M/ 443, 444, 474
  S/ 444, 484, 485, 486, 501, 509, 516, 521, 524, 670
fenotipo/ 454, 455, 457, 458, 469, 518, 519, 593, 623, 640, 641, 645, 647, 648, 650, 651, 699
filamentos intermedios/ 415, 421, 422, 425, 426, 431, 444, 448
flagelos/ 415, 419, 421, 425
flip-flop/ 406
fluidez/ 378, 380, 383
formilmetionina/ 594, 599, 614
fosfatidil/ 478
  colina/ 478
fosfátidos de glicerina/ 377, 378
fosfoproteínas/ 480, 481, 487, 488, 500
  fosfatasas/ 480, 481, 487, 488, 500
fragmentos/ 410, 459, 493, 496, 498, 500, 506, 508, 511, 516, 518, 524, 525, 587, 655, 656, 696, 697, 698, 699, 705, 706, 707, 708
  de ADN/ 493, 524
  de Okasaki/ 493, 500, 506, 508, 511, 524, 525
fucosa/ 382, 459
funciones/ 375, 376, 377, 379, 380, 382, 383, 386, 396, 398, 399, 402, 403, 407, 412, 413, 414, 415, 419, 420, 421, 422, 425, 426, 428, 431, 448, 450, 451, 453, 454, 459, 461, 466, 468, 469, 470, 471, 472, 480, 521, 527, 529, 530, 555, 563, 615, 617, 647, 653, 679, 710
  de la membrana plasmática/ 386
  de los microtúbulos/ 421
  generales de los organelos membranosos/ 402

G

galactosa/ 382, 458, 459, 468, 677
GDP/ 435, 436, 437, 566, 595, 600, 602, 605, 606, 608, 609, 610, 611, 612, 619
gen/ 437, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 461, 462, 463, 464, 465, 468, 469, 470, 472, 480, 485, 511, 515, 525, 528, 530, 534, 539, 540, 541, 548, 551, 553, 555, 556, 558, 560, 561, 563, 621, 622, 628, 631, 635, 636, 640, 641, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 665, 671, 672, 678, 679, 682, 686, 690, 693, 694, 696, 697, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 708, 709, 719
  regulador/ 678, 679, 682, 693, 694
generación de nuevas membranas/ 403, 413
genoma/ 437, 448, 452, 453, 454, 455, 457, 459, 462, 463, 466, 467, 468, 469, 470, 508, 514, 518, 530, 541, 551,

555, 570, 576, 587, 623, 625, 633, 648, 663, 664, 686, 688, 696, 697, 699, 705, 707, 709, 710
humano/ 437, 453, 454, 466, 467, 468, 469, 470, 508, 551, 648, 705
genotipo/ 457, 458, 469, 470, 593, 640, 647, 648, 651
glicolípidos/ 381, 382, 398, 408
glicoproteínas/ 381, 382, 384, 386, 398, 404, 408
glicosilaciones/ 408, 413
glóbulos de grasa/ 422
glúcidos de membrana/ 381
glucolípidos/ 379
glucosa/ 382, 423, 459, 479, 677, 680, 681, 703, 704
gradiente de concentración/ 387, 394, 395, 398
gránulos de glucógeno/ 423, 424
GTP/ 413, 417, 419, 435, 436, 437, 529, 550, 586, 595, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 605, 606, 608, 610, 611, 612, 613, 616, 617, 618, 619
guanilato transferasa/ 548
guanina/ 494, 514, 517, 548, 550, 560, 595, 602, 603, 642, 643, 644, 649, 656
guanosín
difosfato. *Véase* GDP
monofosfato. *Véase* GMP
trifosfato. *Véase* GTP

H

H+/ 392, 395, 408
H1/ 440, 465, 668
H2a/ 440
H2b/ 440
H3/ 436, 440, 465, 520, 547, 633, 689
H4/ 436, 440, 465, 520, 688, 689
hebra/ 453, 466, 492, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 503, 504, 506, 507, 508, 509, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 524, 529, 530, 531, 532, 535, 546, 558, 559, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 633, 634, 636, 650, 655, 656, 657, 658, 661, 663, 665, 666, 667, 668, 670, 703
conducida/ 498, 504, 506, 509, 511, 515, 516, 518
conductora/ 498, 504, 506, 508, 516, 524
hemoglobina/ 454, 456, 462, 465, 468, 469, 565, 594, 614, 640, 647, 648, 649, 650
heterocigótico/ 457, 458, 707
heterocromatina/ 439, 440, 442, 448, 461, 499, 520, 693
heterofagia/ 410, 411
heterofagosomas/ 409, 410
heteropolisacárido/ 386
hibridación/ 460, 701, 706, 707
hiperpolarización/ 397
histonas/ 435, 436, 439, 440, 442, 448, 455, 461, 465, 469, 476, 488, 499, 512, 520, 524, 547, 668, 687, 688, 689, 690, 693, 694
H1/ 668
H2A/ 547
H2b/ 436, 465, 547
H3/ 547, 633
H4/ 688
homocigótico/ 457, 458, 707
horquilla/ 498, 499, 504, 506, 508, 514, 516, 520, 522, 525, 535, 600, 606, 607, 630, 631, 644
de replicación/ 498, 499, 504, 508, 520, 644
huso/ 425, 441, 444, 445, 446, 447, 449, 460, 632

I

impronta/ 687, 688, 689, 693, 694
genómica/ 687, 688, 693, 694
impulso nervioso/ 395, 397
inclusiones citoplasmáticas/ 415, 425
incorporación/ 398, 405, 406, 410, 412, 418, 463, 474, 476, 478, 502, 504, 506, 517, 533, 542, 544, 546, 551, 559, 566, 570, 599, 600, 602, 603, 606, 608, 611, 616, 617, 618, 656, 681, 683, 688, 704, 708, 709
cotraduccional/ 405
inducción/ 421, 475, 477, 677, 678, 682, 690, 693, 694, 704
enzimática/ 677
inductores/ 677, 678, 679
inhibidores/ 444, 475, 480, 481, 488, 489, 497, 522, 524, 525, 530, 558, 559, 591, 617, 618, 693, 694, 703
de la replicación/ 522
de la traducción/ 617, 618
de la transcripción/ 558, 559
iniciación/ 447, 463, 496, 497, 501, 504, 505, 506, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 537, 539, 541, 543, 544, 545, 548, 555, 556, 558, 560, 569, 570, 576, 585, 591, 593, 594, 595, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 604, 605, 606, 609, 610, 616, 617, 618, 619, 623, 636, 641, 645, 649, 690, 704
de la replicación/ 503
de la traducción/ 463, 548, 555, 585, 591, 598, 606
inmunoglobulinas/ 455, 462, 630, 635, 636
inositol/ 378, 476, 489
interfase/ 420, 427, 437, 438, 439, 440, 445, 447, 448, 455, 473, 581
intermembranas/ 430
intermembranoso/ 448
intrones/ 462, 463, 466, 469, 470, 543, 548, 549, 550, 551, 552, 557, 560, 649, 696, 697, 711

J

jugo nuclear/ 427, 428, 431, 448

K

K+/ 383, 392, 395, 396, 397, 398

L

lámina nuclear/ 430, 431, 432, 439, 448
laminina/ 431
  A/ 431
  B/ 431
ligamiento/ 622
lípidos/ 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 386, 398, 402, 404, 406, 413, 422, 450, 459, 472, 476, 478, 488
  en distintas membranas/ 386
liposomas/ 379
lisosomas/ 401, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 450, 468, 615
  primarios/ 408, 409, 410, 414
  secundarios/ 409, 414
lumen o espacio cisternal/ 403

M

manosa/ 382, 408, 413, 615
  6 fosfato/ 408, 413
MAP/ 420
material genético/ 427, 439, 448, 449, 451, 452, 453, 469, 471, 523, 625, 633, 639, 640, 647, 650, 654, 670, 672, 694, 700, 710
matriz citoplasmática/ 416
meiosis/ 622, 625, 632, 635, 636, 713
membrana/ 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 390, 392, 393, 395, 396, 397, 398, 399, 401, 402, 403, 405, 406, 407, 408, 410, 412, 413, 414, 416, 417, 418, 419, 421, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 438, 445, 446, 447, 448, 450, 453, 458, 469, 470, 476, 478, 522, 586, 589, 615, 616, 653, 672, 677, 681, 686
  de células animales/ 385, 386, 412, 492, 577
  del eritrocito/ 384, 386
  hepática/ 386
  semipermeable/ 388
membranas/ 377, 392, 450
  bacterianas/ 378
  biológicas/ 377, 378, 379, 382, 383, 389, 398, 399, 403, 450
  intracelulares/ 393, 402, 414
  plasmáticas/ 380, 383, 385, 386, 398
metabolismo del peróxido de hidrógeno/ 412
metafase/ 444, 446
metilación/ 479, 510, 511, 512, 513, 524, 549, 654, 655, 656, 687, 688, 689, 693
  del ADN/ 479, 510, 512, 524, 687, 693
Mg2+/ 395, 495, 596, 598, 655
microARN/ 461, 467, 529
microfilamentos/ 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 425, 426
microtúbulos/ 415, 416, 419, 420, 421, 424, 425, 426, 441, 442, 444, 445, 446, 447
  funciones de los/ 421
microvellosidades/ 383, 397, 417
MIE/ 386
mielina/ 386
miosina/ 444, 447
MIT/ 386
mitocondrias/ 376, 377, 401, 402, 404, 413, 428, 448, 450, 468, 570, 577, 578, 580, 590, 615
mitosis/ 418, 420, 421, 426, 427, 431, 439, 442, 443, 444, 446, 448, 449, 450, 473, 474, 475, 476, 478, 479, 480, 485, 489, 502, 512, 520, 521, 525, 632, 635, 716
modelo del mosaico fluido/ 382
mongolismo/ 443
morfogénesis/ 421, 425
mosaico fluido/ 382, 402, 413, 450
movimiento ameboide/ 419
MPE/ 386
MPH/ 386
mutación/ 435, 457, 458, 525, 561, 619, 635, 639, 640, 641, 644, 645, 646, 647, 648, 650, 651, 665, 671, 673, 688, 694, 706
mutaciones/ 390, 452, 454, 455, 458, 463, 525, 621, 622, 628, 635, 636, 639, 640, 641, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 657, 665, 666, 671, 672, 673, 705, 710
  consecuencia de las/ 645
  cromosómicas/ 640
  espontáneas/ 648
  génicas/ 640, 641, 644, 650
  puntuales/ 645
mutagénesis/ 640
mutágenos/ 641, 643, 644, 648, 650
  químicos/ 643, 650
mutante/ 454, 455, 457, 458, 619, 639, 640, 645, 647, 650, 673, 699

N

Na+/ 383, 389, 395, 396, 397, 398
neurofilamentos/ 422
nexina/ 420
nexus/ 397
núcleo/ 376, 401, 402, 404, 407, 417, 419, 420, 425, 427, 428, 429, 430, 433, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 462, 470, 479, 480, 499, 515, 523, 527, 528, 530, 531, 532, 533, 534, 539, 540, 544, 548, 557, 559, 560, 578, 587, 615, 644, 653, 657, 690, 691, 692, 711

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

nucléolo/ 427, 429, 437, 438, 444, 448, 449, 489, 541, 559, 587, 589
nucleoplasma/ 428, 438
nucleoplasmina/ 435, 440
nucleoporinas/ 432, 433
nucleoproteínas/ 549
nucleosomas/ 439, 440, 442, 506, 512, 520, 521, 523, 524, 539, 540, 547, 633, 688
nucleótidos/ 441, 442, 459, 462, 492, 494, 495, 496, 497, 500, 504, 506, 515, 516, 517, 518, 519, 530, 533, 534, 538, 539, 543, 545, 546, 547, 551, 553, 554, 555, 560, 564, 566, 570, 578, 579, 580, 595, 601, 603, 605, 606, 608, 615, 628, 633, 634, 656, 657, 660, 661, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 683, 698, 699

O

operador/ 464, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 693, 694, 703, 704, 711
operón/ 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 693, 694, 702, 703, 704, 705
organelos/ 376, 377, 401, 402, 403, 405, 406, 408, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 421, 424, 448, 450, 468, 577
  citoplasmáticos/ 377, 577
  membranosos/ 401, 450
  membranosos intracelulares/ 401, 450
  membranosos subcelulares/ 401, 468
organizadores nucleolares/ 437, 448
origen/ 409, 410, 414, 437, 469, 472, 479, 480, 488, 491, 497, 498, 500, 501, 502, 503, 506, 509, 514, 516, 517, 524, 549, 555, 556, 564, 577, 632, 640, 641, 644, 645, 647, 654, 657, 663, 671, 679, 689, 694, 697, 711
  de la replicación/ 497, 502, 506

P

par cromatina-cromosoma/ 438
paso selectivo/ 398, 430, 432, 448, 450
pectina/ 386
permeabilidad selectiva/ 386
peroxidasa/ 412
peroxisomas/ 401, 411, 412, 413, 414, 450, 615
placa ecuatorial/ 446, 632
placoda/ 421
plasmalógenos/ 379
plasmasol/ 416
plásmidos/ 623, 625, 697, 700, 701, 702, 703, 708, 709
polaridad celular/ 421
poliadenina/ 553
polirribosomas/ 589
polisomas/ 589, 590, 591
poro nuclear/ 430, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 447, 448, 542, 558, 588, 589
poros/ 384, 387, 389, 390, 429, 430, 431, 433, 438, 447, 448, 449
potenciador/ 606
potencial/ 395, 397, 403, 659, 688
  de membrana en reposo/ 397
  electroquímico/ 395
  energético/ 395
proceso de corte y empalme/ 560
profase/ 444, 445, 446, 449, 473, 489, 632, 636
profilina/ 417, 418, 425
promotor/ 446, 461, 463, 484, 485, 500, 525, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 547, 555, 557, 559, 560, 646, 649, 676, 678, 679, 680, 681, 683, 685, 690, 693, 694, 702, 703, 704, 705, 709, 711
promotores/ 461, 469, 485, 531, 532, 539, 543, 557, 558, 560, 641, 685, 687, 690, 693, 702
proteína/ 383, 384, 385, 387, 394, 398, 399, 406, 408, 409, 412, 413, 414, 416, 417, 419, 424, 425, 427, 435, 436, 437, 439, 440, 441, 445, 446, 447, 454, 455, 456, 457, 458, 461, 463, 465, 468, 469, 470, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 496, 501, 502, 503, 504, 506, 507, 509, 512, 515, 520, 521, 524, 525, 531, 534, 535, 536, 541, 543, 544, 547, 553, 555, 559, 560, 561, 563, 564, 565, 568, 570, 571, 572, 576, 577, 579, 582, 584, 586, 591, 593, 594, 595, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 612, 614, 615, 616, 617, 619, 628, 629, 630, 633, 636, 637, 640, 641, 645, 646, 647, 648, 660, 663, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 690, 691, 692, 693, 694, 696, 703, 704, 705
  chaperona/ 440
  replicativa A/ 496, 503
proteínas/ 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 393, 394, 395, 397, 398, 399, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 431, 432, 433, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 444, 445, 446, 447, 448, 450, 452, 454, 455, 459, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 476, 478, 479, 480, 481, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 491, 495, 496, 497, 498, 499, 501, 503, 511, 512, 514, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 527, 529, 530, 531, 532, 534, 535, 536, 539, 540, 542, 543, 544, 546, 548, 549, 551, 553, 555, 556, 560, 561, 563, 564, 565, 567, 568, 569, 570, 571, 573, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 600, 601, 603, 604, 605, 606, 608, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 628, 630, 631, 633, 636, 645, 647, 653, 656, 660, 661, 663, 665, 666, 667, 668, 670, 671, 672, 677, 678, 679, 681, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 697, 700, 701, 702, 704, 705, 708, 709, 710, 711
  de la lámina/ 431, 439
  de la membrana/ 431
  de unión al ADN de hebra simple (SSB)/ 496, 497
  integrales o intrínsecas/ 381

periféricas o extrínsecas/ 381
transmembranales/ 381, 385, 387, 389, 390, 393, 394, 431
transportadoras/ 380, 381, 383, 384, 393, 398, 409, 450
proteólisis parcial/ 408, 413, 615
protofilamentos/ 419
puromicina/ 617

Q

quinasas dependientes de ciclinas/ 480, 481, 482

R

receptores/ 381, 383, 385, 386, 398, 405, 408, 410, 421, 435, 455, 480, 689, 706
de membrana/ 381, 383, 385
recombinación/ 452, 473, 621, 622, 623, 624, 625, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 635, 636, 637, 646, 647, 659, 661, 668, 670, 672, 673, 698, 699, 702, 703, 709, 710
enzimología de la/ 628
genética/ 452, 621, 622, 623, 628, 629, 633, 635, 636, 637, 710
homóloga/ 623, 632, 668, 670, 672, 673
modelo de Holliday/ 625, 637
región/ 408, 420, 439, 441, 448, 454, 463, 465, 515, 532, 553, 555, 561, 607, 622, 688, 689, 703, 705, 707
regulación de la expresión genética/ 459, 681, 693, 694
regulación del ciclo celular/ 485
relaciones/ 403, 408, 412, 414, 584
del sistema de endomembranas/ 412
entre los organelos membranosos/ 403
reparación del ADN/ 440, 488, 639, 661, 670, 671, 672, 673
de malos apareamientos/ 518
directa/ 659
indirecta/ 661
por escisión de bases/ 661, 662
por escisión de nucleótidos/ 661, 663, 665, 666, 671
por recombinación/ 670
replicación del ADN/ 452, 472, 474, 475, 479, 480, 485, 486, 487, 491, 492, 494, 495, 501, 508, 509, 516, 518, 519, 521, 523, 524, 525, 632, 670, 673, 695, 710
carácter antiparalelo/ 494, 496
carácter semiconservativo/ 493, 494, 656
en eucariontes/ 494
etapas de la/ 496
fidelidad de la/ 516
inhibidores de la/ 522
iniciación de la/ 503
origen de la/ 497, 502, 506
posterminación de la/ 510, 614
preiniciación de la/ 496, 497, 499, 501, 524, 525, 528, 529, 530, 531, 532, 540, 544, 545, 560, 598
requerimientos de la/ 495
terminación de la/ 508
represión enzimática/ 681, 682
represor/ 544, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 693
retículo endoplasmático/ 386, 402, 444, 664
liso/ 401, 404, 405, 407, 408
rugoso/ 401, 403, 404, 405, 406, 412, 414, 430, 431, 448
retinoblastoma/ 454, 485
ribosomas/ 376, 403, 404, 405, 406, 413, 414, 428, 429, 430, 431, 437, 448, 450, 452, 527, 539, 540, 542, 564, 565, 567, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 589, 590, 594, 595, 597, 598, 599, 601, 602, 603, 606, 608, 614, 615, 616, 617, 618, 685, 686
biogénesis de los/ 540, 587, 590
composición molecular/ 578, 579
eucariontes/ 580, 583, 584, 590
procariontes/ 578
subunidad mayor/ 438, 540, 543, 547, 548, 579, 580, 581, 584, 585, 586, 599, 603, 606, 608, 610, 612
subunidad menor/ 438, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 590, 599, 603, 605, 606, 608, 612
rifampicina/ 558, 559, 560

S

saco membranoso en el retículo endoplasmático/ 403
secuencias repetidas/ 433, 437, 442, 460, 466, 467, 499, 518
de fenilalanina-glicina/ 433
silenciador/ 461
simporte/ 394, 395, 396
síndrome/ 392, 443, 454, 547, 633, 641, 663, 670, 671, 672, 687, 689
de Bloom/ 454, 671, 672
de Cockaine/ 547
de Down/ 443
de Fanconi/ 671, 672
de inmunodeficiencia adquirida (sida)/ 633
de Klinefelter/ 443
síntesis de lípidos/ 406, 413, 478
sistema de endomembranas/ 377, 401, 402, 403, 412, 413

T

taxol/ 419
tecnología del ADN recombinante/ 452, 695
telofase/ 447, 473, 500, 502, 632
telomerasa/ 515, 516, 517, 525, 529
telómeros/ 439, 440, 460, 467, 469, 479, 499, 512, 514, 515, 516, 517, 525, 529, 701
tetraciclina/ 701, 702
timidina/ 473, 474, 475, 477
timina/ 494, 517, 529, 531, 533, 642, 643, 657, 659, 661, 663, 665
topoisomerasa/ 440, 487, 497, 498, 502, 503, 506, 508, 522, 525, 626, 629, 633, 636, 637
topoisómeros del ADN/ 496

traducción/ 427, 456, 463, 465, 472, 473, 476, 478, 497, 527, 548, 549, 551, 555, 563, 565, 566, 568, 570, 573, 575, 577, 578, 580, 581, 584, 585, 586, 587, 590, 591, 593, 594, 595, 596, 598, 606, 607, 608, 613, 614, 615, 617, 618, 619, 679, 683, 685, 686, 691, 692, 694, 710
características generales/ 594
elongación de la/ 608
en eucariontes/ 608
eventos previos a la iniciación de la/ 594, 616
factores de iniciación/ 595, 598, 606, 618
factores de liberación/ 619
inhibidores de la/ 617, 618
iniciación de la/ 463, 548, 555, 585, 591, 598, 606
posterminación/ 510, 614
preiniciación de la. *Véase* eventos previos a la iniciación
transcripción/ 385, 427, 435, 437, 438, 447, 448, 461, 464, 465, 466, 467, 469, 472, 473, 476, 478, 485, 486, 497, 501, 512, 515, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 536, 537, 539, 540, 541, 543, 544, 545, 547, 548, 549, 550, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 563, 580, 587, 588, 589, 630, 644, 653, 657, 658, 663, 665, 666, 676, 678, 679, 681, 682, 683, 684, 685, 687, 688, 689, 690, 691, 693, 694, 703, 710
etapas de la/ 529
eventos posterminación/ 537
inhibidores de la/ 558, 559
iniciación de la/ 532, 539, 541, 543, 690
preiniciación de la/ 543
terminación de la/ 536, 548, 553, 684
transcriptasa inversa/ 515, 697, 708
transducción/ 383, 386, 421, 487, 623, 633, 636
transformación/ 394, 458, 479, 480, 516, 525, 532, 538, 539, 560, 622, 623, 633, 636, 666, 710
cancerosa/ 479, 480, 516, 525, 666
transformaciones sol-gel/ 419
translocación/ 601, 603, 640
translocasas/ 393
transporte/ 387, 388, 393, 394, 395, 396, 398, 399, 408, 413, 414, 421, 434, 435, 479, 551, 553, 587, 677, 681, 691, 694
activo/ 394, 395, 396, 398, 399, 434
de sustancias/ 387
interno/ 421
mediante proteínas/ 387
pasivo/ 393, 394, 398, 399
selectivo/ 387
triacilgliceroles/ 377, 422, 423
triplete/ 566
trisomía/ 443
tubulina/ 419, 420, 425, 446
α/ 419
β/ 419
γ/ 419

U

ubiquitina/ 446, 482, 483, 484, 487, 489, 501, 521
uniporte/ 394, 395
uracilo/ 529, 574, 643, 657, 661

V

velocidades de los procesos metabólicos/ 403, 450
vesículas/ 379, 392, 404, 408, 410, 412, 413, 414, 416, 420, 447
vimentina/ 422, 425

W

Watson y Crick/ 439, 517, 518

X

Xeroderma pigmentosum/ 663, 670, 671, 672

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN

Bioquímica Médica

Tomo II

Componentes celulares y Genética molecular

Bioquímica médica ha sido elaborada para responder a los intereses de las distintas especialidades de las ciencias médicas y otras, con el propósito de contribuir a mejorar la comprensión de la disciplina Bioquímica y destacar su importancia en la formación de profesionales.

Compuesta por cuatro tomos: *Biomoléculas, Componentes celulares y genética molecular, Metabolismo intermediario y su regulación, y Bioquímica especializada*, inicia al lector en la ciencia bioquímica, sus orígenes, desarrollo y perspectivas. Concluye con el aporte de la bioquímica en la comprensión de procesos y enfermedades como el envejecimiento, la morfogénesis, la formación de anticuerpos, el origen de la vida, la evolución molecular y el cáncer.

Esta obra ha sido utilizada en la carrera de Medicina y otras especialidades de las Ciencias Médicas de las Universidades Médicas de Cuba, Venezuela y Angola; en la residencia de Bioquímica Clínica, Laboratorio Clínico y Genética Médica, en Cuba, y en la Maestría de Bioquímica Clínica, en Bolivia.

En esta segunda edición se articulan la información actualizada de esta ciencia con los adelantos obtenidos en todas las ciencias, tanto biológicas como médicas, todo lo cual constituye una obra de obligada consulta para los interesados en la materia.

Lidia Cardellá Rosales. Doctora en Ciencias Biológicas. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Rolando Hernández Fernández. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. El resto del colectivo de autores se destaca por su gran prestigio científico y acumula años de experiencia en la docencia y la investigación.

ecimed
EDITORIAL CIENCIAS MÉDICAS
www.ecimed.sld.cu

ISBN 978-959-212-875-0