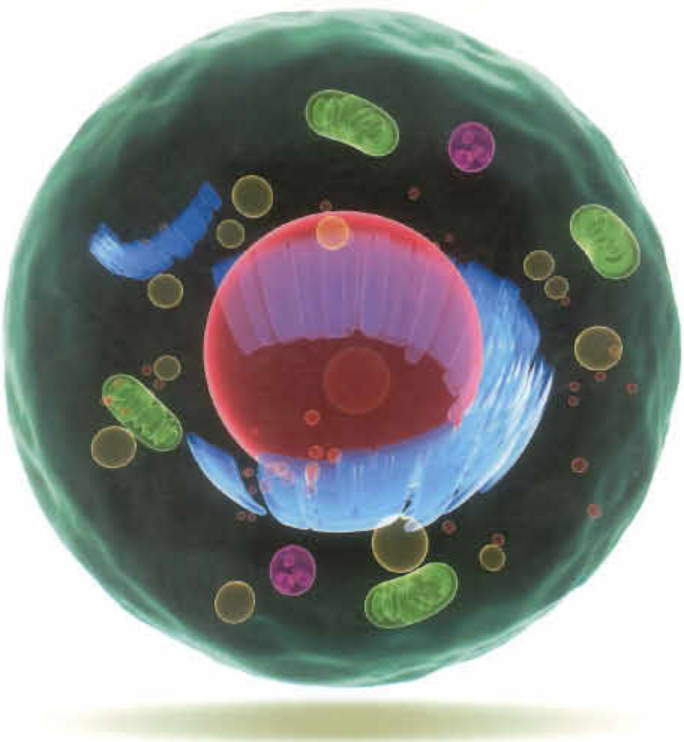
DE ROBERTIS

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR



DE ROBERTIS (h.) - HIB

PROMED

16ª EDICION

48

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

DE ROBERTIS

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

DE ROBERTIS
BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

DECIMOSEXTA EDICION
Primera reimpresión

Edward M. De Robertis

Profesor Norman Sprague de Química Biológica
Universidad de California, Los Angeles, EUA

Investigador del Howard Hughes Medical Institute, EUA

Miembro de la Academia Pontificia de Ciencias, Vaticano

Miembro de la Academia Nacional de Ciencias, EUA

Doctor Honoris Causa, Universidad de Paris, Francia

José Hib

Profesor de Biología Celular, Histología y Embriología
Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires, Argentina

Profesor de Biología Celular y Embriología, Centro
Latinoamericano de Economía Humana, Punta del Este, Uruguay

Exprofesor de Biología Celular, Histología, Embriología y Genética
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

PROMED

De Robertis, Edward M.
De Robertis - Biología Celular y Molecular / Edward M. De Robertis y José Hib. - 16a ed. - Buenos Aires : Hipocrático, 2012.
476 p. ; 24x17 cm.

ISBN 978-987-24255-9-3

1. Biología Molecular. 2. Biología Celular. I. Hib, José
CDD 611.018 1

Biología Celular y Molecular ha sido traducido al inglés, portugués, italiano, ruso, polaco, húngaro, japonés y chino

Primera edición publicada en 1946
Decimoquinta edición publicada en 2005
Decimosexta edición publicada en 2012
-Reimpresa en 2016

Diseño: Estudio Clareo / Alejandro F. Demartini
info@clareo.net

Imagen de cubierta: *Estructura celular* de Sebastian Kaulitzki

Editorial Promed
© Hipocrático S.A.
Todos los derechos reservados
Junín 925 - (1113)
Buenos Aires, Argentina.
(00 54 11) 4962-7814
info@editorialpromed.com.ar
www.hipocratico-sa.com.ar

Universidad Privada del Este
Dpto. De Biblioteca
Nº de Acceso: 3985
Fecha: 28-06-2017
Adquirido: Por la UPE.

Hecho el depósito que marca la ley 11.723
Impreso en Argentina

Este libro se terminó de imprimir en los talleres de Latingráfica S.R.L. en junio de 2016

LA FOTOCOPIA MATA AL LIBRO Y ES UN DELITO

Fotocopiar libros sin autorización, está penado por la ley 11.723 de Propiedad Intelectual. El autor tiene derecho a percibir una retribución económica por su creatividad y esfuerzo. Conserve y atesore los libros que fueron su mentor y contribuyeron a su formación profesional. Quien comercializa fotocopias prohibidas, utiliza ilícitamente en su provecho el talento ajeno. Sea solidaria/o con el autor y contribuya con su apoyo a no ser cómplice de un grave delito.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Prefacio

El profesor Eduardo D. P. De Robertis (1913-1988) ocupa un lugar destacado en la historia de la investigación científica y de la enseñanza de la biología celular. Su aporte más notable como investigador fue la identificación y el aislamiento de las vesículas sinápticas, lo cual abrió el camino para comprender los mecanismos básicos de la neurotransmisión. La dedicación a las tareas científicas no le impidió atender su vocación docente, plasmada principalmente en la creación de un texto que innovó la forma de enseñar la biología celular en el mundo entero. Así, en 1946, junto con el bioquímico Wiktor Nowinski y el genetista Francisco A. Saez, escribió un libro sobre la morfología y las funciones de la célula –estas últimas muy poco conocidas en aquel tiempo–, que fue de avanzada en comparación con los textos exclusivamente morfológicos que existían hasta ese momento. Se llamó *Citología General*, fue traducido a ocho idiomas y puede afirmarse que es el precursor de la forma moderna de la enseñanza de la materia. Las siguientes son algunas opiniones del autor, escogidas del prefacio de la primera edición: "En su aspecto morfológico la Citología moderna ha ido más allá de la simple descripción de las estructuras visibles al microscopio y, mediante la aplicación de nuevos métodos, ha comenzado el análisis de la organización submicroscópica, o sea de la arquitectura de las moléculas y micelas que componen la materia viviente. En su aspecto funcional, ha superado la etapa puramente descriptiva de los cambios fisiológicos para buscar su razón de ser en los procesos físico-químicos y metabólicos del protoplasma". Como se ve, desde el principio sustentó el concepto de que las formas y las funciones de las estructuras subcelulares son dos facetas de un mismo fenómeno y que ambas se integran a nivel molecular.

El incesante progreso en el conocimiento de los mecanismos celulares obligó a modificar el título del libro en más de una oportunidad. A partir de 1965 pasó a denominarse *Biología Celular*. En la edición de 1980 –ya con el profesor De Robertis (h.) como coautor– adquirió el nombre de *Biología Celular y Molecular*. Después de la desaparición física de su creador, en la edición de 1996 decidimos que el nombre del profesor De Robertis quedara integrado al título del libro, y en la edición actual estimamos que sería más justo que lo precediera.

Nos hemos inclinado por no describir aquí en detalle los cambios que trae esta edición, tanto en las secciones revisadas y actualizadas como en la calidad editorial. El lector podrá apreciarlos con sólo hojear sus páginas. Simplemente queremos advertir que por razones didácticas el capítulo "Métodos de estudio en biología celular" ha sido trasladado al final del libro, y que el citosol, los peroxisomas y la muerte celular se describen en capítulos independientes. Además, las subestructuras de la célula vegetal –con excepción de los cloroplastos, que se analizan en un capítulo separado– se describen con sus similares de la célula animal en las últimas páginas de los respectivos capítulos.

La preparación de un libro de esta envergadura requiere la colaboración de muchas personas, a quienes les manifestamos nuestra gratitud. Una mención especial merece la licenciada Ana Demartini, que tuvo a su cargo la corrección de los textos. Otra va dirigida al diseñador gráfico Alejandro F. Demartini, a cuya pericia y creatividad se deben la elaboración de la mayor parte de las ilustraciones, el perfeccionamiento de otras y la composición y el armado de las páginas. También debemos mencionar a los directivos de la Editorial Promed por el interés y el apoyo brindados en publicar con sus mejores recursos esta nueva edición.

Nuestro mayor anhelo es que *De Robertis – Biología Celular y Molecular* auxilie la labor de los docentes y acompañe a los estudiantes que acudan a su lectura.

LOS AUTORES

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Indice

1. LA CELULA
Introducción 1
Niveles de organización 2
Características generales de las células 4
Células procariotas 5
Células eucariotas 8

2. COMPONENTES QUIMICOS DE LA CELULA
Introducción 21
Agua y minerales 22
Acidos nucleicos 23
Hidratos de carbono 27
Lípidos 30
Proteínas 35
Enzimas 40
El origen de las células 44

3. MEMBRANAS CELULARES. Permeabilidad de las membranas
Actividades de las membranas 48
Estructura de las membranas 49
Composición química de las membranas 50
Permeabilidad de las membranas celulares 57
La membrana plasmática y la pared de la célula vegetal 69

4. CITOSOL
Componentes 73
Inclusiones 74
Ribosomas 75
Chaperonas 76
Proteasomas 77

5. CITOESQUELETO. Forma y motilidad
Componentes 79
Filamentos intermedios 80
Microtúbulos 82
Cilios 88
Centrosoma 90
Cuerpos basales y centríolos 92
Filamentos de actina 94
Motilidad celular 99
Microvellosidades 103
Contractilidad muscular 104
Citoesqueleto del eritrocito 110

6. UNION DE LAS CELULAS ENTRE SI Y CON LA MATRIZ EXTRACELULAR
Matriz extracelular 113
Uniones de las células con la matriz extracelular 116
Uniones transitorias entre las células 117
Uniones estables entre las células 119
Las conexiones entre las células vegetales 124

7. SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS. Digestión y secreción
Componentes 125
Retículo endoplasmático 126
Complejo de Golgi 128
Funciones del retículo endoplasmático y del complejo de Golgi 130
Secreción celular. Exocitosis 144
Endosomas. Endocitosis 146
Lisosomas. Digestión celular 151
Vesículas transportadoras 154
Cavéolas 161
El sistema de endomembranas en la célula vegetal 162

8. MITOCONDRIAS. Energía celular I
Procesos bioenergéticos 165
Descripción general y estructura de las mitocondrias 171
Funciones de las mitocondrias 173
Mitocondrias de las células de la grasa parda 180
Reproducción de las mitocondrias 181
ADN mitocondrial 182
Probable origen de las mitocondrias 185

9. CLOROPLASTOS. Energía celular II
Tipos de plástidos 187
Estructura de los cloroplastos 189
Fotosíntesis 190
Biogénesis de los cloroplastos 197

10. PEROXISOMAS. Destoxificación celular
Contenido de los peroxisomas 199
Funciones 200
Reproducción 201
Los peroxisomas en las células vegetales 201

11. COMUNICACION INTERCELULAR Y TRANSMISION INTRACELULAR DE SEÑALES
Formas de comunicación entre las células 203
Inducciones celulares mediadas por receptores citosólicos 206
Inducciones celulares mediadas por receptores localizados en la membrana plasmática 208
Receptores membranosos que adquieren actividad enzimática o que activan enzimas 209
Receptores membranosos acoplados a proteínas G 214

12. NUCLEO CELULAR
Descripción general 225
Envoltura nuclear 226
Cromosomas 231

Cromatina 234
Cariotipo 239

13. GENES
Introducción 244
Código genético 247
Composición de los genes 249

14. TRANSCRIPCION DEL ADN
Definición 254
Transcripción de los genes de los ARN mensajeros 257
Regulación de los genes que codifican ARN mensajeros 258
Transcripción del gen del ARN ribosómico 45S 267
Transcripción del gen del ARN ribosómico 5S 269
Transcripción de los genes de los ARN de transferencia 269
Transcripción de los genes de los ARN pequeños 269
Transcripción de los genes del ARNxist, del ARNte y de los miARN 270
Transcripción de los genes en las células procariotas 270

15. PROCESAMIENTO DEL ARN
Procesamiento de los ARN mensajeros 277
Regulación del procesamiento de los ARN mensajeros 282
Procesamiento del ARN ribosómico 45S 283
Nucléolo 285
Procesamiento del ARN ribosómico 5S 286
Procesamiento de los ARN de transferencia 286
Procesamiento de los ARN pequeños 286
Procesamiento del ARNxist, del ARNte y de los miARN 287

16. TRADUCCION DEL ARNm. Síntesis de proteínas
Descripción general y código genético 290
Tipos de ARN de transferencia 291
Aminoacil-ARNt sintetasa 294
Ribosomas 295
Las etapas de la síntesis proteica 298
Regulación de la traducción de los ARN mensajeros y de la degradación de las proteínas 303

17. REPLICACION DEL ADN. Mutación y reparación
Replicación del ADN. Descripción general 309
Orígenes de replicación 312
Replicación continua y discontinua 314
Replicación del ADN en los telómeros 318
Funciones de las topoisomerasas y la girasa 321
Mutación del ADN 324
Reparación del ADN 326
Transposición de secuencias de ADN 329

18. MITOSIS. Control del ciclo celular
Ciclo celular 332
Descripción general y fases de la mitosis 333
Centrosomas 337
Cinetocoros 338
Huso mitótico 339
Citocinesis 342

La mitosis en las células vegetales 342
Control del ciclo celular 344
Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores 349

19. MEIOSIS. Fecundación
Meiosis y reproducción sexual 354
Diferencias entre la mitosis y la meiosis 355
Descripción general de la meiosis 357
Fases de la meiosis 357
Consecuencias genéticas de la meiosis 366
Fecundación 370
Fases de la fecundación 371
La meiosis en las células vegetales y la reproducción de las plantas 377

20. CITOGENETICA
Leyes de la herencia mendeliana 379
Aberraciones cromosómicas 384
Aberraciones cromosómicas en la especie humana 387
Papel desempeñado por los cromosomas en la evolución 390

21. DIFERENCIACION CELULAR
Características generales 393
Interacciones nucleocitoplasmáticas 395
Determinantes citoplasmáticos 397
Valores posicionales de las células embrionarias 400
Establecimiento del plan corporal 400
Fenómenos inductivos 401
Derivaciones del estudio del desarrollo de la rana *Xenopus laevis* 402
Establecimiento del plan corporal en la mosca *Drosophila melanogaster* 408
Genes responsables de la formación del plan corporal 410

22. MUERTE CELULAR
Definición y características generales 412
Apoptosis por supresión de factores tróficos 413
Apoptosis por activación de receptores específicos 416
Apoptosis debida a mutaciones en el ADN 417

23. METODOS DE ESTUDIO EN BIOLOGIA CELULAR
Microscopia óptica 420
Microscopia electrónica 425
Estudio de las células vivas 431
Citoquímica 432
Inmunocitoquímica 434
Radioautografía 434
Fraccionamiento celular y molecular 436
Análisis molecular del ADN e ingeniería genética 439
Análisis de las funciones de los genes 448

INDICE ALFABETICO 455

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

La célula 1

INTRODUCCION

1-1. Las células son las unidades con que se construyen los organismos vivos

El estudio del universo biológico nos muestra que la evolución produjo una inmensa diversidad de formas vivientes. Existen alrededor de cuatro millones de especies de animales, vegetales, protozoos y bacterias, cuyos comportamientos, morfologías y funciones difieren entre sí. Sin embargo, a nivel molecular y celular estas entidades vivientes presentan un único plan maestro de organización. El campo de la biología celular y molecular es, precisamente, el estudio de ese plan de organización unificado; en otras palabras, es el análisis de las moléculas y de los componentes celulares con los que se construyen todas las formas de vida.

La célula es la unidad estructural y funcional fundamental de los seres vivos, así como el átomo es la unidad fundamental de las estructuras químicas. Si por algún medio se destruye la organización celular, la función de la célula también se altera.

Los estudios bioquímicos demostraron que la materia viviente está compuesta por los mismos elementos que constituyen el mundo inorgánico, aunque con diferencias en su organización. En el mundo inanimado existe una tendencia continua hacia el equilibrio termodinámico, en el curso de la cual se producen transformaciones contingentes entre la energía y la materia. En cambio, en los organismos vivos existe un manifiesto ordenamiento en las transformaciones químicas, de modo que las estructuras y las funciones biológicas no se alteran.

En el capítulo 23 se describen ordenadamente los métodos de estudio que proporcionaron los conocimientos esenciales sobre la estructura íntima de las células y permitieron descubrir la organización subcelular hasta un nivel molecular.

El presente capítulo tiene como objetivos principales ofrecer una introducción para el estudio de la estructura y las funciones de la célula y presentar la nomenclatura de los componentes celulares. Después de mencionar los niveles de organización concernientes a la biología, se describirá la organización estructural de los procariotas y los eucariotas —los dos tipos principales de organismos vivientes— y se señalarán sus semejanzas y diferencias. También introducirá al lector en los procesos generales de las divisiones mitótica y meiótica de las células.

Mediante la atenta lectura de este capítulo se obtendrá una perspectiva global de la célula, que servirá de base para el aprendizaje del material presentado en el resto del libro.

NIVELES DE ORGANIZACION

1-2. Niveles de organización en biología celular y poder resolutivo de los instrumentos utilizados

Los modernos estudios de la materia viviente demuestran que las manifestaciones vitales del organismo resultan de una serie de niveles de organización integrados. El concepto de niveles de organización implica que en el universo entero, tanto en el mundo inerte como en el viviente, hay diversos niveles de complejidad, de manera que las leyes o reglas que se cumplen en un nivel pueden no manifestarse en otros.

La tabla 1-1 muestra los límites que separan el estudio de los sistemas biológicos en diferentes niveles. Los límites están impuestos artificialmente por el poder de resolución de los instrumentos utilizados. El ojo humano sólo puede resolver (discriminar) dos puntos separados por más de 0,1 mm (100 μm). La mayoría de las células son mucho más pequeñas y para estudiarlas

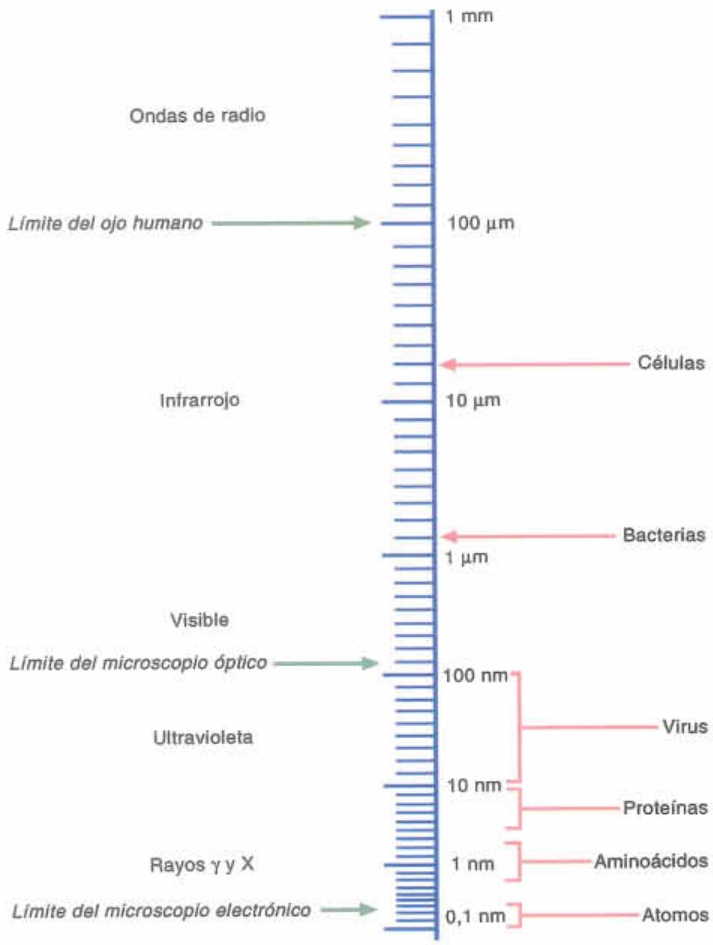


Fig. 1-1. Escala logarítmica de las dimensiones microscópicas. Cada división principal representa un tamaño 10 veces menor que la precedente. *A la izquierda* se indican la posición de las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético y los límites de resolución del ojo humano, del microscopio óptico y del microscopio electrónico. *A la derecha* aparecen los tamaños de las células, las bacterias, los virus, las moléculas y los átomos.

Tabla 1-1. Ramas de la morfología

Dimensión	*Rama*	*Estructura*	*Método*
> 0,1 mm	Anatomía	Organos	Ojo y lente simple
100-10 μm	Histología	Tejidos	Varios tipos de microscopios ópticos
10-0,2 μm	Citología	Células Bacterias	Varios tipos de microscopios ópticos
200-0,4 nm	Morfología submicroscópica Ultraestructura	Componentes celulares Virus	Microscopia electrónica
< 1 nm	Estructura molecular y atómica	Posición de los átomos	Difracción de rayos X

1 mm equivale a 1.000 μm; 1 μm, a 1.000 nm.

se necesita el poder de resolución del microscopio óptico (0,2 μm). La mayor parte de las subestructuras celulares son más pequeñas aún y requieren la resolución del microscopio electrónico (cap. 23-11). Con este instrumento se puede obtener información de subestructuras que miden entre 0,4 y 200 nm, lo cual amplía el campo de observación hasta el mundo de las macromoléculas. Los resultados logrados mediante la aplicación de la microscopia electrónica han transformado el campo de la citología en un grado tal que gran parte de este libro está dedicado al estudio de los conocimientos obtenidos con esta técnica. Por otra parte, los estudios de la configuración molecular de las proteínas, los ácidos nucleicos y otros complejos moleculares de gran tamaño —incluidos algunos virus— se realizan mediante el análisis de las muestras por difracción de rayos X.

En la figura 1-1 se indican, en escala logarítmica, los tamaños de las células eucariotas, las bacterias, los virus y las moléculas, y se los compara con las longitudes de onda de las radiaciones y con los límites de resolución del ojo humano, del microscopio óptico y del microscopio electrónico. Puede advertirse que el microscopio óptico permite un aumento de 500 veces con respecto a la resolución del ojo, y el microscopio electrónico un aumento 500 veces mayor que el microscopio óptico.

En la tabla 1-2 se presentan las relaciones generales entre las dimensiones lineales y los pesos que se manejan en el análisis químico de la materia viviente. Es esencial familiarizarse con estas relaciones para el estudio de la biología molecular de la célula. El peso de los componentes celulares se expresa en ***picogramos*** (1 pg = 1 μμg, es decir, 10^{-12} g) y el de las moléculas en ***dalton***. Un dalton (Da) es equivalente al peso de un átomo de hidrógeno, pero a menudo se utiliza el múltiplo ***kilodalton*** (1 kDa = 1.000 Da). Por ejemplo, una molécula de agua pesa 18 Da y una de hemoglobina 64,5 kDa.

Tabla 1-2. Relaciones entre las dimensiones lineales y los pesos

Dimensión lineal	*Peso*	*Terminología*	
1 cm	1 g	Bioquímica convencional	
1 mm	1 mg, 10^{-3} g	Microquímica	
100 μm	1 μg, 10^{-6} g	Histoquímica	Ultramicroquímica
1 μm	1 pg, 10^{-12} g	Citoquímica	Ultramicroquímica

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CELULAS

1-3. Existen células procariotas y células eucariotas

Al comienzo del capítulo dijimos que la vida se manifiesta en millones de especies diferentes que poseen comportamientos, formas y funciones propias. Las especies se ordenan en grupos de organismos cada vez más amplios —géneros, familias, órdenes— hasta llegar al nivel de los reinos clásicos: vegetal y animal. Una de las clasificaciones más usadas propone la división en cinco reinos: móneras, protistas, hongos, vegetales y animales, con sus correspondientes subdivisiones (tabla 1-3).

Este cuadro puede simplificarse si se examinan las distintas formas vivientes a nivel celular. Así, es posible clasificar a las células en dos categorías reconocibles: **procariotas** y **eucariotas**. En la tabla 1-3 se aprecia que únicamente las móneras (es decir, las bacterias y las algas azules) son células procariotas, mientras que todos los demás reinos están integrados por organismos compuestos por células eucariotas.

La principal diferencia entre ambos tipos celulares es que los procariotas no poseen envoltura nuclear. El cromosoma de los procariotas ocupa un espacio dentro de la célula denominado nucleoide y se halla en contacto directo con el resto del protoplasma. En cambio, las células eucariotas poseen un núcleo verdadero con una complicada envoltura nuclear, a través de la cual tienen lugar los intercambios nucleocitoplasmáticos. En la tabla 1-4 se establece la comparación entre la organización estructural de los procariotas y de los eucariotas, lo cual ilustra las diferencias y las semejanzas entre los dos tipos celulares.

Desde el punto de vista evolutivo, se considera que los procariotas son antecesores de los eucariotas. Los fósiles que datan de tres mil millones de años se manifiestan únicamente como procariotas, en tanto que los eucariotas aparecieron probablemente hace mil millones de años. A pesar de las diferencias entre los procariotas y los eucariotas, existen grandes semejanzas en su organización molecular y en sus funciones. Por ejemplo, ambos tipos de organismos utilizan un mismo código genético y una maquinaria similar para sintetizar proteínas.

Tabla 1-3. Clasificación de las células y los organismos

Células	*Reino*	*Organismos representativos*
Procariotas	Móneras	Bacterias
		Algas azules
Eucariotas	Protistas	Protozoos
		Crisofitas
	Hongos	Mohos
		Hongos verdaderos
	Vegetales	Algas verdes
		Algas rojas
		Algas pardas
		Briofitas
		Traqueofitas
	Animales	Metazoos

1-4. Existen organismos autótrofos y organismos heterótrofos

El sol constituye la fuente original de energía para los organismos vivos. La energía incluida en los fotones es atrapada por el pigmento llamado clorofila —que se encuentra en los cloroplastos de los vegetales verdes— y se acumula en forma de energía química en los diferentes alimentos consumidos por otros organismos.

Las células y los organismos pluricelulares pueden agruparse en dos clases principales según el mecanismo que utilizan para extraer energía para su propio

metabolismo. Los que pertenecen a la primera clase —denominados **autótrofos** (por ejemplo, los vegetales verdes)— utilizan el proceso de ***fotosíntesis*** para transformar CO_2 y H_2O en hidratos de carbono simples, a partir de los cuales pueden producir moléculas más complejas. Los pertenecientes a la segunda clase —llamados **heterótrofos** (por ejemplo, los animales)— obtienen la energía de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas sintetizados por los organismos autótrofos. La energía contenida en estas moléculas orgánicas se libera mediante la combustión del O_2 atmosférico (es decir, por oxidación), por un proceso que se denomina ***respiración aeróbica***. La liberación por los organismos heterótrofos del H_2O y CO_2 generados por este proceso completa el ciclo energético (fig. 1-2).

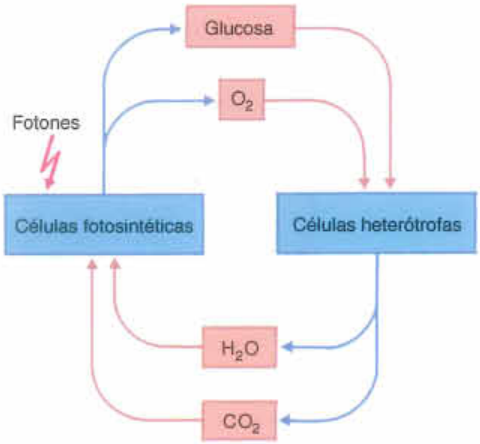


Fig. 1-2. Esquema del ciclo de la energía entre las células autótrofas (fotosintéticas) y heterótrofas.

Estos ciclos energéticos se han mantenido relacionados entre sí a lo largo de la evolución. Entre los procariotas existen algunas especies autótrofas y otras heterótrofas. Los vegetales (con excepciones) son autótrofos, mientras que los animales y los hongos son heterótrofos.

1-5. Organización general de las células procariotas

Bacterias. Si bien este libro está dedicado a las células eucariotas de los organismos más complejos, gran parte del conocimiento sobre la biología celular proviene de estudios efectuados en virus y bacterias. Una célula bacteriana como la de *Escherichia coli* presenta la ventaja de su fácil cultivo a 37 °C en soluciones acuosas de iones inorgánicos, glucosa, aminoácidos y nucleótidos, donde duplica su masa y se divide en aproximadamente 20 minutos. Debe señalarse que la *Escherichia coli* pertenece a la clase de bacterias que no se colorean con el método de tinción desarrollado por el microbiólogo H. C. Gram, de ahí que se las conoce como bacterias gramnegativas.

Tanto la micrografía como el esquema de la figura 1-3 muestran que la membrana plasmática de esas bacterias está rodeada por una **pared celular**, la cual sirve de protección mecánica, es rígida y consta de dos capas: una interior de peptidoglicano y otra conocida como membrana externa. Obsérvese que ambas están separadas por el espacio periplasmático. El peptidoglicano es una macromolécula continua compuesta por carbohidratos inusuales unidos por péptidos cortos. En cambio, la membrana externa es una bicapa de lipoproteínas y lipopolisacáridos similar en estructura a

Tabla 1-4. Organización celular en procariotas y eucariotas

	Procariotas	*Eucariotas*
Envoltura nuclear	Ausente	Presente
ADN	Desnudo	Combinado con proteínas
Cromosomas	Unicos	Múltiples
Nucléolos	Ausentes	Presentes
División	Fisión binaria	Mitosis o meiosis
Ribosomas	70S* (50S + 30S)	80S (60S + 40S)
Endomembranas	Ausentes	Presentes
Mitocondrias	Ausentes	Presentes
Cloroplastos	Ausentes	Presentes en células vegetales
Pared celular	No celulósica	Celulósica en células vegetales
Exocitosis y endocitosis	Ausentes	Presentes
Citoesqueleto	Ausente	Presente

* S es la unidad Svedberg de sedimentación, que depende de la densidad y la forma de la molécula.

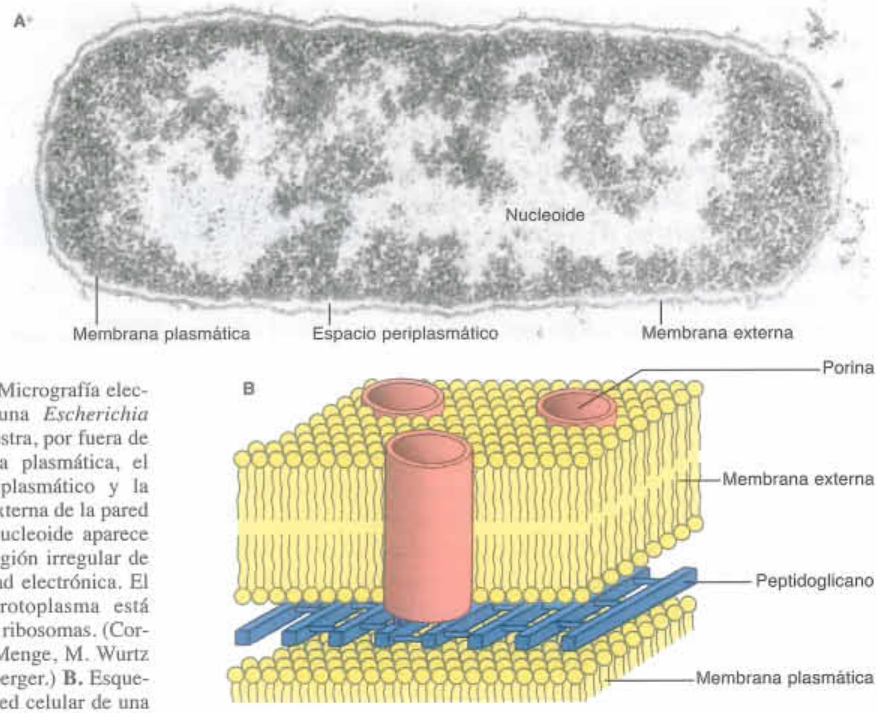


Fig. 1-3. A. Micrografía electrónica de una *Escherichia coli* que muestra, por fuera de la membrana plasmática, el espacio periplasmático y la membrana externa de la pared celular. El nucleoide aparece como una región irregular de poca densidad electrónica. El resto del protoplasma está ocupado por ribosomas. (Cortesía de B. Menge, M. Wurtz y E. Kellenberger.) **B.** Esquema de la pared celular de una bacteria gramnegativa. Obsérvese el peptidoglicano y la membrana externa, cuya bicapa lipídica está atravesada por porinas. En el lado inferior de la figura se ve una parte de la membrana plasmática.

la membrana plasmática. Uno de los complejos proteicos presentes en la membrana externa lleva el nombre de **porina** debido a que forma un canal transmembranoso que permite la libre difusión de los solutos.

La **membrana plasmática** es una estructura lipoproteica que sirve de barrera para los elementos presentes en el medio circundante. Esta membrana, al controlar la entrada y salida de los solutos, contribuye al establecimiento de un medio perfectamente regulado en el protoplasma de la bacteria. Es oportuno señalar ahora que en los procariotas los complejos proteicos de la cadena respiratoria (cap. 8-11) y los fotosistemas utilizados en la fotosíntesis (cap. 9-8) se localizan en la membrana plasmática.

En el **protoplasma** se encuentran partículas de 25 nm de diámetro, denominadas **ribosomas**, compuestas por ácido ribonucleico (ARN) y proteínas; poseen una subunidad grande y otra pequeña. Los ribosomas se hallan agrupados en polirribosomas y en ellos tiene lugar la síntesis proteica. Además, el protoplasma contiene agua, iones, otros tipos de ARN, proteínas estructurales y enzimáticas, diversas moléculas pequeñas, etcétera.

El **cromosoma** bacteriano es una molécula circular única de ADN desnudo, plegado apretadamente dentro del **nucleoide**, el cual, visto con el microscopio electrónico, se observa como la región más clara del protoplasma (fig. 1-3). Es importante advertir que el ADN de la *Escherichia coli*, que posee una longitud aproximada de 10^6 nm (1 mm), contiene información genética para codificar entre 2.000 y 3.000 proteínas distintas.

El cromosoma de los procariotas se halla unido a la membrana plasmática. Se cree que esta fijación contribuye a la separación de los dos cromosomas hijos después de la replicación del ADN. Tal separación se produciría al crecer la membrana plasmática interpuesta entre ambos cromosomas.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
CIUDAD DEL ESTE

Además del cromosoma, algunas bacterias contienen un ADN pequeño —también circular— denominado **plásmido**. El plásmido puede conferir a la célula bacteriana resistencia a uno o a varios antibióticos. Mediante el uso de técnicas de ingeniería genética (cap. 23-35) es posible aislar los plásmidos, insertarles fragmentos específicos de ADN (genes) y luego trasplantarlos a otras bacterias.

La mayoría de las células procariotas son pequeñas (miden entre 1 y 10 μm), pero algunas pueden alcanzar un diámetro de hasta 60 μm. Entre los organismos vivos que poseen la masa más pequeña, los que mejor se adaptan para su estudio son las pequeñas bacterias llamadas **micoplasmas**, las cuales producen enfermedades infecciosas en diferentes animales y en el hombre y pueden ser cultivadas *in vitro* como cualquier otra bacteria. Estos agentes tienen un diámetro de 0,1 a 0,25 μm, como el de algunos virus grandes. Su importancia biológica radica en que poseen una masa mil veces menor que el tamaño promedio de una bacteria y un millón de veces menor que el de una célula eucariota.

Virus. Los virus no son considerados células verdaderas. Aunque participan de algunas propiedades celulares —como la autorreproducción, la herencia y la mutación génica—, dependen de células huéspedes (procariotas o eucariotas) para ponerlas de manifiesto. Fuera de la célula huésped los virus son metabólicamente inertes y hasta pueden cristalizarse; se activan (es decir, se reproducen) cuando ingresan en una célula.

Los virus fueron reconocidos por su propiedad de atravesar los poros de un filtro de porcelana (de ahí su denominación original de virus filtrables) y por los cambios patológicos que producen en las células. El tamaño de los virus varía entre 30 y 300 nm y su estructura muestra diferentes grados de complejidad. Muchos presentan simetría icosaédrica (fig. 1-4); ésta deriva del modo como se combinan entre sí ciertas unidades proteicas llamadas **capsómeros**, que forman la envoltura del virus, o **cápside**.

De acuerdo con el tipo de ácido nucleico que poseen, existen dos tipos de virus: 1) los ***retrovirus***, que contienen ARN (por ejemplo, el virus del sida), y 2) los virus bacterianos o ***bacteriófagos***, que contienen ADN.

Los virus replican sus genes para reproducirse. También los transcriben (en ARN mensajeros), pero dependen de la maquinaria biosintética de la célula huésped (es decir, ribosomas, ARN de transferencia, enzimas, aminoácidos, etc.) para sintetizar sus proteínas (por ejemplo, los capsómeros).

Los virus son producidos por un proceso de agregación macromolecular, lo cual significa que sus componentes son sintetizados separadamente en diferentes lugares de la célula huésped y luego reunidos de manera coordinada en otra parte de ella.

Los virus que usan a células bacterianas como huéspedes se llaman bacteriófagos. El ADN se localiza en la cabeza del bacteriófago y es inyectado en la bacteria por medio de una cola que se adhiere a la pared de la célula huésped y actúa como una jeringa. Los procesos ulteriores en la bacteria son muy rápidos y comienzan con la hidrólisis enzimática de su ADN. Los nucleótidos resultan-

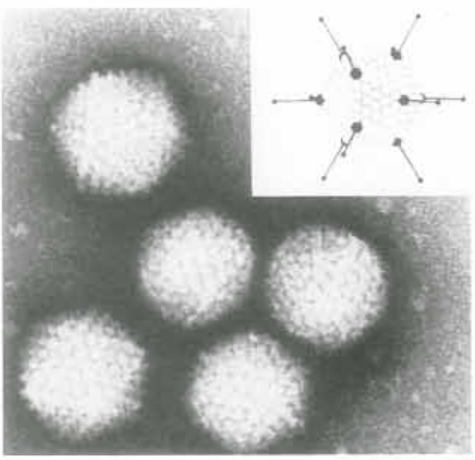


Fig. 1-4. Micrografía electrónica de virus coloreados negativamente. El dibujo del recuadro muestra la estructura icosaédrica del virus y las pentonas (*en negro*) y hexonas de los capsómeros.

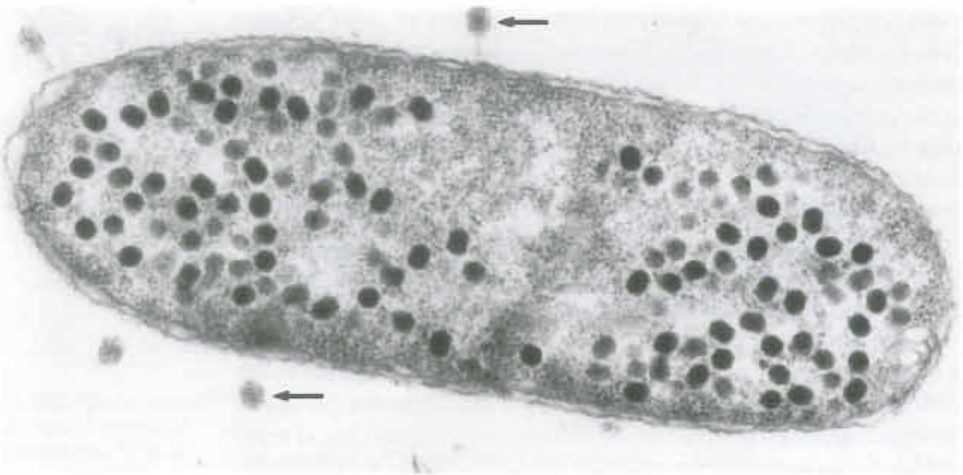


Fig. 1-5. *Escherichia coli* infectada por un bacteriófago (compárese con la figura 1-3 de control). Se observan algunos residuos del bacteriófago adheridos a la pared celular (*flechas*), después del ingreso del ADN. El nucleoide no se ve y la célula aparece repleta de virus. (Cortesía de B. Menge, M. Wurtz y E. Kellenberger.)

tes son utilizados para sintetizar el ADN de los nuevos bacteriófagos. A partir de este ADN se sintetizan los ARN mensajeros y las proteínas estructurales de los virus. Finalmente, se reúnen todos estos componentes y se arman los bacteriófagos maduros dentro de la bacteria infectada. Como se ve en la figura 1-5, después de haber sido infectada por un bacteriófago, la *Escherichia coli* aparece repleta de virus y pronta a romperse para dejar a los nuevos bacteriófagos en libertad.

Cuando se trata de virus que infectan a células eucariotas, el proceso es más complejo. Así, el ADN o el ARN del virus se replica en el núcleo de la célula huésped y las proteínas virales se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos. Luego, los nuevos componentes virales se combinan entre sí en el interior de la célula.

Para concluir el estudio de los virus, comparémoslos con las células verdaderas. Estas poseen: 1) un programa genético específico que permite la formación de nuevas células similares a las predecesoras; 2) una membrana plasmática que regula los intercambios entre el interior y el exterior de la célula; 3) una estructura que atrapa la energía de los alimentos, y 4) una maquinaria que sintetiza proteínas.

Como vimos, los virus poseen sólo la primera de estas facultades y carecen de las demás. Por este motivo no son considerados como células verdaderas, a pesar de contener los patrones genéticos para codificar sus proteínas y reproducirse.

1-6. Organización general de las células eucariotas

Una vez estudiada la organización de las células procariotas es conveniente volver a observar la tabla 1-4, en la que están resumidas las principales diferencias con las células eucariotas. Si se compara la organización de la *Escherichia coli* (fig. 1-3) con la de una célula animal (fig. 1-6) o la de una célula vegetal (fig. 1-7), llama la atención la complejidad de estas últimas.

En la célula eucariota en interfase, el **núcleo** constituye un compartimiento separado, limitado por la envoltura nuclear. Otro compartimiento está representado por el **citoplasma**, el cual se halla rodeado por la **membrana plasmática**, que a menudo muestra diferenciaciones. Cada uno de estos

tres componentes principales contiene a su vez varios subcomponentes o subcompartimientos.

Se puede utilizar la tabla 1-5 como una guía que resume esta compleja organización, ya que en ella se enumeran las funciones más importantes de cada componente.

1-7. Existe una gran diversidad morfológica entre las células eucariotas

Las células de un organismo multicelular tienen formas y estructuras variables y se diferencian de acuerdo con sus funciones específicas en los distintos tejidos. Esta especialización funcional hace que las células adquieran características singulares, aun cuando en todas ellas persiste un modelo de organización común (fig. 1-8).

Algunos tipos celulares, como los leucocitos, cambian de forma constantemente. Otros, como las células nerviosas y la mayoría de las células vege-

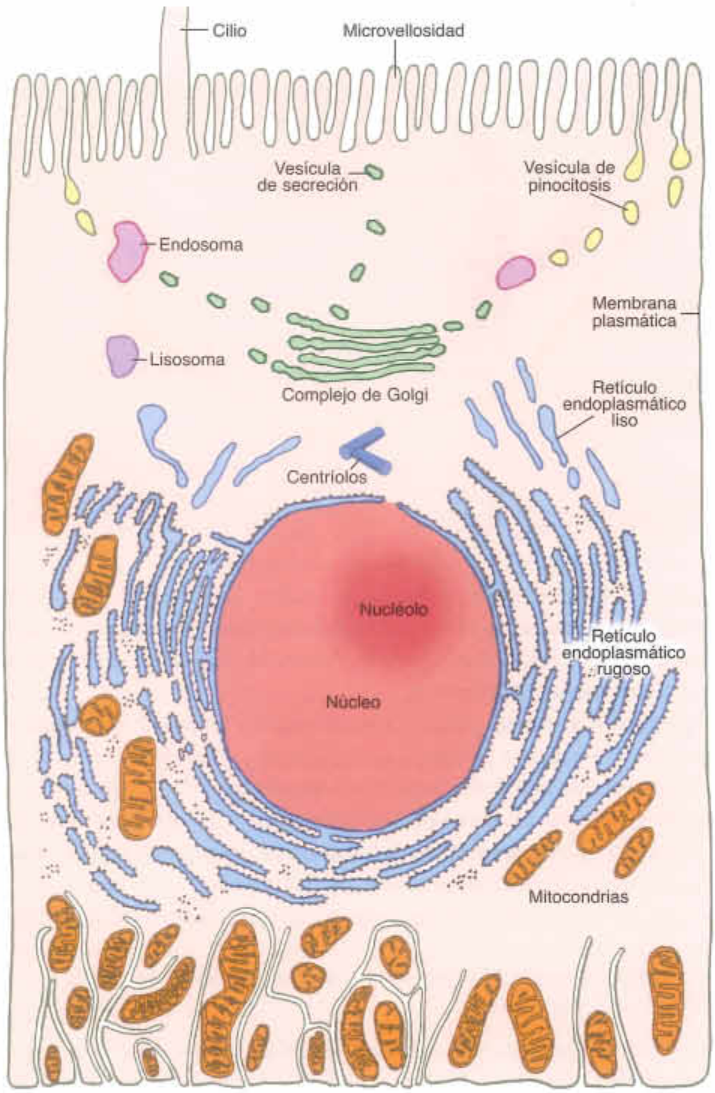


Fig. 1-6. Esquema de la ultraestructura de una célula animal idealizada, con sus principales componentes.

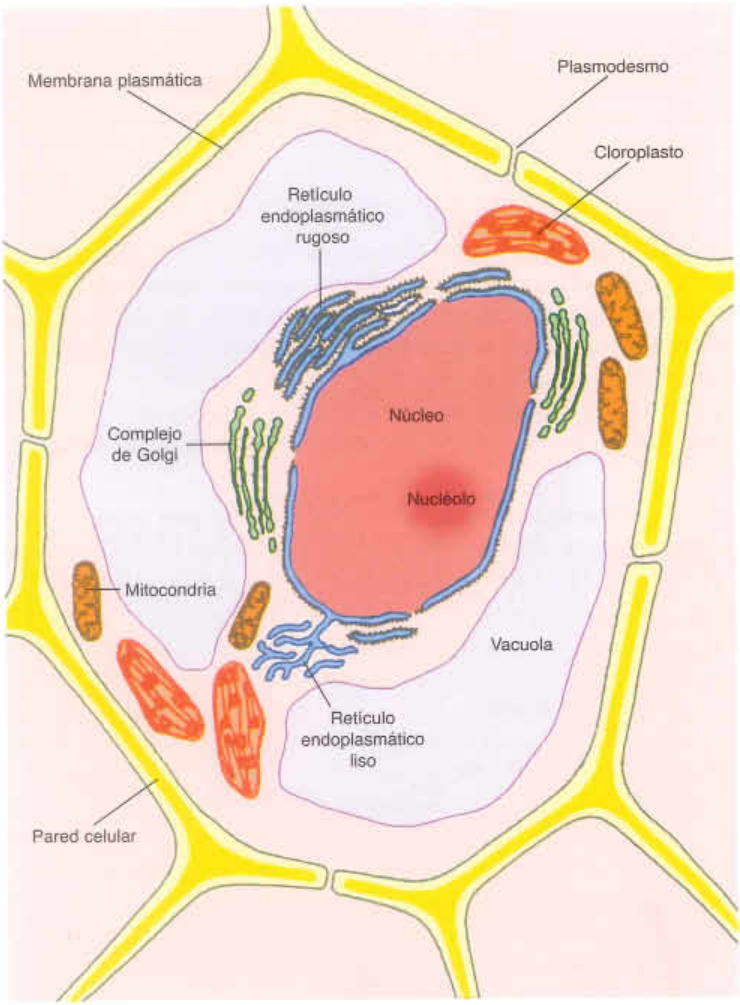


Fig. 1-7. Esquema general de la ultraestructura de una célula vegetal idealizada, con sus principales componentes.

tales, poseen una conformación bastante estable. La forma de una célula depende de sus adaptaciones funcionales, del citoesqueleto presente en su citoplasma, de la acción mecánica ejercida por las células adyacentes y de la rigidez de la membrana plasmática.

El tamaño de las células oscila dentro de amplios límites. Si bien algunas células pueden observarse a simple vista, la mayoría es visible únicamente con el microscopio, puesto que tienen unos pocos micrómetros de diámetro (fig. 1-1).

El volumen de la célula es bastante constante en los distintos tipos celulares y es independiente del tamaño del organismo. Por ejemplo, las células del riñón o del hígado tienen casi el mismo tamaño en el elefante y en la rata. Así, la masa de un órgano depende del número, no del volumen de las células.

1-8. La membrana plasmática separa el contenido de la célula del medio externo

La estructura que separa el contenido de la célula del medio externo es la **membrana plasmática**. Se trata de una delgada película de 6 a 10 nm de es-

pesor, compuesta por una bicapa lipídica continua y proteínas intercaladas o adheridas a su superficie.

La membrana plasmática sólo puede verse con el microscopio electrónico, que revela sus numerosas diferenciaciones y los distintos tipos de estructuras que unen a las células entre sí o que las conectan con ciertos componentes de la matriz extracelular (fig. 1-6).

La membrana plasmática controla de manera selectiva el pasaje de solutos. Además, promueve el ingreso y la salida de macromoléculas mediante procesos llamados endocitosis y exocitosis, respectivamente (tabla 1-5). En las células animales la membrana plasmática suele poseer abundantes hidratos de carbono (fig. 3-14), mientras que en las células vegetales su superficie está cubierta por una segunda envoltura de grosor relativamente estable, denominada **pared celular** (fig. 1-7).

1-9. La célula se halla dividida en numerosos compartimientos

El microscopio electrónico revela que la célula se halla dividida en numerosos **compartimientos** rodeados por membranas propias, excepto el citosol, que está envuelto por la membrana plasmática. Debe agregarse que ese asombroso contenido de membranas no impide que entre los distintos compartimientos exista una amplia interconexión funcional.

En las próximas secciones se analizarán las características principales del citosol (1-10) y de los compartimientos que poseen membranas propias, que son los que integran el sistema de endomembranas (1-11), las mitocondrias (1-12), los plástidos (1-12), los peroxisomas (1-13) y el núcleo (1-14 y 1-15).

Tabla 1-5. Organización general de la célula eucariota

Principales componentes	*Subcomponentes*	*Función principal*
Membrana celular	Pared celular	Protección
	Cubierta celular	Interacciones celulares
	Membrana plasmática	Permeabilidad, exocitosis y endocitosis
Núcleo	Cromosomas	Información genética
	Nucléolo	Síntesis de ribosomas
Citosol	Enzimas solubles	Glucólisis
	Ribosomas	Síntesis proteica
Citoesqueleto	Filamentos intermedios	Forma y movilidad de la célula
	Microtúbulos y centrosoma	
	Filamentos de actina	
Estructuras microtubulares	Cuerpos basales y cilios	Movilidad ciliar
	Centríolos	— — —
Organoides del sistema de endomembranas	Retículo endoplasmático	Síntesis y procesamiento de lípidos y glúcidos
	Complejo de Golgi	
	Endosomas y lisosomas	Digestión
Otros organoides	Mitocondrias	Síntesis de ATP
	Cloroplastos	Fotosíntesis
	Peroxisomas	Destoxificación

1-10. El citosol es el medio interno de la célula

Debido a que ocupa los espacios interpuestos entre los demás compartimientos, el **citosol** (o **matriz citoplasmática**) ha sido definido como el medio interno de la célula. En él se localizan muchos componentes citoplasmáticos esenciales –como los **ribosomas**, los **proteasomas**, etc.– y un sinnúmero de enzimas y otras clases de moléculas que participan en diversas reacciones metabólicas.

Además, distribuidos por todo el citosol se observan tres tipos de filamentos –los de actina, los intermedios y los microtúbulos–, los cuales componen una especie de **citoesqueleto** que determina la forma de cada variedad celular. Con la ayuda de distintas clases de proteínas accesorias, esos mismos filamentos participan también en otras importantes funciones celulares.

Los **filamentos de actina** miden 8 nm de diámetro (fig. 1-9). Entre sus funciones más salientes se halla la de conferir motilidad a las células.

Los **filamentos intermedios**, de 10 nm de diámetro, están formados por proteínas fibrosas y tienen principalmente un papel mecánico.

Los **microtúbulos** son estructuras tubulares rígidas de unos 25 nm de diámetro (fig. 1-9). Nacen de una estructura llamada **centrosoma**, en la que se hallan los centríolos. Junto con los filamentos de actina tienen a su cargo el desplazamiento de los organoides por el citoplasma. Además, los microtúbulos componen las fibras del huso mitótico durante la división celular.

Los **centríolos** son estructuras cilíndricas que miden aproximadamente 0,2 μm por 0,4 μm y sus paredes están formadas por microtúbulos. En general son dobles y sus dos unidades están dispuestas perpendicularmente. Si bien se encuentran en los centrosomas, no intervienen en la formación de los microtúbulos (las células vegetales carecen de centríolos y los microtúbulos igualmente se forman). Durante la mitosis los centríolos migran hacia los polos de la célula.

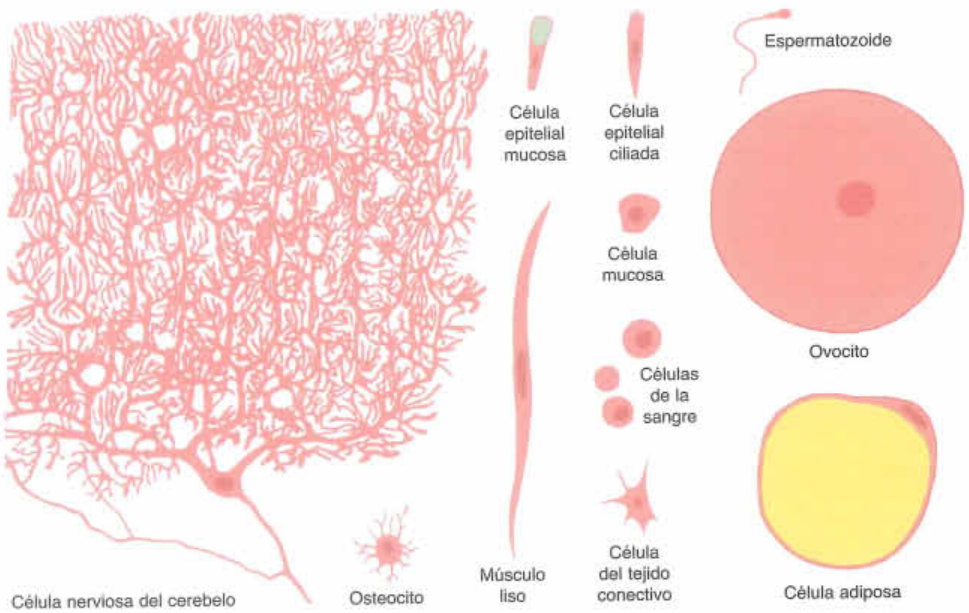


Fig. 1-8. Algunos de los tipos celulares que se encuentran en los tejidos animales. Obsérvense las diferencias de formas y tamaños.

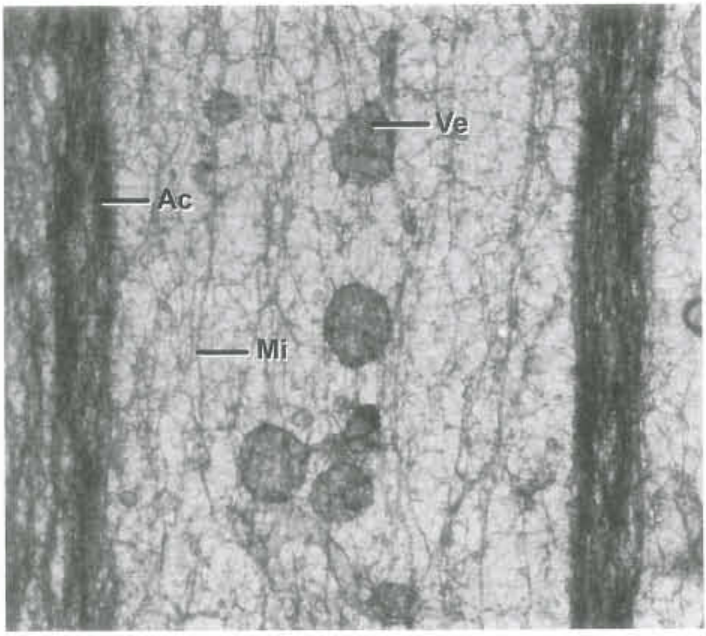


Fig. 1-9. Micrografía electrónica de una célula cultivada. Se observan dos haces de filamentos de actina (*Ac*), un gran número de microtúbulos (*Mi*) y vesículas llenas de material (*Ve*). (Cortesía de K. R. Porter.)

1-11. El sistema de endomembranas abarca el complejo de Golgi, el retículo endoplasmático, los endosomas y los lisosomas

La figura 1-6 ilustra la continuidad y las interconexiones funcionales de los distintos componentes del **sistema de endomembranas** en el citoplasma.

El **retículo endoplasmático** constituye la parte más extensa del sistema de endomembranas (figs. 1-6 y 1-10). Está compuesto por sacos aplanados y túbulos. La superficie externa del retículo endoplasmático rugoso se halla cubierta por ribosomas, los cuales sintetizan las proteínas destinadas al sistema de endomembranas y a la membrana plasmática. El retículo endoplasmático liso se continúa con el rugoso e interviene en la síntesis de diversas moléculas. Del retículo endoplasmático deriva la **envoltura nuclear**, compuesta por dos membranas concéntricas. Estas se unen entre sí a nivel de los poros nucleares, que son orificios que permiten el paso de moléculas entre el núcleo y el citosol. La membrana nuclear interna se halla en contacto con los cromosomas, mientras que la externa suele estar cubierta por ribosomas.

El **complejo de Golgi** está formado por pilas de sacos aplanados, túbulos y vesículas (figs. 1-6 y 1-10). En él se procesan moléculas provenientes del retículo endoplasmático, las cuales son luego incorporadas a endosomas o son liberadas (secretadas) fuera de la célula por exocitosis.

Los **endosomas** son organoides destinados a recibir enzimas hidrolíticas provenientes del complejo de Golgi, así como el material ingresado en la célula por endocitosis.

Los **lisosomas** son organoides polimorfos derivados de los endosomas (figs. 1-6 y 1-11). Al igual que éstos, contienen las enzimas hidrolíticas responsables de la digestión de las sustancias incorporadas a la célula por endocitosis. También degradan a las proteínas de la membrana plasmática que ya no se usan y a los organoides obsoletos (autofagia).

1-12. Las mitocondrias y los plástidos son organoides fundamentales para el funcionamiento celular

Las **mitocondrias** se encuentran prácticamente en todas las células eucariotas. Son estructuras cilíndricas de alrededor de 3 μm de largo por 0,5 μm de diámetro que poseen dos membranas. La membrana mitocondrial externa está separada de la membrana interna por el espacio intermembranoso. La membrana interna rodea a la matriz mitocondrial y se halla plegada. Los pliegues dan lugar a las llamadas crestas mitocondriales, que invaden la matriz (figs. 1-6 y 1-11). La membrana interna y la matriz mitocondrial contienen numerosas enzimas que intervienen en la extracción de la energía de los alimentos y en su transferencia al ATP.

Las células vegetales poseen organoides denominados **plástidos**, los cuales están ausentes en las células animales. Algunos, como los leucoplastos, son incoloros y participan en el almacenamiento del almidón. Otros contienen pigmentos y se denominan cromoplastos; entre los más importantes se encuentran los **cloroplastos**, con un pigmento verde llamado clorofila (fig. 1-7). El cloroplasto posee dos membranas, una estroma y un compartimiento singular formado por sacos aplanados denominados tilacoides. En los cloroplastos tiene lugar la fotosíntesis, que es el proceso mediante el cual las plantas captan la energía de la luz y, con el aporte de H_2O y CO_2, sintetizan diversos compuestos orgánicos que aprovechan como alimento y que sirven para alimentar a los organismos heterótrofos.

Tanto las mitocondrias como los cloroplastos contienen cromosomas circulares pequeños, cuyos genes forman ARNt, ribosomas y unos pocos ARNm necesarios para elaborar algunas proteínas pertenecientes a los propios organoides.

1-13. Los peroxisomas tienen funciones destoxificantes

Los **peroxisomas** están rodeados por una sola membrana. Contienen enzimas vinculadas con la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y una de sus funciones es proteger a la célula.

1-14. La presencia del núcleo caracteriza a la célula eucariota

Salvo excepciones, todas las células eucariotas poseen **núcleo**. En general, la forma del núcleo y la de la célula se hallan relacionadas. Por ejemplo, en las células esféricas, cúbicas y poliédricas el núcleo suele ser esférico, mientras que en las cilíndricas y fusiformes suele ser elipsoidal.

En las distintas células somáticas los núcleos tienen tamaños específicos, que dependen de las proteínas contenidas en ellos. Dichos tamaños varían levemente con la actividad nuclear. En general, existe una proporción óptima entre el volumen del núcleo y el volumen del citoplasma; esta proporción se conoce como ***relación nucleocitoplasmática***.

Casi todas las células son mononucleadas, pero existen algunas binucleadas (por ejemplo, las células hepáticas y las cartilaginosas) y otras polinucleadas. En los plasmodios y los sincicios —que constituyen grandes masas citoplasmáticas no divididas en territorios celulares independientes— los núcleos pueden ser extraordinariamente numerosos. Tal es el caso de la célula muscular estriada y del sinciciotrofoblasto placentario, que pueden contener varios centenares de núcleos.

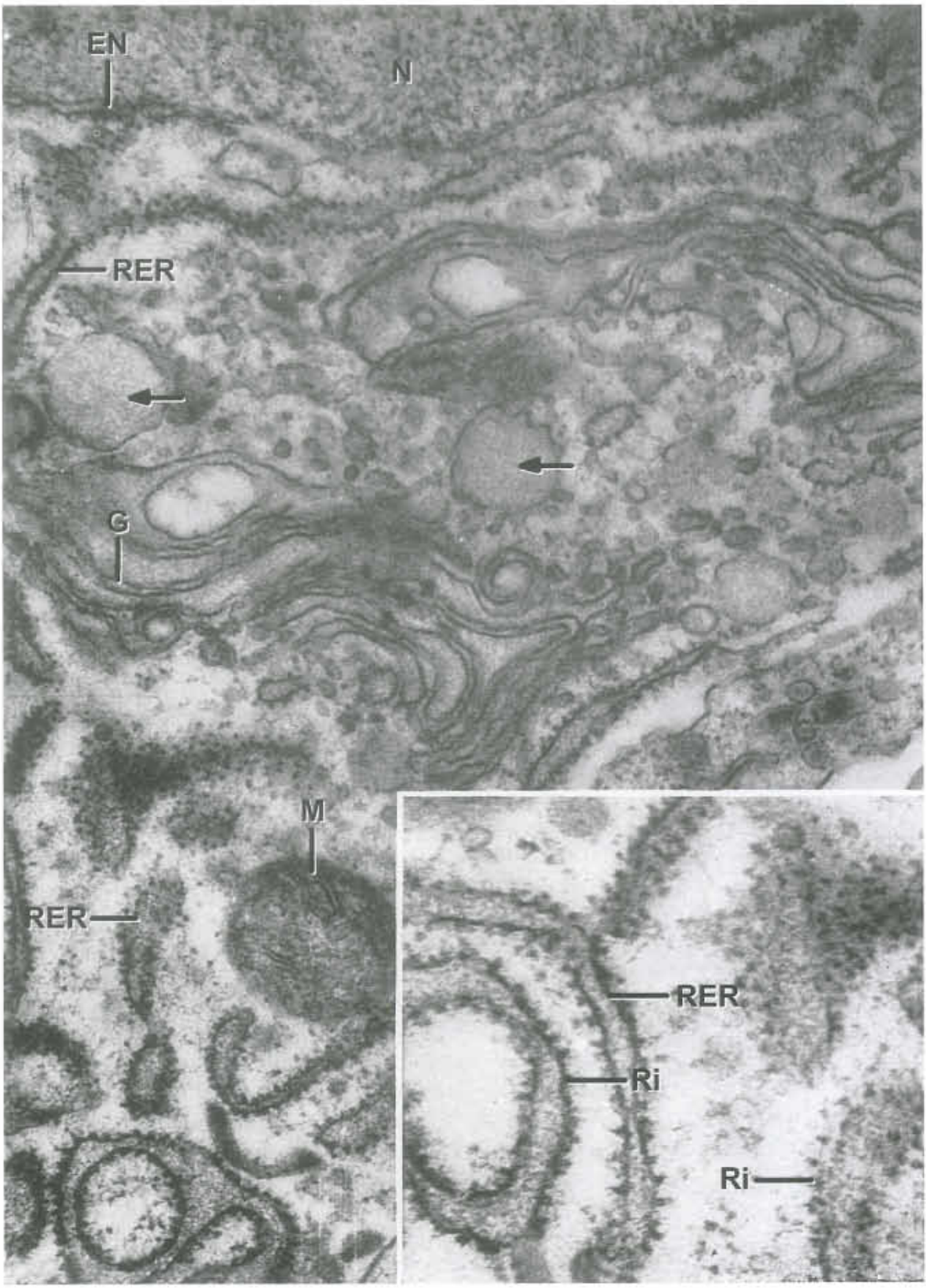


Fig. 1-10. Micrografía electrónica de una célula plasmática. Cerca del núcleo (*N*) se observa el complejo de Golgi (*G*), constituido por pequeñas cisternas aplanadas y vesículas. Algunas vesículas se encuentran llenas de material (*flechas*). Alrededor del complejo de Golgi existe un abundante retículo endoplasmático rugoso (*RER*) con cisternas llenas de material amorfo (*flechas*). *Ri*, ribosomas; *M*, mitocondrias; *EN*, envoltura nuclear. 48.000×; recuadro, 100.000×. (De E. D. De Robertis y A. Pellegrino de Iraldi.)

El crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos dependen del crecimiento y la multiplicación de sus células. En los organismos unicelulares, la división celular implica su reproducción; por este proceso, a partir de una célula se originan dos células hijas independientes. Por el contrario, los organismos multicelulares derivan de una sola célula —el cigoto—, y la repetida multiplicación de ésta y de sus descendientes determina el desarrollo y el crecimiento corporal del individuo.

La célula crece y duplica todas sus moléculas y estructuras antes de que se produzca su división. Este proceso se repite nuevamente en las dos células hijas, de modo que el volumen total de las células descendientes es cuatro veces mayor que el de la célula original, y así sucesivamente.

Las células pasan por dos períodos en el curso de sus vidas: uno de **interfase** (no división) y otro de **división** (en el cual se producen dos células hijas). Este ciclo se repite en cada generación celular, pero el tiempo varía considerablemente de un tipo celular a otro. La función esencial del núcleo es proporcionar a la célula la información genética almacenada en el ADN.

Las moléculas de ADN se duplican durante un período especial de la interfase denominado **fase S** (por *síntesis de ADN*), en preparación para la división celular (fig. 18-2).

Durante la interfase la información contenida en los genes es transcripta en diferentes clases de moléculas de ARN (mensajero, ribosómico y de transferencia), las cuales, después de pasar al citoplasma, traducen esa información y sintetizan proteínas específicas.

En el núcleo interfásico humano se reconocen las siguientes estructuras (fig. 1-6): 1) la **envoltura nuclear** o **carioteca**, compuesta por dos membranas perforadas por orificios llamados poros nucleares; 2) la **matriz nuclear** o **nucleoplasma**, que ocupa gran parte del espacio nuclear; 3) el **nucléolo**, que es más grande en las células con síntesis proteica muy activa, por lo general esférico; puede ser único o múltiple y en él se sintetizan los ARN ribosómicos, los cuales se asocian con numerosas proteínas para formar los ribosomas; 4) **46 cromosomas** o **fibras de cromatina**; éstas se componen de ADN y de proteínas básicas llamadas histonas.

El ADN y las histonas forman estructuras granulares de unos 10 nm de diámetro —conocidas como **nucleosomas**—, que alternan con tramos de ADN libres de histonas. La cromatina así dispuesta es la más delgada (fig. 12-10) y es capaz de enrollarse sobre sí misma en distintos grados. En la interfase pueden verse regiones de **eucromatina**, donde las fibras se encuentran menos enrolladas, y regiones de **heterocromatina**, que representan las partes más condensadas de la cromatina. Durante la división celular las fibras de cromatina se enrollan al máximo, de modo que se las puede observar con el microscopio óptico bajo la forma de cromosomas (del griego *chrōma*, color, y *sôma*, cuerpo) (fig. 12-14).

1-15. Los núcleos de las células somáticas contienen dos juegos de cromosomas homólogos

Los organismos pluricelulares que se reproducen sexualmente se desarrollan a partir de una sola célula —el **cigoto** o **célula huevo**—, que resulta de la unión de un ovocito con un espermatozoide durante la fecundación.

BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

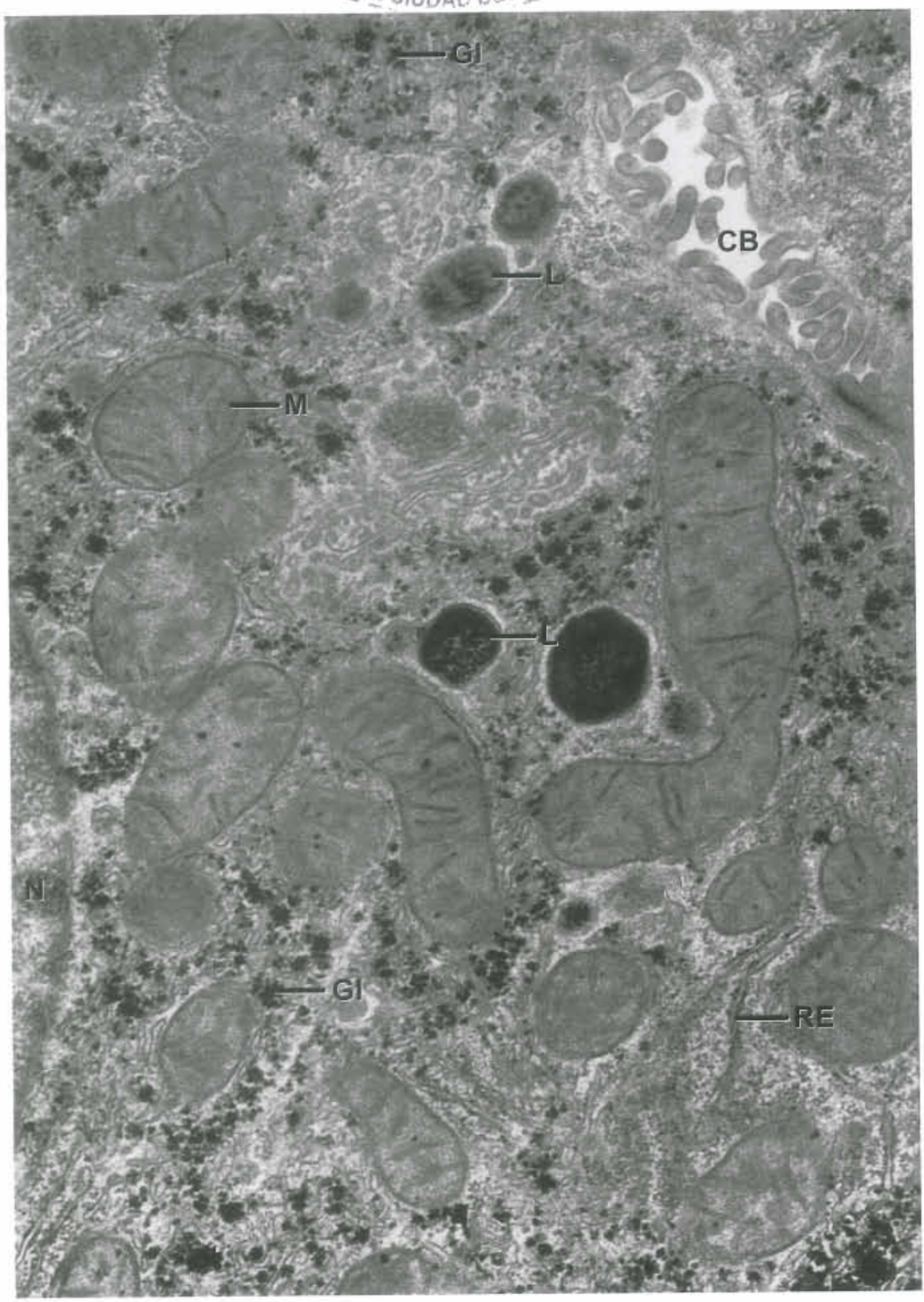


Fig. 1-11. Región periférica de una célula hepática en la que, entre otros componentes, se observan lisosomas (*L*), el núcleo (*N*), un canalículo biliar (*CB*), mitocondrias (*M*), el retículo endoplasmático (*RE*) e inclusiones de glucógeno (*Gl*). 31.000×. (Cortesía de K. R. Porter.)

Las células somáticas descendientes del cigoto contienen dos juegos idénticos de cromosomas. En otras palabras, los cromosomas se presentan de a pares. Un cromosoma de cada par es aportado por el ovocito y el otro por el espermatozoide.

Los dos miembros de cada par de cromosomas se denominan **homólogos**, y para indicar el número de cromosomas de una especie se hace referencia a los pares de cromosomas o a los pares de homólogos. Por ejemplo, el ser humano posee 23 pares de cromosomas, 46 en total. Los homólogos de cada par son prácticamente idénticos, pero los distintos pares de homólogos son diferentes entre sí.

Para hacer referencia a la presencia de los dos juegos de cromosomas homólogos se utiliza la expresión **diploide** (2n). En las células somáticas ambos juegos de cromosomas se conservan durante las sucesivas divisiones celulares a lo largo del desarrollo embrionario, el crecimiento corporal y el mantenimiento de los tejidos en la vida posnatal.

1-16. La mitosis mantiene la continuidad y el número diploide de los cromosomas

La estabilidad del número cromosómico es mantenida por medio de una clase especial de división celular, denominada **mitosis**. En ella se generan núcleos hijos con el mismo número de cromosomas; por consiguiente, en cuanto a su constitución cromosómica las células hijas son idénticas entre sí y a sus antecesoras.

La mitosis comprende una serie consecutiva de fases, conocidas como **profase**, **prometafase**, **metafase**, **anafase** y **telofase**.

En la mitosis el núcleo experimenta una serie de cambios complejos. Entre los más llamativos se encuentran la desaparición de la envoltura nuclear y una mayor condensación de las fibras de cromatina, las cuales se convierten en cromosomas detectables.

Vimos que en el núcleo interfásico los cromosomas no pueden ser individualizados porque en esa etapa del ciclo celular las fibras de cromatina se hallan más desenrolladas.

En la figura 1-12 se representan dos de los 46 pares de cromosomas homólogos presentes normalmente en las células somáticas humanas. Como se vio, los cromosomas se duplican durante la fase S de la interfase. En la profase temprana cada cromosoma —compuesto por dos fibras de cromatina— aparece como un filamento muy delgado. Al final de la profase se convierte en un bastón corto y compacto, dado que se enrollan sus dos fibras de cromatina, que pasan a llamarse **cromátidas**. Pasada la metafase, en el transcurso de la anafase ambas cromátidas se separan y cada cromátida hija —es decir, cada cromosoma hijo— se dirige a uno de los polos de la célula. Finalmente, en la telofase se forman sendos núcleos a partir de los dos conjuntos de cromosomas separados.

La división celular concluye con la partición del citoplasma, conocida como **citocinesis**.

De esta manera, las mitosis mantienen el número diploide de cromosomas (2n) en el núcleo de las células somáticas a lo largo de toda la vida del individuo.

1-17. La meiosis reduce los cromosomas a un número haploide

Si los gametos (óvulo y espermatozoide) fueran diploides, el cigoto resultaría con el doble del número diploide de cromosomas. Para evitarlo, las células sexuales predecesoras de los gametos experimentan un tipo especial de división celular denominado **meiosis,** en el que el número diploide se reduce a un juego único o **haploide** (1n) en cada gameto formado. El cigoto resultará así nuevamente diploide.

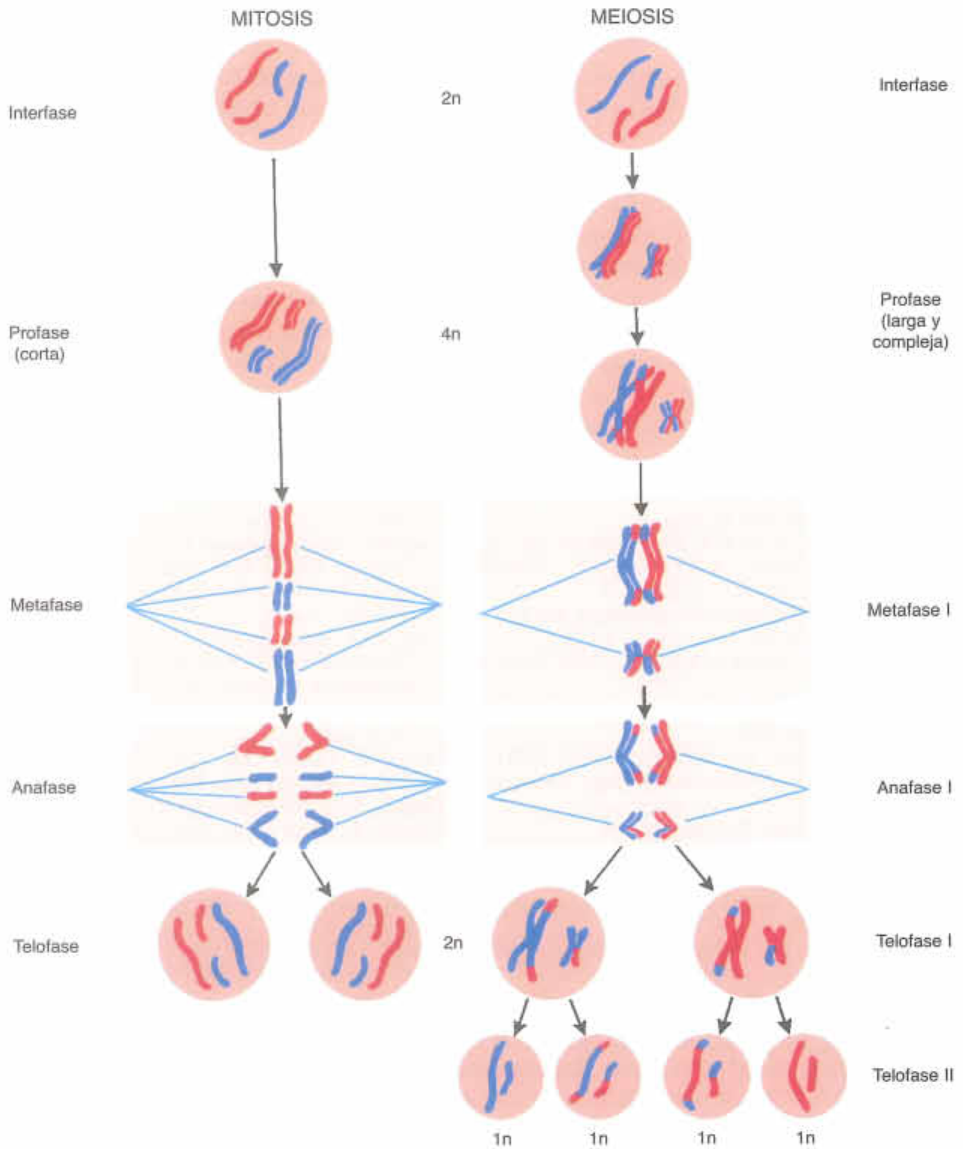


Fig. 1-12. Esquemas comparativos de la mitosis y la meiosis de una célula diploide (*2n*) con cuatro cromosomas. Los cromosomas procedentes de cada progenitor están representados en azul y en rojo, respectivamente. En la mitosis, la división es ecuacional, mientras que en la meiosis es reduccional. Las dos divisiones de la meiosis dan lugar a cuatro células haploides (*1n*) que tienen sólo dos cromosomas. Además, durante la meiosis existe un intercambio de segmentos entre los cromosomas.

La división meiótica se cumple en los animales (cap. 19-1) y los vegetales (cap. 19-20) que se reproducen sexualmente y tiene lugar en el curso de la gametogénesis (fig. 1-12). La meiosis reduce el número de cromosomas mediante dos divisiones nucleares sucesivas —la primera y la segunda división meiótica—, dado que son acompañadas por una sola duplicación cromosómica.

En esencia, el proceso es el siguiente. En la profase de la primera división los cromosomas homólogos se aparean. Puesto que cada cromosoma se compone de dos cromátidas, forman un bivalente compuesto por cuatro cromátidas (por ello se lo llama también tétrada). Además, partes de las cromátidas apareadas suelen intercambiarse de un homólogo a otro. Este fenómeno recibe el nombre de **recombinación genética** (en inglés, *crossing-over*).

En la metafase de la misma división, los bivalentes (o tétradas) se disponen en el plano ecuatorial de la célula.

En la anafase cada cromosoma homólogo —con sus dos cromátidas— se dirige hacia uno de los polos opuestos.

Después de un corto período de interfase, ya en la anafase de la segunda división meiótica, las dos cromátidas de cada homólogo se separan, de modo que cada cromátida queda localizada en uno de los cuatro gametos resultantes. Como consecuencia, en los gametos el núcleo contiene un número simple (o haploide) de cromosomas (fig. 1-12).

BIBLIOGRAFIA

Bauneister W. (1978) Biological horizons in molecular microscopy. Cytobiologie 17:246.

Bernal J.D. and Synge A. (1973) The origin of life. In: Readings in Genetics and Evolution. Oxford University Press, London.

Bevéridge T.J. (1981) Ultrastructure, chemistry and function of bacterial wall. Int. Rev. Cytol. 72:299.

Claude A. (1975) The coming of age of the cell. Science 189:433.

de Duve C. (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. Nature Rev. Genet. 8:395.

De Robertis E.D.P. and De Robertis E.M.F. (1981). Essentials of Cell and Molecular Biology. Saunders, Philadelphia.

Diener T.O. (1981) Viroids. Sci. Am. 244:66.

Giese A.C. (1979) Cell Physiology, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.

Gray M.W. (1989) The evolutionary origins of organelles. Trends Genet. 5:294.

Hayflick L. (1980) The cell biology of human aging. Sci. Am. 242: 58.

Hess E.L. (1970) Origins of molecular biology. Science 168:664.

Jacob F. (1977) Evolution and tinkering. Science 196:1161.

Johnson J.E. (1982) Aging and Cell Structure, Vol 1. Academic Press, New York.

Joyce G.F. (1992) Directed molecular evolution. Sci. Am. 267:90.

Lodish H., Berk A., Kaiser C. et al. (2007) Molecular Cell Biology, 6th Ed. W.H. Freeman, New York.

Margulis L. (1971) Symbiosis and evolution. Sci. Am. 225:48.

Margulis L. and Schwartz K.V. (1982) Five Kingdoms. An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth. W.H. Freeman & Co, New York.

Monod J. (1971) Chance and Necessity. Random House, New York.

National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Orgel L.E. (1992) Molecular replication, Nature 358:203.

Pennisi E (2004) The birth of the nucleus. Science 305:766.

Schwartz R. and Dayhoff M. (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts. Science 199:395.

Watson J.D., Baker T.A., et al. (2007) Molecular Biology of the Gene, 6th Ed. W.A. Benjamin-Cummings, Menlo Park.

Woese C.R. and Fox G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5088.

Componentes químicos de la célula 2

INTRODUCCION

2-1. Los componentes químicos de la célula se clasifican en inorgánicos y orgánicos

La estructura de la célula es la consecuencia de una combinación de moléculas organizadas en un orden muy preciso. Aun cuando queda mucho por aprender, se conocen los principios generales de la organización molecular de todas las estructuras celulares, como los cromosomas, las membranas, los ribosomas, las mitocondrias, los cloroplastos, etc. La biología de la célula es inseparable de la de las moléculas; de la misma manera que las células son los bloques con que se edifican los tejidos y los organismos, las moléculas son los bloques con que se construyen las células.

Al principio, el estudio de la composición química de la célula se hizo mediante el análisis bioquímico de órganos y tejidos enteros, como el hígado, el cerebro, la piel o el meristema vegetal. Estos estudios sólo poseen un valor citológico relativo porque el material analizado está compuesto generalmente por una mezcla de diferentes tipos celulares y contiene material extracelular. En los últimos años el desarrollo de nuevos métodos de estudio de los componentes químicos de la célula (capítulo 23) permitió aislar los elementos subcelulares y recoger informaciones sumamente precisas sobre las estructuras moleculares de los mismos.

Los componentes químicos de la célula se clasifican en inorgánicos (agua y minerales) y orgánicos (ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y proteínas).

Del total de los componentes de la célula un 75 a 85% corresponde a **agua**, entre el 2 y el 3% son **sales inorgánicas** y el resto son compuestos orgánicos, los cuales representan las moléculas de la vida. La mayor parte de las estructuras celulares contienen **lípidos** y moléculas muy grandes —denominadas macromoléculas o **polímeros**—, integradas por unidades o monómeros que se enlazan entre sí por medio de uniones covalentes.

En los organismos existen tres importantes polímeros: 1) los **ácidos nucleicos**, conformados por la asociación de cuatro unidades químicas diferentes denominadas nucleótidos; la secuencia lineal de los cuatro tipos de nucleótidos en la molécula de ADN es la fuente primaria de la información genética; 2) los **polisacáridos**, que pueden ser polímeros de glucosa —con la cual se forma glucógeno, almidón o celulosa— o comprender la repetición de otros monosacáridos, con los que se forman polisacáridos más comple-

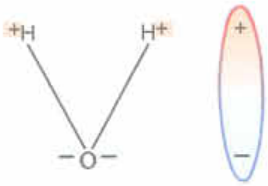


Fig. 2-1. Esquema que muestra la distribución asimétrica de las cargas en la molécula de agua.

jos, y 3) las **proteínas** (polipéptidos), que están constituidas por aminoácidos —existen 20 tipos— combinados en diferentes proporciones; las distintas cantidades y ordenamientos posibles de estos 20 monómeros dan lugar a un extraordinario número de combinaciones, lo que determina no sólo la especificidad sino también la actividad biológica de las moléculas proteicas.

Además de destacar las características y propiedades de los componentes químicos de la célula, en este capítulo abordaremos el estudio de las **enzimas** —un tipo específico de proteínas— como instrumentos moleculares capaces de producir transformaciones en muchos de esos componentes.

También veremos cómo las macromoléculas pueden agregarse y organizarse en estructuras supramoleculares más complejas hasta resultar visibles con el microscopio electrónico. Es probable que tales agregaciones moleculares hayan actuado durante el período de evolución química y biológica que dio origen a la primera célula. Por tal motivo, al final del capítulo haremos algunas consideraciones especulativas acerca del posible origen de las células procariotas y eucariotas, es decir, de la aparición de la vida en nuestro planeta. Los conceptos vertidos en este capítulo sólo sirven como una introducción elemental para el conocimiento de la biología molecular y celular. El estudio más amplio de sus temas compete a los textos de bioquímica.

AGUA Y MINERALES

2-2. El agua es el componente más abundante de los tejidos

Agua. Con unas pocas excepciones —por ejemplo, el hueso y el diente— el agua es el componente que se encuentra en mayor cantidad en los tejidos. El contenido de agua del organismo está relacionado con la edad y con la actividad metabólica; es mayor en el embrión (90-95%) y disminuye con los años. El agua actúa como solvente natural de los iones y como medio de dispersión coloidal de la mayor parte de las macromoléculas. Más aún, es indispensable para la actividad metabólica, ya que los procesos fisiológicos se producen exclusivamente en medios acuosos.

En la célula el agua se encuentra en dos fracciones, una libre y otra ligada. El **agua libre** representa el 95% del agua total y es la parte usada principalmente como solvente para los solutos y como medio dispersante del sistema coloidal. El **agua ligada** representa sólo el 5% y es la que está unida laxamente a otras moléculas por uniones no covalentes (sección 2-10); así, comprende el agua inmovilizada en el seno de las macromoléculas.

Como resultado de la distribución asimétrica de sus cargas, una molécula de agua se comporta como un dipolo, según se ilustra en la figura 2-1. A causa de esta propiedad, por sus grupos positivos y negativos el agua puede ligarse electrostáticamente tanto con aniones y cationes como con moléculas portadoras de ambos tipos de carga (por ejemplo, proteínas). Otra propiedad de la molécula de agua es su ionización en un anión hidroxilo (OH^-) y un protón o ion hidrógeno (H^+). A 25 °C de temperatura se disocian 10^{-7} M de H^+ por litro de agua, concentración que corresponde al pH 7 neutro.

El agua interviene en la eliminación de sustancias de la célula. Además absorbe calor (gracias a su elevado coeficiente calórico), lo cual evita que se generen cambios drásticos de temperatura en la célula.

Sales. La concentración de iones es distinta en el interior de la célula y en

el medio que la rodea. Así, la célula tiene una alta concentración de cationes K^+ y Mg^{2+}, mientras que el Na^+ y el Cl^- están localizados principalmente en el líquido extracelular. Los aniones dominantes en las células son el fosfato (HPO_4^{2-}) y el bicarbonato (HCO_3^-).

Las sales disociadas en aniones (por ejemplo, Cl^-) y cationes (Na^+ y K^+) son importantes para mantener la presión osmótica y el equilibrio ácido-base de la célula. La retención de iones produce un aumento de la presión osmótica y, por lo tanto, la entrada de agua.

Algunos iones inorgánicos (como el Mg^{2+}) son indispensables como cofactores enzimáticos. Otros forman parte de distintas moléculas. El fosfato, por ejemplo, se encuentra en los fosfolípidos y en los nucleótidos; uno de éstos, la adenosina trifosfato (ATP), es la principal fuente de energía para los procesos vitales de la célula. Los iones de Ca^{2+} que se hallan en las células desempeñan un importante papel como transmisores de señales. Otros iones presentes en las células son el sulfato, el carbonato, etcétera.

Ciertos minerales se encuentran en forma no ionizada. Así ocurre con el calcio, que en los huesos y en los dientes se halla unido al fosfato y al carbonato bajo la forma de cristales. Otro ejemplo comprende al hierro, que en la hemoglobina, la ferritina, los citocromos y en varias enzimas se halla ligado por uniones carbono-metal.

Para mantener la actividad celular normal son indispensables diminutas cantidades de manganeso, cobre, cobalto, yodo, selenio, níquel, molibdeno y cinc. Casi todos estos elementos vestigiales (u oligoelementos) son necesarios para la actividad de ciertas enzimas. El yodo es un componente de la hormona tiroidea.

ACIDOS NUCLEICOS

2-3. Existen dos clases de ácidos nucleicos, el ADN y el ARN

Los ácidos nucleicos son macromoléculas de enorme importancia biológica. Todos los seres vivos contienen dos tipos de ácidos nucleicos, llamados **ácido desoxirribonucleico** (**ADN**) y **ácido ribonucleico** (**ARN**). Los virus contienen un solo tipo de ácido nucleico, ADN o ARN.

El ADN constituye el depósito de la información genética. Esta información es copiada o **transcripta** en moléculas de ARN mensajero, cuyas secuencias de nucleótidos contienen el código que establece la secuencia de los aminoácidos en las proteínas. Es por ello que la síntesis proteica se conoce también como **traducción** del ARN. A esta serie de fenómenos se le asigna el carácter de ***dogma central*** de la biología molecular, que puede expresarse de la siguiente manera:

$$\text{ADN} \xrightarrow{\text{transcripción}} \text{ARN} \xrightarrow{\text{traducción}} \text{PROTEINA}$$

El papel biológico de los ácidos nucleicos se estudiará detalladamente en los capítulos 12 a 17; aquí se considerará sólo su estructura química, lo que permitirá comprender sus funciones.

En las células superiores el ADN se halla en el núcleo integrando los cromosomas (una pequeña cantidad se encuentra en el citoplasma, dentro de las mitocondrias y los cloroplastos). El ARN se localiza tanto en el núcleo (don-

de se forma) como en el citoplasma, hacia el cual se dirige para regir la síntesis proteica (tabla 2-1).

Los ácidos nucleicos contienen hidratos de carbono (pentosas), bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y ácido fosfórico. La hidrólisis del ADN o del ARN genera:

		ADN	ARN
PENTOSA		desoxirribosa	ribosa
BASES	*Purinas*	adenina, guanina	adenina, guanina
	Pirimidinas	citosina, timina	citosina, uracilo
ACIDO FOSFÓRICO		PO_4H_3	PO_4H_3

La molécula de ácido nucleico es un polímero cuyos monómeros son nucleótidos sucesivamente ligados mediante **uniones fosfodiéster** (fig. 2-2). En estas uniones los fosfatos ligan el carbono 3′ de la pentosa de un nucleótido con el carbono 5′ de la pentosa del nucleótido siguiente. En consecuencia, el eje del ácido nucleico está constituido por las pentosas y los fosfatos, y las bases nitrogenadas surgen de las pentosas. El extremo de la molécula que contiene la pentosa con el C5′ libre se llama extremo 5′, y el que posee la pentosa con el C3′ libre, extremo 3′.

Como ilustra la figura 2-2, el **ácido fosfórico** utiliza dos de sus tres grupos ácidos en las uniones 3′,5′-diéster. El grupo restante confiere al ácido nucleico sus propiedades ácidas, lo que posibilita la formación de uniones iónicas con proteínas básicas (en el capítulo 1-14 se señaló que en las células eucariotas el ADN está asociado con proteínas básicas llamadas histonas, con las que forma el complejo nucleoproteico denominado cromatina). Además, dicho grupo ácido libre hace que los ácidos nucleicos sean basófilos (se colorean con colorantes básicos).

Las **pentosas** son de dos tipos: **desoxirribosa** en el ADN y **ribosa** en el ARN. La diferencia entre estos azúcares es que la desoxirribosa tiene un átomo de oxígeno menos (fig. 2-2). Para visualizar el ADN con el microscopio óptico se puede utilizar una reacción citoquímica específica denominada reacción de Feulgen (cap. 23-21).

Las **bases nitrogenadas** que se encuentran en los ácidos nucleicos son también de dos tipos: pirimidinas y purinas. Las ***pirimidinas*** poseen un anillo heterocíclico, mientras que las ***purinas*** tienen dos anillos fusionados entre sí. En el ADN, las pirimidinas son la **timina** (**T**) y la **citosina** (**C**), y

Tabla 2-1. Acidos nucleicos

	Acido desoxirribonucleico	*Acido ribonucleico*
Localización	Principalmente en el núcleo (también en las mitocondrias y los cloroplastos)	Principalmente en el citoplasma (también en el núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos)
Papel en la célula	Información genética	Síntesis de proteínas
Pentosa	Desoxirribosa	Ribosa
Bases pirimidínicas	Citosina Timina	Citosina Uracilo
Bases purínicas	Adenina Guanina	Adenina Guanina

- Acc. Nº 3985. -
- Fecha: 28-06-2017.

las purinas, la **adenina** (A) y la **guanina** (G) (fig. 2-5). El ARN contiene **uracilo** (U) en lugar de timina. Existen tres diferencias fundamentales entre el ADN y el ARN. Como se acaba de señalar, el ADN tiene desoxirribosa y timina (T) y el ARN posee ribosa y uracilo (U). Otra diferencia es que la molécula de ADN es siempre doble (contiene dos cadenas polinucleotídicas), como se verá en la próxima sección.

La combinación de una base con una pentosa (sin el fosfato) constituye un **nucleósido**. Por ejemplo, la adenosina (adenina + ribosa) es un nucleósido, mientras que la adenosina monofosfato (***AMP***), la adenosina difosfato (***ADP***) y la adenosina trifosfato (***ATP***) son ejemplos de **nucleótidos** (fig. 2-3).

Además de actuar como bloques para la construcción de los ácidos nucleicos, los nucleótidos —por ejemplo, el recién citado ATP— son utilizados para depositar y transferir energía química. La figura 2-3 muestra que las dos uniones fosfato terminales del ATP contienen gran cantidad de energía. Cuando se produce la hidrólisis de estas uniones, la energía liberada puede ser usada por la célula para realizar sus actividades (fig. 8-1). La unión ~ P de alta energía permite que la célula acumule gran cantidad de ella en un espacio reducido y que la mantenga lista para usarla en el momento en que es necesaria.

Otros nucleótidos, como la citidina trifosfato (***CTP***), la uridina trifosfato (***UTP***), la guanosina trifosfato (***GTP***) y la timosina trifosfato (***TTP***), tienen también uniones de alta energía, pero la fuente principal de energía de la célula es el ATP.

El ADN se encuentra en los organismos vivos bajo la forma de moléculas de muy alto peso molecular. Por ejemplo, la *Escherichia coli* tiene una molécula de ADN circular de 3.400.000 pares de bases con una longitud de 1,4 mm. La cantidad de ADN en los organismos superiores puede ser varios cientos de veces mayor, 1.200 veces en el caso del hombre. Así, el ADN completamente extendido de una célula diploide humana tiene una longitud total de alrededor de 1,70 m.

Toda la información genética de un organismo vivo se encuentra acumulada en la secuencia lineal de las cuatro bases de sus ácidos nucleicos. La estructura primaria de todas la proteínas (es decir, la cantidad y la secuencia de sus aminoácidos) es codificada por un alfabeto de cuatro letras (A, T, G, C). Uno de los descubrimientos más extraordinarios de la biología molecular fue el hallazgo y la interpretación de este **código genético** (cap. 13-4).

Un paso previo a ese descubrimiento —que tuvo una gran influencia en la dilucidación de la estructura del ADN— fue conocer que en cada molécula de ADN la cantidad de adenina es igual a la de timina (A = T) y la de citosina igual a la de guanina (C = G). En consecuencia, el número de purinas es idéntico al de pirimidinas (A + G = C + T). Como es lógico, la relación AT/GC varía entre las especies (por ejemplo, en el hombre la relación es de 1,52 y en la *Escherichia coli* es de 0,93).

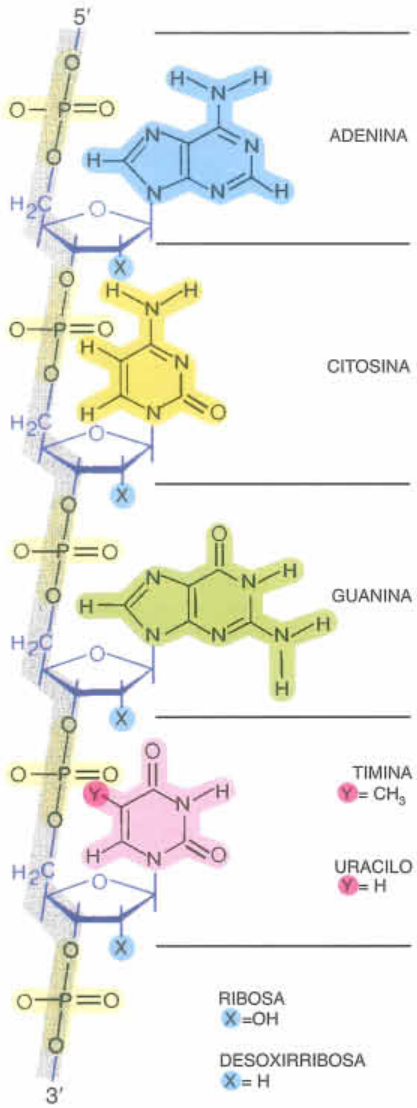


Fig. 2-2. Sector de una cadena de ácido nucleico que muestra los distintos tipos de nucleótidos que la componen.

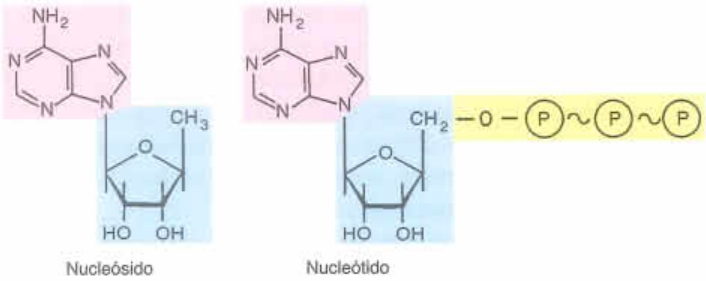


Fig. 2-3. Estructura química del nucleósido adenosina y del nucleótido adenosina trifosfato (ATP).

2-4. El ADN es una doble hélice

En 1953, basándose en los datos obtenidos por Wilkins y Franklin mediante difracción de rayos X, Watson y Crick propusieron un modelo para la estructura del ADN que contemplaba las propiedades químicas antedichas, pero también las propiedades biológicas, en especial la capacidad de duplicación de la molécula.

La molécula de ADN se ilustra en la figura 2-4. Está formada por **dos cadenas** de ácidos nucleicos helicoidales con giro a la derecha, que componen una ***doble hélice*** en torno de un mismo eje central. Las dos cadenas son ***antiparalelas***, lo cual significa que sus uniones 3′,5′-fosfodiéster siguen sentidos contrarios. Las bases están situadas en el lado interior de la doble hélice, casi en ángulo recto con respecto al eje helicoidal. Cada vuelta completa de la doble hélice comprende 10,5 pares de nucleótidos y mide 3,4 nm.

Ambas cadenas se hallan unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno establecidos entre los pares de bases (sección 2-10). Puesto que entre las pentosas de las cadenas opuestas existe una distancia fija, pueden establecerse dentro de la estructura solamente ciertos pares de bases. Como se advierte en las figuras 2-4 y 2-5, los únicos pares posibles son **A-T**, **T-A**, **C-G** y **G-C**. Es importante observar que entre las A y las T se forman dos puentes de hidrógeno, y entre las C y las G, tres. En consecuencia, el par C-G es más estable que el par A-T. La doble estructura helicoidal se mantiene estabilizada gracias a los puentes de hidrógeno y a las interacciones hidrofóbicas existentes entre las bases de cada cadena.

Si bien en las distintas moléculas de ADN las secuencias de las bases a lo largo de las cadenas varían considerablemente, en una misma molécula de ADN las secuencias de las dos cadenas son ***complementarias***, como se aprecia en el siguiente ejemplo:

Cadena 1	5′	T	G	C	T	G	A	C	G	T	3′
		|	|	|	|	|	|	|	|	|	
Cadena 2	3′	A	C	G	A	C	T	G	C	A	5′

Debido a esta propiedad, al separarse las cadenas durante la duplicación del ADN, cada cadena individual sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. De este modo se generan dos moléculas hijas de ADN con la misma constitución molecular que poseía la progenitora (cap. 17-2).

2-5. Existen varios tipos de ARN

La estructura del ARN es semejante a la del ADN, excepto por la presencia de ribosa en lugar de desoxirribosa y de uracilo en lugar de timina (tabla 2-1). Además, la molécula de ARN está formada por **una sola cadena** de nucleótidos.

Existen tres clases principales de ARN: 1) **ARN mensajero (ARNm)**; 2) **ARN ribosómico (ARNr)**, y 3) **ARN de transferencia (ARNt)**. Los tres intervienen en la síntesis proteica. El ARNm lleva la información genética —copiada del ADN— que establece la secuencia de los aminoácidos en la proteína. El ARNr representa el 50% de la masa del ribosoma (el otro 50% son proteínas), que es la estructura que proporciona el sostén molecular para las reacciones químicas que dan lugar a la síntesis proteica. Los ARNt identifican y transportan a los aminoácidos hasta el ribosoma.

Aun cuando cada molécula de ARN tiene una sola cadena de nucleótidos, esto no significa que se encuentra siempre como una estructura lineal simple. En las moléculas de ARN suelen existir tramos con bases complementarias, lo que da lugar a puentes de hidrógeno, es decir, a la formación de pares de nucleótidos A-U y C-G entre varias regiones de la misma molécula. Las figuras 15-4, 15-5, 15-11, 15-12 y 16-3 muestran cómo la molécula de ARN puede aparear algunas de sus partes. En ellas suele formarse una estructura helicoidal semejante a la del ADN. Las estructuras tridimensionales de los ARN tienen importantes consecuencias biológicas.

HIDRATOS DE CARBONO

2-6. Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía de la célula

Los hidratos de carbono, compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, representan la principal fuente de energía para la célula y son constituyentes estructurales importantes de las membranas celulares y de la matriz extracelular. De acuerdo con el número de monómeros que contienen, se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Monosacáridos. Los monosacáridos son azúcares simples con una fórmula general $C_n(H_2O)_n$. Sobre la base del número de átomos de carbono que contienen, se clasifican en triosas, tetrosas, pentosas y hexosas.

Como vimos, las pentosas ***ribosa*** y ***desoxirribosa*** se hallan en los nucleótidos (fig. 2-2). La ***xilosa*** es una pentosa presente en algunas glicoproteínas (fig. 2-11). La ***glucosa***, que es una hexosa (fig. 2-6), constituye la fuente primaria de energía para la célula. Otras hexosas muy difundidas —que suelen estar asociadas entre sí bajo la forma de oligosacáridos o polisacáridos— son la ***galactosa***, la ***manosa***, la ***fructosa***, la ***fucosa***, el ***ácido glucurónico*** y el ***ácido idurónico***. Algunas poseen un grupo amino y se hallan acetiladas, como la ***N-acetilglucosamina*** y la ***N-acetilgalactosamina***. El ***ácido N-acetilneuramínico*** (o ***ácido siálico***) resulta de la unión de una aminohexosa con un compuesto de tres carbonos, el ácido pirúvico.

Disacáridos. Los disacáridos son azúcares formados por la combinación de dos monómeros de hexosa, con la correspondiente pérdida de una molécula de agua. Por lo tanto, su fórmula es $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Un disacárido importante en los mamíferos es la ***lactosa*** (glucosa + galactosa), el azúcar de la leche.

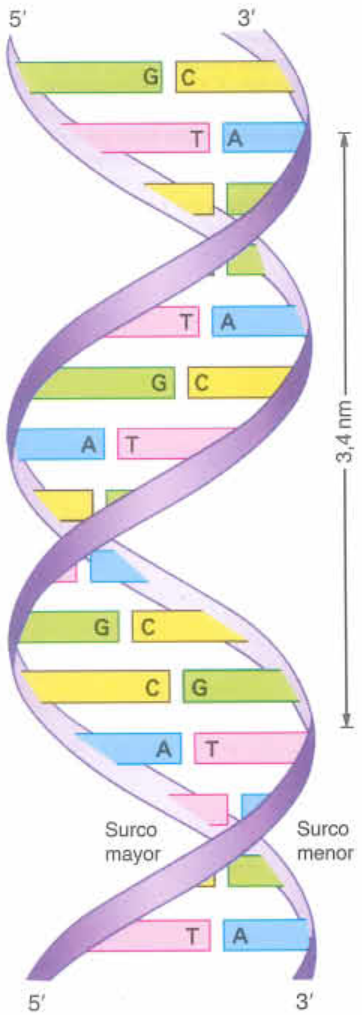


Fig. 2-4. Se muestra la doble hélice del ADN. Las cadenas desoxirribosa-fosfato se dibujaron como cintas. Las bases son perpendiculares al eje del ADN, de ahí que en esta vista lateral aparezcan representadas por barras horizontales. Adviértase que las dos cadenas son antiparalelas y que la doble hélice da una vuelta completa cada 10 pares de bases (3,4 nm). Obsérvese además que la doble hélice da lugar a dos hendiduras exteriores, el *surco mayor* y el *surco menor* del ADN.

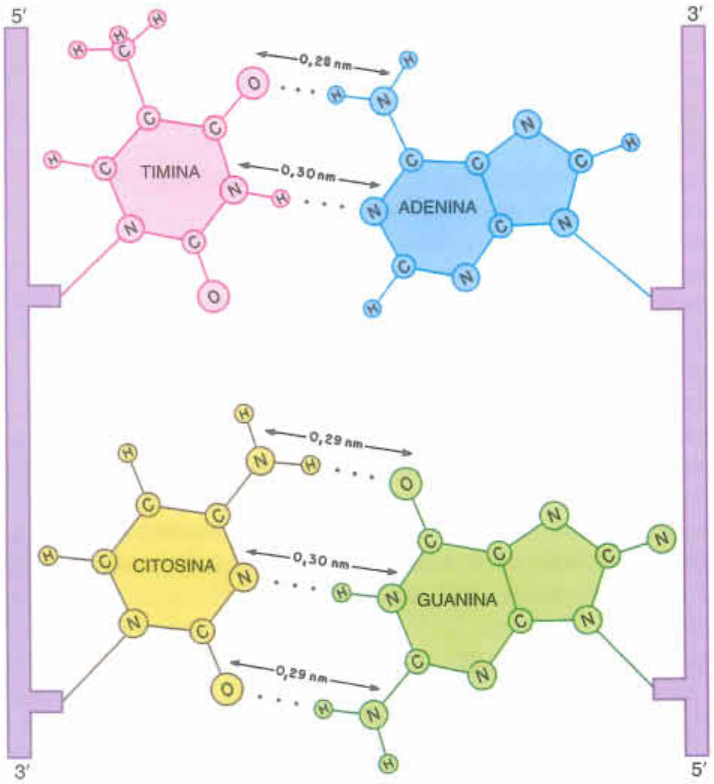


Fig. 2-5. Los dos pares de bases del ADN. Las bases complementarias son adenina y timina (A-T) y citosina y guanina (C-G). Obsérvese que en el par A-T hay dos puentes de hidrógeno, mientras que en el par C-G existen tres. La distancia entre las cadenas de desoxirribosa-fosfato es de aproximadamente 1,1 nm. (De L. Pauling y R. B. Corey.)

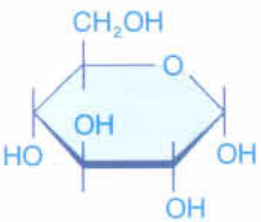
Oligosacáridos. En el organismo los oligosacáridos no están libres sino unidos a lípidos y a proteínas, de modo que son parte de glicolípidos y de glicoproteínas. Estos hidratos de carbono son cadenas —a veces ramificadas— compuestas por distintas combinaciones de varios tipos de monosacáridos.

Los oligosacáridos correspondientes a los **glicolípidos** serán analizados junto con los lípidos en la próxima sección.

Los oligosacáridos de las **glicoproteínas** se conectan con la cadena proteica por intermedio del grupo OH (***enlace O-glicosídico*** o ***unión O***) de una serina o de una treonina o a través del grupo amida (***enlace N-glicosídico*** o ***unión N***) de una asparagina. La serina, la treonina y la asparagina son aminoácidos (sección 2-8).

Por parte del oligosacárido, en los enlaces O-glicosídicos suele intervenir una N-acetilgalactosamina, y en los N-glicosídicos, una N-acetilglucosamina (figs. 2-7 y 2-8). Por lo tanto, estos monosacáridos son los más cercanos a la proteína. Contrariamente, los ácidos siálicos a menudo se localizan en la periferia del oligosacárido.

Fig. 2-6. Molécula de glucosa.



Los oligosacáridos enlazados mediante uniones O (es decir, a una serina o a una treonina) suelen poseer una galactosa unida a la primera N-acetilgalactosamina (fig. 2-7). A continuación, los restantes monosacáridos se combinan en forma diferente según el tipo de oligosacárido.

Los oligosacáridos enlazados mediante uniones N contienen un núcleo pentasacárido común, compuesto por dos N-acetilglucosaminas (una de ellas ligada a la asparagina) y tres manosas (fig. 2-8). Los restantes monosacáridos

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

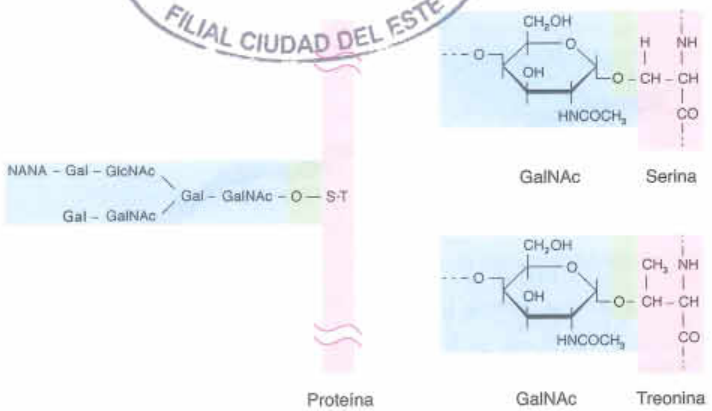


Fig. 2-7. Oligosacárido conectado a una proteína por medio de una unión O-glicosídica. *S·T*, serina o treonina; *NANA*, ácido N-acetilneuramínico; *GalNAc*, N-acetilgalactosamina; *GlcNAc*, N-acetilglucosamina; *Gal*, galactosa.

se unen a este núcleo en distintas combinaciones, lo cual genera una extensa variedad de oligosacáridos y, por ende, una gran diversidad de glicoproteínas.

Debe señalarse que el número de cadenas oligosacáridas que se ligan a una misma proteína es muy variable.

Polisacáridos. Los polisacáridos resultan de la combinación de muchos monómeros de hexosas, con la correspondiente pérdida de moléculas de agua. Su fórmula es $(C_6H_{10}O_5)_n$. Al hidrolizarse dan lugar a monosacáridos. Los polisacáridos como el ***almidón*** y el ***glucógeno*** representan las sustancias de reserva alimenticia de las células vegetales y animales, respectivamente (fig. 2-9). Otro polisacárido, la ***celulosa***, es el elemento estructural más importante de la pared de la célula vegetal (fig. 3-30).

Los tres polisacáridos nombrados son polímeros de glucosa, pero difieren porque exhiben distintos tipos de uniones entre sus monómeros. Por ejemplo, el glucógeno es una molécula ramificada en la que las glucosas están ligadas por uniones α1-4 y α1-6 (fig. 2-9).

Existen polisacáridos complejos llamados **glicosaminoglicanos (GAG)**, que están compuestos por una sucesión de una misma unidad disacárida en la que uno de los dos monómeros es un ácido glucurónico, un ácido idurónico o una galactosa, y el otro posee un grupo amino, puesto que es una N-acetilglucosamina o una N-acetilgalactosamina (fig. 2-10).

Los GAG más difundidos son el ***ácido hialurónico***, el ***condroitinsulfato***, el ***dermatansulfato***, el ***heparansulfato*** y el ***queratansulfato***. En la tabla 6-1 se mencionan las unidades disacáridas repetitivas que los integran; como puede apreciarse, con excepción del ácido hialurónico, se hallan sulfatados.

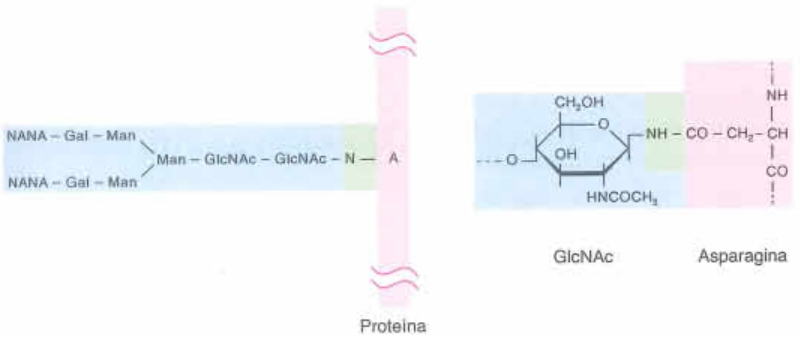


Fig. 2-8. Oligosacárido conectado a una proteína por medio de una unión N-glicosídica. *Man*, manosa; *A*, asparagina.

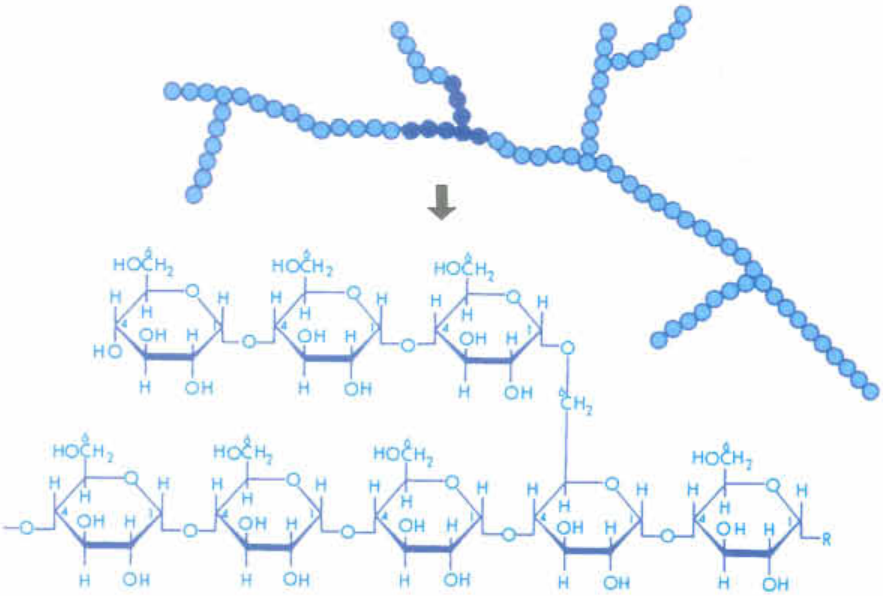


Fig. 2-9. El glucógeno es una molécula ramificada que contiene hasta 30.000 unidades de glucosa. Las uniones glucosídicas se establecen entre los carbonos 1 y 4 de las glucosas, excepto en los puntos de ramificación (1 y 6). La parte superior de la figura muestra un esquema de la molécula con pequeño aumento. En la parte inferior se halla representada la composición química del segmento molecular resaltado en azul oscuro.

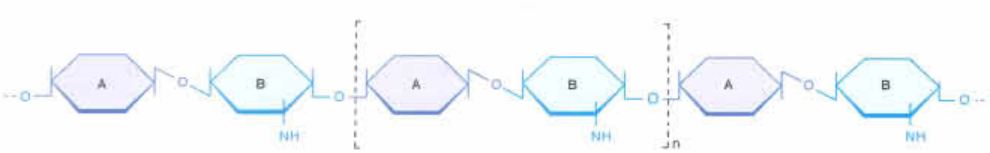
Casi todos los GAG se encuentran ligados a proteínas, con las que forman glicoproteínas complejas llamadas **proteoglicanos** (fig. 2-11). Estas moléculas prevalecen en el medio extracelular (cap. 6-3). El GAG se une a la proteína mediante un tetrasacárido integrado por una xilosa, dos galactosas y un ácido glucurónico. La xilosa se conecta con una serina de la proteína mediante una unión O, mientras que el ácido glucurónico lo hace con la primera hexosa del GAG.

LIPIDOS

2-7. Los triacilgliceroles, los fosfolípidos y los esteroides son los lípidos más abundantes de la célula

Los lípidos son un grupo de moléculas caracterizadas por ser insolubles en agua y solubles en los solventes orgánicos. Tales propiedades se deben a que poseen largas cadenas hidrocarbonadas alifáticas o anillos bencénicos, que son estructuras no polares o hidrofóbicas. En algunos lípidos esas cadenas pueden estar ligadas a un grupo polar que les permite unirse al agua. Los lípidos más comunes de la célula son triacilgliceroles, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides y poliprenoides.

Fig. 2-10. Representación de un pequeño tramo de un glicosaminoglicano (GAG). *A*, ácido glucurónico o ácido idurónico o galactosa; *B*, N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina.



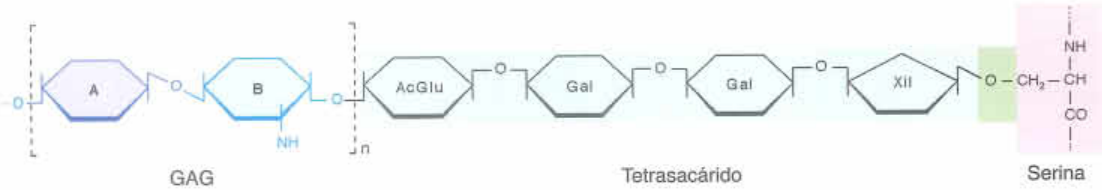
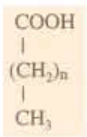


Fig. 2-11. Representación de un proteoglicano. Se muestra el modo como el GAG se une a la proteína. *AcGlu*, ácido glucurónico; *Gal*, galactosa; *Xil*, xilosa.

Triacilgliceroles. Los triacilgliceroles (o **triglicéridos**) son triésteres de ácidos grasos con glicerol. Cada ácido graso está constituido por una larga cadena hidrocarbonada, cuya fórmula general es:



Los grupos carboxilo de estos ácidos reaccionan con los grupos hidroxilo del glicerol de la manera expuesta en la figura 2-12.

Cuando sólo dos carbonos del glicerol se hallan ligados a ácidos grasos, la molécula se llama ***diacilglicerol*** (***DAG***) (fig. 2-13).

Los ácidos grasos tienen siempre un número par de carbonos, ya que se sintetizan a partir de grupos acetilo de dos carbonos. Por ejemplo, el ácido palmítico tiene 16 carbonos, mientras que el esteárico y el oleico poseen 18. La cadena hidrocarbonada suele exhibir uniones dobles (–C=C–), y en este caso se dice que el ácido graso es insaturado. Estas dobles ligaduras son importantes porque producen angulosidades en las cadenas hidrocarbonadas (fig. 2-20).

Los triacilgliceroles sirven como reserva de energía para el organismo. Sus ácidos grasos liberan gran cantidad de energía cuando son oxidados, más del doble de la que liberan los hidratos de carbono.

Fosfolípidos. En las células existen dos clases de fosfolípidos, los glicerofosfolípidos y los esfingofosfolípidos.

Los **glicerofosfolípidos** tienen dos ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol, ya que el tercer grupo hidroxilo de este alcohol se halla esterificado con un fosfato, unido a su vez con un segundo alcohol (fig. 2-14).

La combinación del glicerol con los dos ácidos grasos y el fosfato da lugar a una molécula llamada ***ácido fosfatídico*** (***AF***) (fig. 2-13), que constituye la estructura básica de los glicerofosfolípidos. Como se acaba de señalar, éstos poseen un segundo alcohol, que puede ser la etanolamina, la serina, la colina o el inositol (fig. 2-14). Con ellos se obtienen los fosfolípidos llamados ***fosfatidiletanolamina*** (***PE***), ***fosfatidilserina*** (***PS***), ***fosfatidilcolina*** (***PC***) y ***fosfatidilinositol*** (***PI***) (fig. 2-15).

Dado que el inositol del PI suele estar combinado con uno, dos o tres fosfatos, la célula tiene también ***fosfatidilinositol 4-fosfato*** (***PIP***), ***fosfatidilinositol 4,5-difosfato*** (***PIP_2***) y ***fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato*** (***PIP_3***) (fig. 2-16).

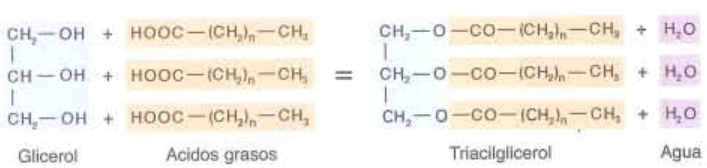


Fig. 2-12. Formación de un triacilglicerol con el concurso de un glicerol y tres ácidos grasos.

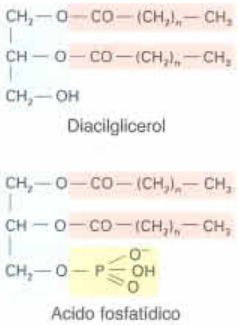


Fig. 2-13. Fórmulas del diacilglicerol (DAG) y del ácido fosfatídico (AF).

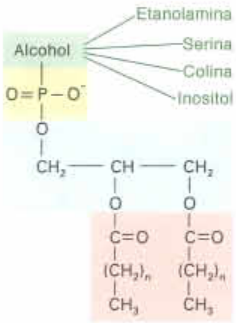


Fig. 2-14. Estructura química general de los glicerofosfolípidos.

Por otra parte, en la membrana interna de las mitocondrias existe un glicerofosfolípido doble denominado ***difosfatidilglicerol***, al que comúnmente se le da el nombre de ***cardiolipina*** (cap. 8-11). Lo componen dos ácidos fosfatídicos ligados entre sí por una tercera molécula de glicerol (fig. 2-17).

El **esfingofosfolípido** existente en las células es la ***esfingomielina***, que se genera por la combinación de la fosforilcolina con la ceramida (fig. 2-18). La fosforilcolina (un fosfato unido a la colina) se halla también en la fosfatidilcolina (fig. 2-15), mientras que la ***ceramida*** se forma por el agregado de un ácido graso a la ***esfingosina***, que como ilustra la figura 2-19 es un aminoalcohol que posee una cadena hidrocarbonada relativamente larga.

La figura 2-20 muestra que los fosfolípidos poseen dos largas colas hidrofóbicas no polares (dos ácidos grasos) y una cabeza hidrofílica polar constituida por glicerol (excepto en la esfingomielina), un segundo alcohol y un fosfato. Por lo tanto, los fosfolípidos son moléculas anfipáticas.

Los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas celulares y tanto su anfipatía como las características de sus ácidos grasos (número de carbonos, presencia de dobles ligaduras) les confieren muchas de sus propiedades. Más aún, cuando los fosfolípidos se dispersan en agua, adoptan espontáneamente una organización idéntica a la de las membranas celulares, con sus cabezas polares dirigidas hacia afuera y sus colas no polares enfrentadas entre sí en el interior de una bicapa (cap. 3-2).

Glicolípidos. Los glicolípidos presentes en las células se clasifican en cerebrósidos y gangliósidos.

Los **cerebrósidos** se forman por la unión de una glucosa o una galactosa

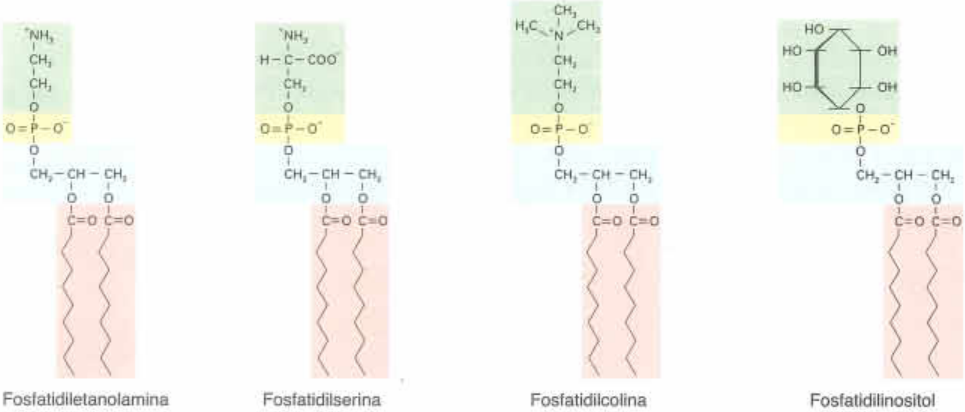


Fig. 2-15. Representación de los glicerofosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilinositol (PI).

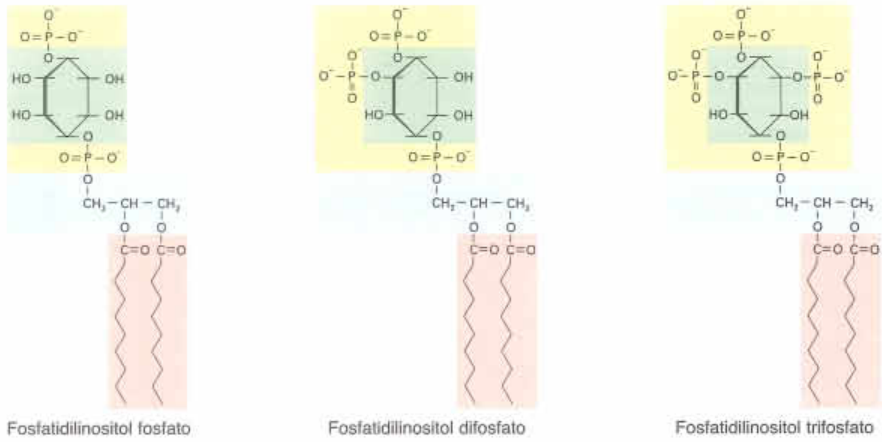


Fig. 2-16. Representación de la estructura química de los glicerofosfolípidos fosfatidilinositol fosfato (PIP), fosfatidilinositol difosfato (PIP_2) y fosfatidilinositol trifosfato (PIP_3).

con la ceramida (fig. 2-21). Así, se trata de esfingomielinas cuyas fosforilcolinas se reemplazan por uno de esos monosacáridos.

La estructura básica de los **gangliósidos** es similar a la de los cerebrósidos, pero el hidrato de carbono no es la glucosa ni la galactosa sino un oligosacárido integrado por varios monómeros, uno a tres de los cuales son ácidos siálicos (fig. 2-22). Los distintos tipos de gangliósidos difieren entre sí tanto por el número como por el ordenamiento relativo de sus monómeros. El monosacárido unido a la ceramida es casi siempre una glucosa, y a continuación se ubica una galactosa. Luego suele hacerlo una N-acetilgalactosamina o una N-acetilglucosamina, y luego otra glucosa u otra galactosa. A veces existe una fucosa. Generalmente el o los ácidos siálicos se localizan en la parte final del oligosacárido.

Esteroides. Los esteroides son lípidos que derivan de un compuesto denominado ciclopentanoperhidrofenantreno. Uno de los más difundidos es el **colesterol** (fig. 2-23), el cual se encuentra en las membranas y en otras partes de la célula y también fuera de ella. El hidroxilo de su carbono 3′ le confiere propiedades anfipáticas.

Los esteroides asumen funciones diferentes de acuerdo con los grupos

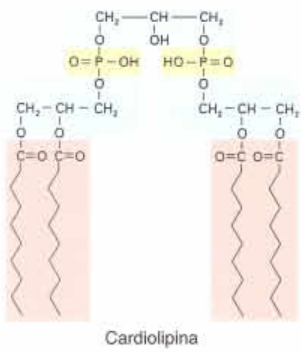


Fig. 2-17. Molécula del difosfatidilglicerol o cardiolipina.

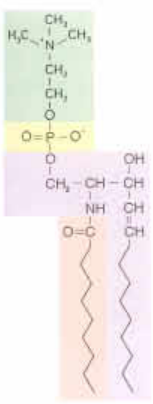


Fig. 2-18. Representación del esfingofosfolípido esfingomielina (EM).

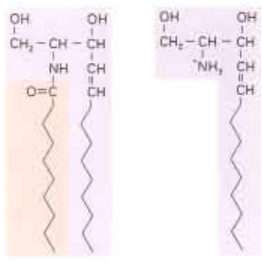


Fig. 2-19. Representación de las moléculas de ceramida y esfingosina.

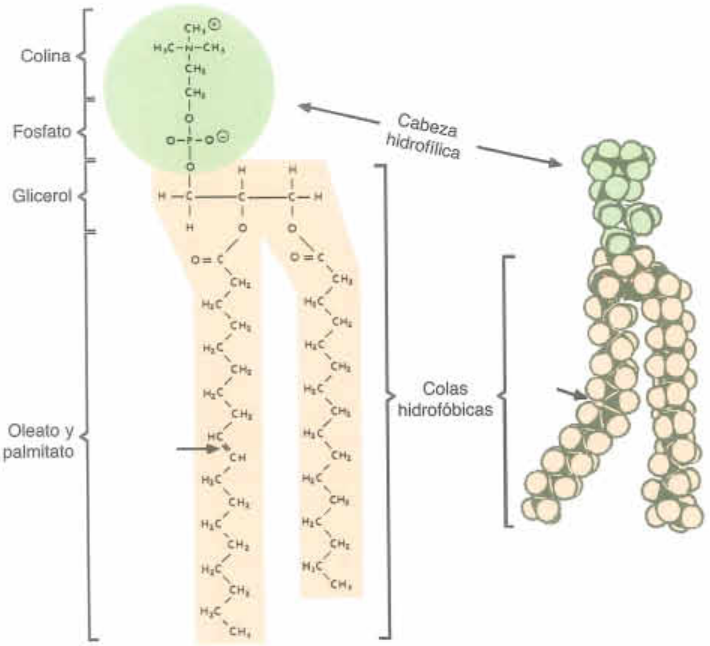


Fig. 2-20. Fosfolípido con su cabeza hidrofílica y sus dos colas hidrofóbicas. El fosfolípido representado es el palmitoil-oleil-fosfatidilcolina. Obsérvese que la unión doble en el ácido oleico produce un cambio de dirección en la cadena hidrocarbonada (*flecha*).

químicos que se hallan unidos a su estructura básica. Los principales esteroides del organismo son las hormonas sexuales (estrógenos, progesterona, testosterona), las hormonas suprarrenales (cortisol, aldosterona), la vitamina D y los ácidos biliares.

Poliprenoides. Los poliprenoides son compuestos que derivan del hidrocarburo ***isopreno*** (fig. 2-24). Entre ellos se halla el **dolicol fosfato**, una molécula perteneciente a la membrana del retículo endoplasmático diseñada para incorporar oligosacáridos a los polipéptidos durante la formación de las glicoproteínas (cap. 7-16). Se trata de una cadena de 17 a 21 isoprenos que contiene entre 85 y 105 átomos de carbono, esterificada con un fosfato (fig. 2-24). Otro poliprenoide común en las células forma parte de la **ubiquinona**, una molécula de la membrana mitocondrial interna (cap. 8-11) que consta de una cadena de 10 isoprenos y de una benzoquinona (fig. 2-24).

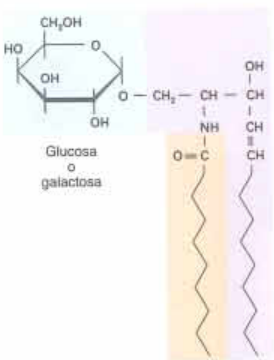


Fig. 2-21. Representación de un cerebrósido.

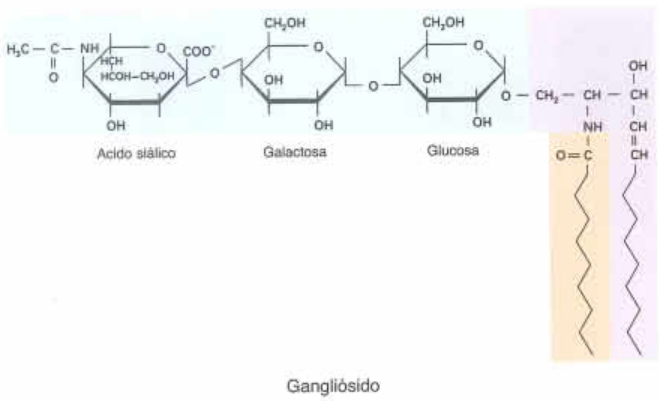
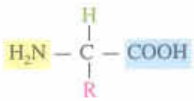


Fig. 2-22. Representación de un ganglióside.

PROTEINAS

2-8. Las proteínas son cadenas de aminoácidos ligados por uniones peptídicas

Los monómeros que componen las proteínas son los **aminoácidos**. Un aminoácido es un ácido orgánico en el cual el carbono unido al grupo carboxilo (–COOH) está unido también a un grupo amino ($-NH_2$). Además, dicho carbono se halla ligado a un H y a un residuo lateral (R), que es diferente en cada tipo de aminoácido.

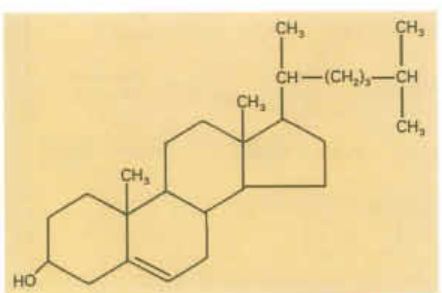


Por ejemplo, en la alanina la cadena lateral R tiene un solo carbono, mientras que en la leucina tiene cuatro.

La figura 2-25 muestra la estructura de los 20 tipos de aminoácidos existentes en las proteínas. Dos son ***ácidos*** (ácido aspártico, ácido glutámico); tres son ***básicos*** (histidina, lisina, arginina); cinco son ***neutros polares***, es decir, hidrofílicos (serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina), y diez son ***neutros no polares***, es decir, hidrofóbicos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, cisteína, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina). Los nombres de los aminoácidos se abrevian utilizando las tres primeras letras de la nomenclatura inglesa (salvo cinco excepciones) o mediante un código que emplea una sola letra.

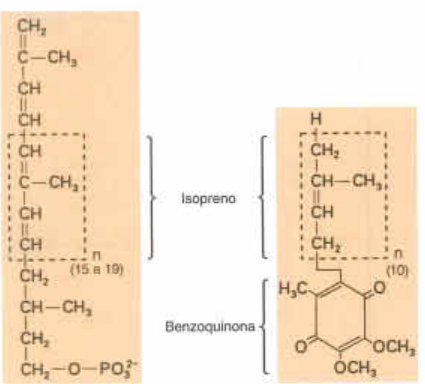
Adviértase que dos de los aminoácidos contienen un átomo de azufre. En el caso de la cisteína, dos moléculas de este aminoácido pueden formar un puente disulfuro (–S–S–). Esta unión es de tipo covalente, ya que los átomos de H de ambos grupos –SH son eliminados (fig. 2-27).

La combinación de los aminoácidos para formar una molécula proteica se produce de modo tal que el grupo NH_2 de un aminoácido se combina con el grupo COOH del aminoácido siguiente, con pérdida de una molécula de agua (fig. 2-26). La combinación –NH–CO– se conoce con el nombre de **unión peptídica**. La molécula formada mantiene su carácter anfotérico porque siempre contiene un grupo NH_2 en un extremo (amino terminal) y un grupo COOH en el otro extremo (carboxilo terminal), además de los residuos laterales básicos y ácidos.



Colesterol

Fig. 2-23. Molécula de colesterol, derivada del compuesto de 17 carbonos llamado ciclopentanoperhidrofenantreno.



Dolicol fosfato Ubiquinona

Fig. 2-24. Molécula de dolicol (compuesta por 17 a 21 isoprenos) y de ubiquinona (con sus 10 isoprenos).

Una combinación de dos aminoácidos constituye un **dipéptido**; de tres, un **tripéptido**. Cuando se unen entre sí unos pocos aminoácidos, el compuesto es un **oligopéptido** (fig. 2-26). Finalmente, un **polipéptido** está formado por muchos aminoácidos. La proteína más grande del organismo contiene alrededor de 27.000 aminoácidos (cap. 5-33).

La distancia entre dos uniones peptídicas es de aproximadamente 0,35 nm.

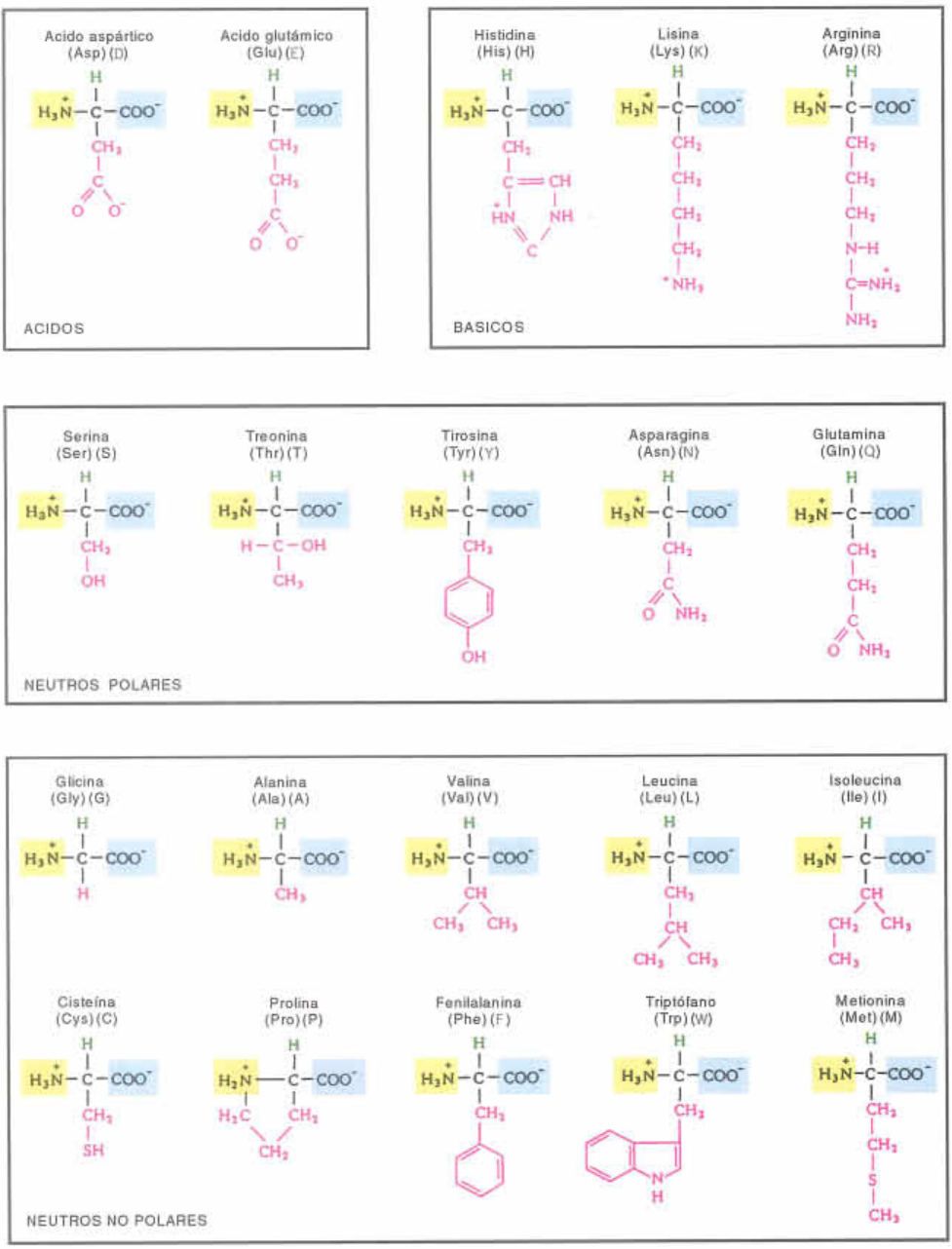


Fig. 2-25. Estructura química de los veinte aminoácidos, clasificados en ácidos, básicos, neutros polares y neutros no polares. Las estructuras que se encuentran debajo de los grupos amino y carboxilo son las cadenas laterales R.

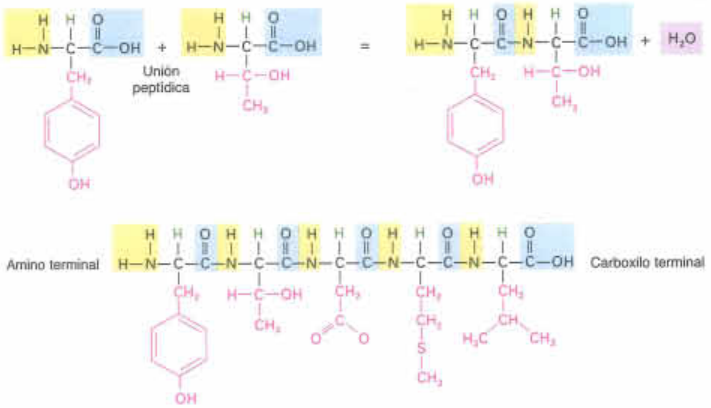


Fig. 2-26. Formación de una unión peptídica entre dos aminoácidos. Se muestra también un pentapéptido integrado, desde el terminal amino al terminal carboxilo, por una tirosina, una treonina, un ácido aspártico, una metionina y una leucina.

Una proteína con un peso molecular de 30 kDa está constituida por 300 aminoácidos y, extendida, tiene una longitud de unos 100 nm y un ancho de 1 nm.

El término proteína (del griego *proteîon*, preeminente) sugiere que todas las funciones básicas de las células dependen de proteínas específicas. Se puede decir que sin proteínas la vida no existiría; están presentes en cada célula y en cada organoide. Además, pueden ser estructurales o enzimáticas.

Existen **proteínas conjugadas**, unidas a porciones no proteicas (grupos prostéticos). A esta categoría pertenecen las ***glicoproteínas*** (asociadas con hidratos de carbono), las ***nucleoproteínas*** (con ácidos nucleicos), las ***lipoproteínas*** (con grasas) y las ***cromoproteínas***, que tienen como grupo prostético un pigmento. Dos ejemplos de cromoproteínas son la hemoglobina y la mioglobina, en las cuales el grupo prostético es el hem, un compuesto orgánico que contiene hierro y que se combina con oxígeno.

2-9. En las proteínas existen cuatro niveles de organización estructural

En la estructura de las proteínas se distinguen cuatro niveles sucesivos de organización.

La **estructura primaria** comprende la secuencia de los aminoácidos que forman la cadena proteica (fig. 2-27). Tal secuencia determina los demás niveles de organización de la molécula. Su importancia biológica encuentra

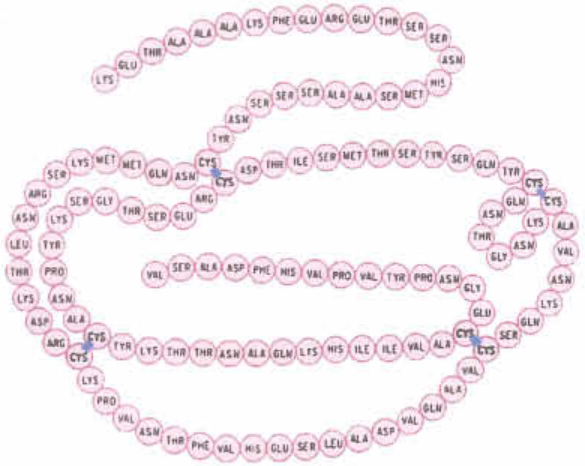


Fig. 2-27. Estructura primaria de una proteína (ribonucleasa pancreática bovina). Véanse los cuatro puentes disulfuro entre las cisteínas. (De C. B. Anfinsen.)

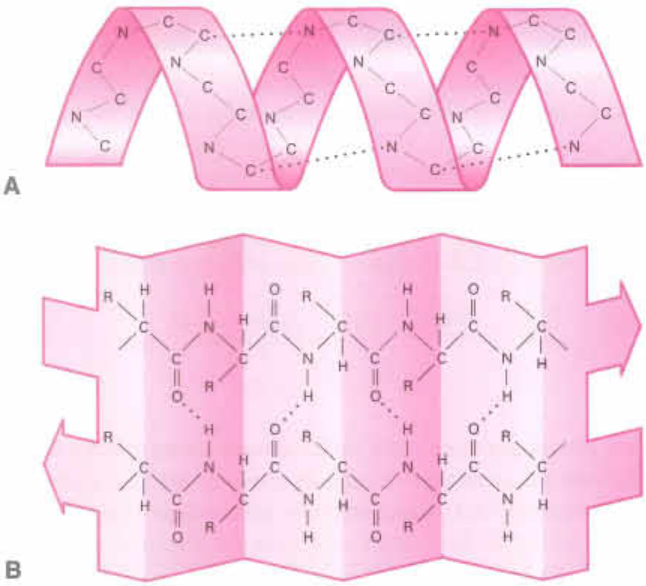


Fig. 2-28. Estructuras secundarias de las proteínas. **A.** Hélice α. **B.** Hoja plegada β.

un ejemplo en la enfermedad hereditaria llamada anemia falciforme, en la cual se producen profundas alteraciones funcionales por la sustitución de un solo aminoácido en la molécula de hemoglobina.

La **estructura secundaria** alude a la configuración espacial de la proteína, que deriva de la posición de determinados aminoácidos en su cadena. Así, algunas proteínas (o partes de ellas) tienen una forma cilíndrica denominada ***hélice α*** (α, porque fue la primera en ser descubierta); en ella la cadena polipeptídica se enrolla en torno a un cilindro imaginario debido a que se forman puentes de hidrógeno entre los grupos amino de algunos aminoácidos y los grupos carboxilo de otros situados cuatro posiciones más adelante (fig. 2-28). Otras proteínas (o partes de ellas) exhiben una estructura llamada ***hoja plegada β***; en ella la molécula adopta la configuración de una hoja plegada debido a que se unen, mediante puentes de hidrógeno laterales, grupos amino con grupos carboxilo de la misma cadena polipeptídica (fig. 2-28).

La **estructura terciaria** es consecuencia de la formación de nuevos plegamientos en las estructuras secundarias hélice α y hoja plegada β, lo que da lugar a la configuración tridimensional de la proteína. Los nuevos plegamientos se producen porque se relacionan químicamente ciertos aminoáci-

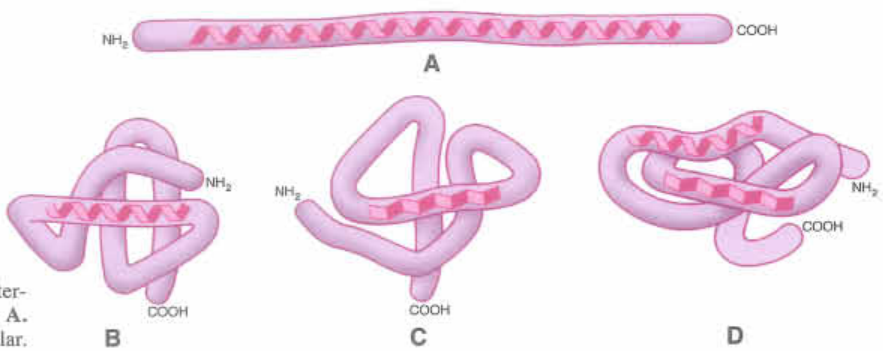


Fig. 2-29. Estructuras terciarias de las proteínas. **A.** Fibrosa. **B, C** y **D.** Globular.

dos distantes entre sí en la cadena polipeptídica. Según el plegamiento que adoptan, se generan proteínas fibrosas o globulares (fig. 2-29). Las ***proteínas fibrosas*** se forman a partir de cadenas polipeptídicas (o de tramos proteicos) con estructura secundaria tipo hélice α exclusivamente. En cambio, las ***proteínas globulares*** se forman tanto a partir de hélices α como de hojas plegadas β, o de una combinación de ambas.

La **estructura cuaternaria** resulta de la combinación de dos o más polipéptidos, lo que origina moléculas de gran complejidad. Por ejemplo, la hemoglobina es el resultado de la integración de cuatro cadenas polipeptídicas (fig. 2-30).

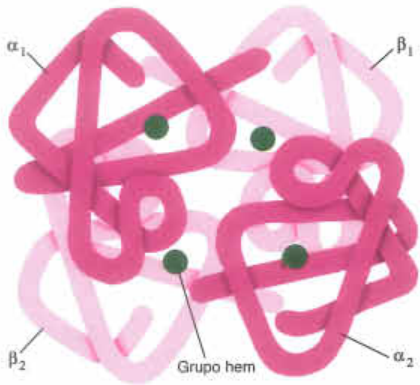


Fig. 2-30. Estructura cuaternaria de las proteínas. Se representa la hemoglobina, compuesta por cuatro subunidades —dos α y dos β— y se indican los sitios donde se localizan los cuatro grupos hem.

2-10. Distintos tipos de uniones químicas determinan la estructura de las proteínas

La disposición espacial de una molécula proteica se halla predeterminada por la secuencia de sus aminoácidos (estructura primaria). Los restantes niveles de organización dependen del establecimiento de diferentes tipos de uniones químicas entre los átomos de los aminoácidos. Así, se producen **uniones covalentes** —por ejemplo, puentes –S–S– entre los grupos –SH de dos cisteínas— y varios tipos de interacciones débiles, es decir, **uniones no covalentes**. Entre estas últimas se encuentran (fig. 2-31):

1) ***Puentes de hidrógeno***, que se producen cuando un protón (H^+) es compartido entre dos átomos electronegativos (de oxígeno o de nitrógeno) próximos entre sí. Ya vimos que los puentes de hidrógeno son esenciales para el apareamiento específico entre las bases complementarias de los ácidos nucleicos, lo cual proporciona la fuerza que mantiene unidas a las dos cadenas del ADN. Las figuras 2-5 y 2-31 muestran los puentes de hidrógeno en el ADN y en las proteínas, respectivamente.

2) ***Uniones iónicas*** o ***electrostáticas***, que son el resultado de la fuerza de atracción entre grupos ionizados de carga contraria.

3) ***Interacciones hidrofóbicas***, que dan lugar a la asociación de grupos no polares en la que se excluye el contacto con el agua. Cabe agregar que en las proteínas globulares, las cadenas laterales más hidrofóbicas se localizan en el interior de las moléculas, mientras que los grupos hidrofílicos se sitúan en la superficie. Así, los residuos hidrofóbicos repelen a las moléculas de agua que rodean

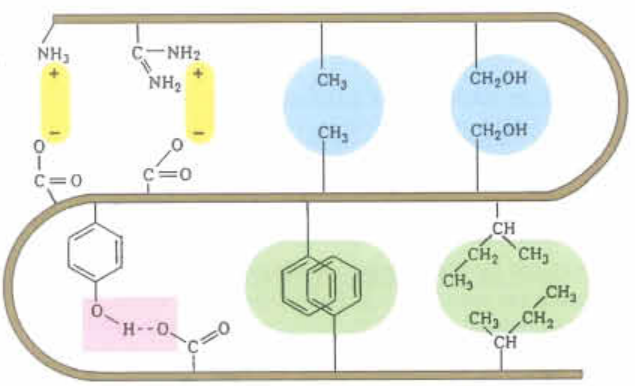


Fig. 2-31. Tipos de uniones no covalentes que estabilizan la estructura de las proteínas: unión iónica (*amarillo*); interacción de van der Waals (*celeste*); puente de hidrógeno (*rosa*); interacción hidrofóbica (*verde*). (De C. B. Anfinsen.)

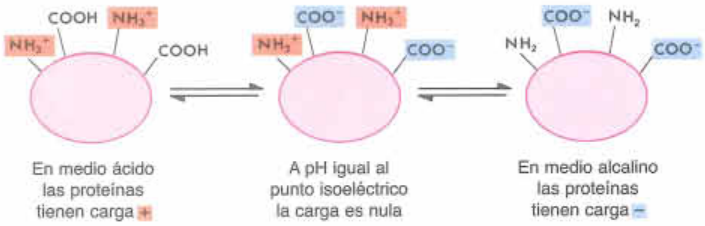


Fig. 2-32. La ionización de las proteínas depende del pH del medio.

a las proteínas y determinan que su estructura globular se torne más compacta.

4) ***Interacciones de van der Waals***, que se producen cuando los átomos están muy cerca. Esta proximidad induce fluctuaciones en sus cargas, causa de atracciones mutuas entre los átomos.

La diferencia fundamental entre las uniones químicas covalentes y las no covalentes reside en la cantidad de energía que se necesita para romperlas. Por ejemplo, un puente de hidrógeno requiere 4,5 kcal/mol^{-1}, cifra bastante menor que las 110 kcal/mol^{-1} que necesita la unión covalente O–H del agua. En general, las uniones covalentes se rompen por la intervención de enzimas, mientras que las no covalentes se disocian por fuerzas fisicoquímicas. Aunque individualmente las uniones no covalentes son débiles, cuando son numerosas hacen que la estructura molecular se vuelva estable, como ocurre con la doble cadena del ADN.

2-11. Las proteínas tienen cargas positivas y negativas, pero en el punto isoeléctrico su carga es igual a cero

La carga real de una molécula proteica es el resultado de la suma de todas sus cargas. Dado que los grupos ácidos y básicos se disocian a distintas concentraciones de iones hidrógeno en el medio, el pH influye en la carga final de la molécula. La figura 2-32 muestra que en medio ácido los grupos amino capturan H^+ y se comportan como bases ($-NH_2 + H^+ \rightarrow -NH_3^+$), mientras que en un medio alcalino se produce el fenómeno inverso y se disocian los grupos carboxilo ($-COOH \rightarrow COO^- + H^+$).

Existe un pH definido para cada proteína en el que la suma de las cargas positivas y negativas es igual a cero (fig. 2-32). Este pH se denomina **punto isoeléctrico**. En él las proteínas colocadas en un campo eléctrico no migran a ninguno de los polos, mientras que a un pH más bajo se desplazan hacia el cátodo y a un pH más alto lo hacen hacia el ánodo. El proceso que da lugar a estos movimientos se llama **electroforesis** (cap. 23-31).

ENZIMAS

2-12. Las proteínas enzimáticas catalizan las reacciones químicas

La célula puede compararse con un minúsculo laboratorio en el que tienen lugar la síntesis y la degradación de gran número de sustancias. Estos procesos son efectuados por **enzimas** (del griego *en*, dentro, y *zýmee*, levadura) que actúan a la temperatura del organismo y dentro de límites estrechos de pH. Las enzimas son los catalizadores biológicos. Un catalizador es una sustancia que acelera las reacciones químicas sin modificarse, lo que significa que puede ser utilizado una y otra vez.

El conjunto de las enzimas constituye el grupo de proteínas más extenso

y más especializado del organismo, responsable de la dirección de la compleja red de reacciones químicas que se producen en la célula.

Las enzimas (E) son proteínas o glicoproteínas que tienen uno o más lugares denominados **sitios activos**, a los cuales se une el sustrato (S), es decir, la sustancia sobre la que actúa la enzima. El sustrato es modificado químicamente y convertido en uno o más productos (P). Debido a que esta reacción es generalmente reversible, puede ser expresada del siguiente modo:

$$E + S \rightleftharpoons [ES] \rightleftharpoons E + P,$$

donde [ES] es un complejo enzima-sustrato que se forma transitoriamente. Los distintos tipos de enzimas pueden formar uniones covalentes entre átomos del sustrato (síntesis) o pueden romperlas (degradación). Las enzimas aceleran la reacción hasta que se alcanza un punto de equilibrio, y pueden ser tan eficientes como para que la velocidad de la reacción sea de 10^8 a 10^{11} veces más rápida que en ausencia del catalizador.

Una característica muy importante de la actividad enzimática es su **especificidad**, lo cual significa que cada clase de enzima actúa sobre un solo sustrato. Las enzimas suelen ser tan específicas que son incapaces de actuar sobre sustancias estrechamente relacionadas; así, por ejemplo, no ejercen acción sobre un estereoisómero del mismo sustrato.

En general, las enzimas llevan el nombre del sustrato que modifican o el de la actividad que ejercen, más el sufijo "-asa". Así, existen nucleasas o endonucleasas (degradan ácidos nucleicos), fosfatasas (sustraen fosfatos), quinasas (los agregan), sulfatasas, proteasas, glicosidasas, lipasas, oxidasas, reductasas, deshidrogenasas, etc.

Es oportuno advertir que en la célula existen moléculas con actividad enzimática que no son proteínas sino ácidos ribonucleicos. Reciben el nombre de **ribozimas** y catalizan la formación o la ruptura de las uniones fosfodiéster entre los nucleótidos (ver capítulos 15-5 y 16-10).

2-13. Algunas enzimas requieren cofactores

Algunas enzimas requieren la presencia de sustancias llamadas **coenzimas** para poder actuar. Por ejemplo, las deshidrogenasas necesitan las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+ o $NADP^+$) o flavina adenina dinucleótido (FAD) (fig. 8-4), ya que éstas son las moléculas que reciben el hidrógeno extraído del sustrato. La reacción es la siguiente:

$$E + S(H_2) + NAD^+ \rightarrow E + S + NADH + H^+$$

En algunos casos la coenzima es un metal u otro grupo prostético que se halla unido en forma covalente a la proteína enzimática. En otros casos las coenzimas se asocian a las enzimas de manera laxa. Numerosas coenzimas son vitaminas pertenecientes al grupo B.

2-14. Los sustratos se unen al sitio activo de las enzimas

Como vimos, las enzimas tienen una gran especificidad para sus sustratos y suelen no aceptar moléculas relacionadas o que tengan una forma ligera-

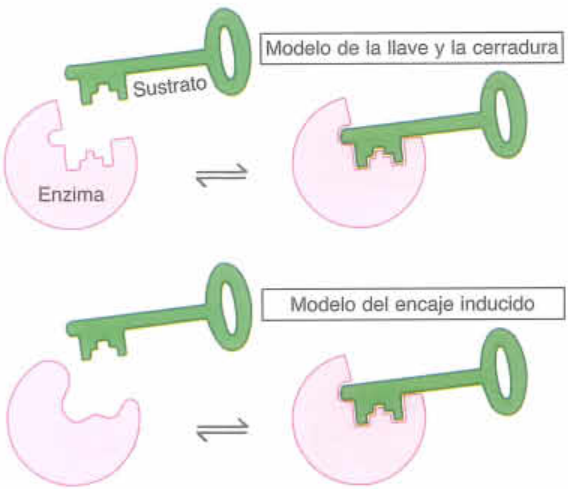


Fig. 2-33. Los sustratos reaccionan en forma muy precisa con el sitio activo de la enzima. Algunas enzimas tienen un encaje inducido, pues el sitio activo es complementario del sustrato sólo después de que éste se une a la enzima.

mente distinta. Esto puede explicarse considerando que la enzima y el sustrato exhiben una interacción semejante a la de una cerradura con su llave. En la figura 2-33 se observa que la enzima posee un sitio activo, complementario a uno de los dominios del sustrato. Aunque la imagen de la llave y la cerradura es válida, no significa que enzimas y sustratos sean moléculas estructuralmente rígidas. Así, el sitio activo de la enzima se hace complementario al sustrato sólo después de habérsele unido; es el llamado **encaje inducido**. Como se observa en la figura 2-33, la unión con el sustrato induce un cambio de conformación en la enzima, y sólo entonces los grupos catalíticos entran en íntimo contacto con el sustrato.

En la unión del sustrato con el sitio activo de la enzima participan fuerzas químicas de naturaleza no covalente (uniones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals), cuyo radio de acción es muy limitado. Esto explica por qué el complejo enzima-sustrato sólo puede formarse si la enzima tiene un sitio exactamente complementario al expuesto en la superficie del sustrato.

2-15. El comportamiento cinético de muchas enzimas se define por los parámetros $V_{máx}$ y K_m

Las reacciones enzimáticas se realizan en dos etapas. La primera corresponde a la unión de la enzima con el sustrato y puede escribirse de la siguiente manera:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} [ES]$$

En la segunda etapa el complejo ES se desdobla en el producto y la enzima, que queda disponible para actuar sobre una nueva molécula de sustrato:

$$[ES] \underset{K_4}{\overset{K_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Los valores K_1, K_2, K_3 y K_4 son constantes de velocidad de las reacciones.

Como se ilustra en la figura 2-34, la velocidad de la reacción depende de la concentración del sustrato. A bajas concentraciones, la velocidad inicial (V) de la reacción describe una ***hipérbola***. No obstante, a medida que aumenta la concentración del sustrato, la reacción se satura y alcanza una meseta. En este punto —que corresponde a la $V_{máx}$— toda la enzima interviene en la formación del complejo ES. La ecuación de la curva es:

$$V = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_m + [S]},$$

donde K_m es la constante de Michaelis, que puede definirse como la concen-

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

tración del sustrato en que la mitad de las moléculas de la enzima forman complejos ES. Cuanto menor es el valor de K_m, mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato. En consecuencia, el comportamiento cinético de una enzima está definido por los valores de $V_{máx}$ y K_m.

2-16. Algunas enzimas están sujetas a regulaciones alostéricas

En la sección anterior se dijo que si se diagrama la velocidad de reacción de una enzima en función de la concentración creciente del sustrato, se observa que para muchas enzimas la curva dibuja una hipérbola (fig. 2-34). Así, a medida que se agrega más sustrato aumenta la cantidad de la enzima en el complejo ES y aumenta la velocidad de aparición del producto; pero con altas concentraciones del sustrato casi todas las moléculas de la enzima se hallan en el complejo ES y se alcanza la velocidad máxima ($V_{máx}$) de la reacción.

Otras enzimas no obedecen a la cinética antedicha, ya que muestran cooperatividad y están sujetas a regulaciones alostéricas. Por consiguiente, en lugar de una hipérbola dan lugar a una ***curva sigmoidea*** (fig. 2-35).

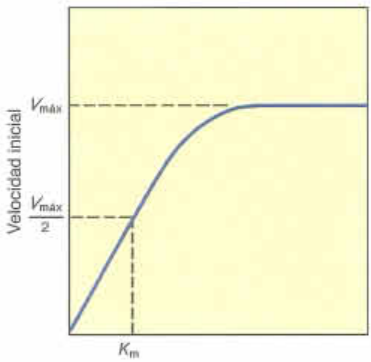


Fig. 2-34. Diagrama de la velocidad de reacción de una enzima a concentraciones de sustrato cada vez mayores. En el texto se describen la $V_{máx}$ y la K_m. La curva es una hipérbola cuya primera parte sigue una cinética de primer orden (es decir, la reacción es proporcional a la concentración del sustrato); la segunda parte corresponde a la saturación, que tiene una cinética de orden cero (ya que no depende de la concentración del sustrato).

2-17. Los inhibidores de las enzimas son muy específicos

Las enzimas pueden ser inhibidas reversible o irreversiblemente.

La **inhibición irreversible** puede deberse a la desnaturalización de la enzima o a la formación de una unión covalente entre ella y otra molécula.

Existen dos formas de **inhibición reversible**: competitiva y no competitiva. En la primera, un compuesto de estructura similar a la del sustrato forma un complejo con la enzima, análogo al complejo ES; este tipo de inhibición puede revertirse con concentraciones altas del sustrato. En la inhibición no competitiva el inhibidor y el sustrato no se relacionan estructuralmente, pero igual se unen a través de sendos puntos de sus moléculas.

2-18. Las enzimas de la célula están distribuidas en múltiples compartimientos

Las enzimas catalizan las innumerables reacciones químicas que tienen lugar en las células. En algunos casos las enzimas de una vía metabólica se encuentran en el citosol, y el sustrato y los sucesivos productos pasan de una enzima a la siguiente en forma encadenada. En otros casos, las enzimas que intervienen en una cadena de reacciones se hallan asociadas y actúan juntas bajo la forma de un complejo multienzimático; por ejemplo, las enzimas que sintetizan los ácidos grasos se encuentran íntimamente vinculadas. Los sistemas multienzimáticos facilitan las reacciones sucesivas porque éstas se producen a escasa distancia unas de otras.

Las enzimas poseen patrones de distribución bastante específicos. Por ejemplo, algunas enzimas hidrolíticas se localizan en los lisoso-

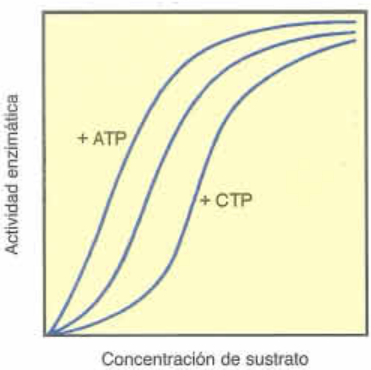


Fig. 2-35. Cinética de la enzima alostérica ATPasa, que muestra una curva sigmoidea característica en lugar de una hipérbola. Obsérvense los efectos de un activador (*ATP*) y de un inhibidor (*CTP*).

mas, otras enzimas se encuentran en las cisternas del complejo de Golgi, y otras, como las ARN polimerasas y las ADN polimerasas, en el núcleo.

EL ORIGEN DE LAS CELULAS

2-19. Los mecanismos de autoensamblaje dieron lugar a las primeras células

En la sección 2-9 vimos que una proteína compleja (como la hemoglobina) se forma como resultado del **autoensamblaje** de varias unidades proteicas menores, y en la sección 2-7 estudiamos que los fosfolípidos dispersos en agua desarrollan espontáneamente una bicapa lipídica semejante a la de las membranas celulares. Otro ejemplo de autoensamblaje lo encontramos en los virus (cap. 1-5), que se forman en el interior de la célula huésped a partir de material genético (ADN o ARN) y proteínas (capsómeros). Como puede apreciarse, mediante estos mecanismos de autoensamblaje pueden formarse tanto macromoléculas como estructuras subcelulares de variada complejidad.

Las causas por las cuales se forman en las células estructuras siguiendo un orden cada vez más complejo deben buscarse en la información contenida en el ADN. Esta es la que determina la estructura de las proteínas. Por otra parte, de la interacción entre dos o más proteínas diferentes y entre proteínas e hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos resulta la formación de complejos macromoleculares y estructuras de mayor complejidad.

Un problema fundamental es determinar los mecanismos por los cuales se originó en nuestro planeta la organización supramolecular que dio lugar a la formación de las células procariotas y eucariotas. Cualquier explicación sobre este tema es obviamente especulativa, pues tiene que ver nada menos que con el origen de la vida.

Aunque no se sabe cómo se formaron las primeras células, es posible establecer, por medio del registro de fósiles, que los organismos procariotas precedieron a los eucariotas y aparecieron hace tres mil millones de años. Recientes observaciones demostraron que sólo después de mil millones de años de haberse formado la Tierra aparecieron organismos semejantes a las bacterias actuales. Antes debió haberse producido un largo período de evolución química, en el que se originaron moléculas provistas de carbono y las unidades precursoras de las futuras macromoléculas de los organismos vivientes, como los aminoácidos, los monosacáridos y las bases de los nucleótidos. Luego, por polimerización, se formaron moléculas cada vez más complejas. Es posible que durante este período entraran en acción los mecanismos de autoensamblaje antes mencionados, hasta que se formó la primera estructura supramolecular capaz de autorreproducirse (fig. 2-36).

2-20. La evolución química produjo moléculas orgánicas con carbono

En los tiempos prebióticos, es decir, anteriores a la aparición de la vida, la atmósfera de la Tierra carecía de oxígeno, como sucede con los otros planetas del sistema solar. Contenía hidrógeno, nitrógeno, amoníaco, metano, monóxido de carbono y dióxido de carbono; también contenía agua, que en forma de vapor cubría parte de la superficie terrestre. Aunque normalmente estas moléculas son poco reactivas, podrían haber interactuado gracias a la

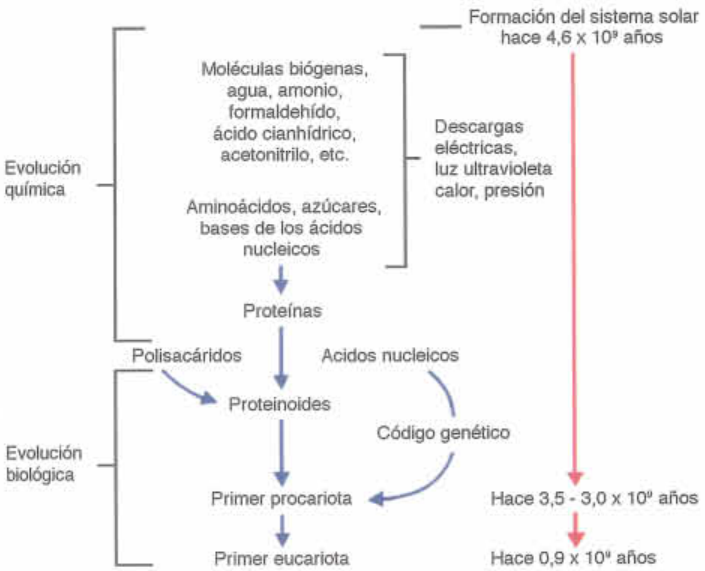


Fig. 2-36. Secuencia temporal del origen de las células.

energía provista por la radiación ultravioleta, el calor y las descargas eléctricas de los rayos.

En ese entonces la atmósfera tampoco tenía la capa protectora de ozono, de modo que los rayos ultravioletas podían bañar la superficie de la Tierra con una intensidad que resultaría nefasta para la vida actual. Ello originó moléculas intermedias sumamente reactivas, como acetaldehído, cianuro, formaldehído y otras, a partir de las cuales se sintetizaron moléculas cada vez más complejas.

En 1920, Oparin y Haldane consideraron que la polimerización de estas moléculas pudo dar origen a las proteínas, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono presentes en los organismos vivos. En 1953, Miller hizo un experimento fundamental en el que se imitaron las condiciones de la atmósfera en el período prebiótico. Produjo descargas eléctricas en un recipiente dentro del cual colocó agua, hidrógeno, amoníaco y metano. En el agua, que se condensó, se formaron aminoácidos (glicina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico). Mediante experimentos similares se han obtenido casi todos los aminoácidos presentes en las proteínas; también se consiguieron varios monosacáridos, ácidos grasos y las bases de los nucleótidos.

2-21. Los mecanismos de agregación formaron los primitivos proteinoides

El próximo paso probablemente fue la polimerización de los aminoácidos para construir proteínas, lo cual pudo ser posible por la acción catalítica de las arcillas. Todos estos procesos pudieron haberse producido en medios acuosos (lagunas), en los cuales las moléculas orgánicas se concentraron formando una especie de "caldo" que favoreció las interacciones moleculares.

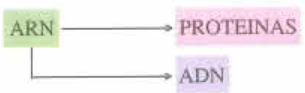
Una vez que se formó la primera proteína pudieron haber actuado los mecanismos de agregación o autoensamblaje descritos más arriba. De esta manera podrían haberse originado las funciones enzimáticas. Es probable que en

el "caldo" primordial las macromoléculas hayan formado complejos más grandes, denominados ***proteinoides*** o ***coacervados***, que tienen una pared semejante a la de una membrana y un interior líquido. Estos proteinoides primitivos pudieron tener actividad enzimática y permeabilidad, como en el caso de las membranas artificiales que mencionaremos en el capítulo 3-2. Empero, la ausencia de ácidos nucleicos impidió su continuidad, y es posible que tuvieran una vida muy corta, dado que no podían autorreproducirse.

2-22. Las células procariotas precedieron a las eucariotas

Sólo después de la aparición de los ácidos nucleicos fue posible que se originara un organismo capaz de autoperpetuarse. En ese momento habría aparecido la primera célula procariota y, así, la vida en la Tierra.

Es probable que el ARN, y no el ADN, haya sido el primer material genético que apareció, de modo que desde el punto de vista cronológico las macromoléculas habrían evolucionado de la siguiente manera:



La replicación del ARN es más sencilla que la del ADN, pues requiere un menor número de enzimas. Además, el ARN puede usarse como material genético y como ARN mensajero, y muchos de los pasos de la síntesis proteica dependen de interacciones ARN-ARN (ARNm-ARNt, ARNm-ARNr, ARNr-ARNt).

Todos los organismos vivos tienen el mismo código genético, lo cual sería una prueba de que la vida en la Tierra se inició a partir de un solo organismo precursor. Las fuerzas de la evolución, al seleccionar las mutaciones favorables en las células, llevaron más tarde a una variedad asombrosa de formas de vida.

Es posible que los primeros procariotas fueran heterótrofos (es decir, se nutrieran con moléculas orgánicas). Más tarde aparecieron los procariotas autótrofos, como las algas azules. Gracias a la fotosíntesis se produjo y acumuló el oxígeno en la atmósfera, y ello hizo posible el surgimiento de células procariotas aeróbicas.

La célula eucariota pudo haberse originado después de la aparición de una célula eucariota anaeróbica. Esta debió ser parasitada por una procariota aeróbica, que más tarde se convirtió en mitocondria (cap. 8-29).

De acuerdo con ciertos restos fósiles, los organismos eucariotas debieron haber aparecido unos 1.500 millones de años atrás —al establecerse una atmósfera de oxígeno estable— y, como dijimos, tales organismos pudieron ser primero anaerobios y luego aerobios. Hasta entonces la vida se hallaba solamente en el agua, desde donde las plantas y los animales pasaron a la tierra.

El surgimiento de la reproducción sexual, millones de años después, aceleró la evolución de las formas vivientes, que hasta entonces era relativamente lenta. Los sexos hicieron posible el intercambio de información genética entre los individuos, mientras que la mutación y la selección produjeron las diferentes formas vivientes que hoy se encuentran en nuestro planeta.

BIBLIOGRAFIA

Anfinsen C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. Science 181:223.

Atkins PW and De Paula JD (2006) Physical Chemistry for the Life Sciences. Oxford University Press, Oxford.

Attenborough D. (1979) Life on Earth. Collins, England.

Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L. (2006) Biochemistry, 6th Ed. WH Freeman, New York.

Bernal J.D. and Synge A. (1973) The origin of life. In: Readings in Genetics and Evolution. Oxford University Press, Oxford.

Blanco A. (2000) Química Biológica, 7ª Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

Butler P.J.G. and Klug A. (1978) The assembly of a virus. Sci. Am. 239:62.

Cavalier-Smith T. (1975) The origin of nuclei and eukaryotic cells. Nature 256:463.

Davidson J.N. (1976) The Biochemistry of the Nucleic Acids, 8th Ed. Chapman & Hall, London.

de Duve Ch. (1996) The birth of complex cells. Sci Am. 274 (4):38.

Dickerson R.E. (1978) Chemical evolution and the origin of life. Sci. Am. 239:68.

Eigen M. (1971) Molecular self-organization and the early stages of evolution. Q. Rev. Biophys. 4:149.

Eisenberg D. (2003) The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the principle structural features of proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:11207.

Fersht A. (1977) Enzyme Structure and Mechanism. W.H. Freeman & Co, San Francisco.

Fox S. and Dose K. (1972) Molecular Evolution and the Origin of Life. W.H. Freeman & Co, San Francisco.

Frieden E. (1972) The chemical elements of life. Sci. Am. 227:52.

Gupta R.S. and Golding G.B. (1996) The origin of eukaryotic cell. TIBS 21:166.

Hillis D.M. (1997) Biology recapitulates phylogeny. Science 276: 218.

Hudder A., Nathanson L. and Deutscher M.P. (2003) Organization of mammalian cytoplasm. Mol. Cell Biol. 23:9318.

Jacob F (1982) Evolution and tinkering. Science 196:121.

Judson H.F. (1979) The Eight Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology. Simon and Schuster, New York.

Klug A. (1972) Assembly of tobacco mosaic virus. Fed. Proc. 31:30.

Lehninger A.L., Nelson D.L. and Cox M.M. (2008) Principles of Biochemistry, 5th Ed. W.H. Freeman, New York.

Murray R.K. et al. (1996) Harper's Biochemistry, 14th Ed. Appleton & Lange, New York.

Oparin A.I. (1974) Evolution of the Concepts on the Origin of Life: Seminar on the Origin of Life. Moscow.

Oparin A.I. (1978) The origin of life. Scientia 113:7.

Ostro M.J. (1987) Liposomes. Sci. Am. 256 (1):102.

Pellicena P. and Kuriyan J. (2006) Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. Curr. Opin. Struct. Biol. 16:702.

Perutz M. (1978) Hemoglobin structure and respiratory transport. Sci. Am. 239:68.

Petsko G.A. and Ringe D. (2004) Protein Structure and Function. New Science Press, London.

Phillips D.C. and North A.C.T. (1975) Protein Structure. Oxford Biology Readers, Vol 34. Oxford University Press, Oxford.

Richards F.M. (1991). The protein folding problem. Sci. Am. 264:54.

Rossmann M.G. and Argos P. (1978) Protein folding. Annu. Rev. Biochem. 50:497.

Saenger W. (1984) Principles of Nucleic Acid Structure. Springer, New York.

Schopf W. (1978) The evolution of the earliest cells. Sci. Am. 239:110.

Sharon N. (1980) Carbohydrates. Sci. Am. 243:90.

Spiegelman S. (1971) An approach to the experimental analysis of precellular evolution. Q. Rev. Biophys. 4:213.

Stryer L. (1995) Biochemistry, 4th Ed. W.H. Freeman & Co, New York.

Watson J.D. et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Ed. W.A. Benjamin-Cummings, Menlo Park.

Watson J.D. and Crick F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171:737.

Weinberg R.A. (1985) The molecules of life. Sci. Am. 253 (4):34.

Wilson A.C. (1985) The molecular basis of evolution. Sci. Am. 253 (4):148.

3 Membranas celulares

Permeabilidad de las membranas

3-1. Las membranas de la célula ejercen diversas actividades

La célula se halla rodeada por la membrana plasmática, una delgada capa de 6 a 10 nm de espesor compuesta por lípidos, proteínas e hidratos de carbono (fig. 3-1). Su estructura básica es similar a la de las restantes membranas de la célula, las cuales envuelven a los organoides del sistema de endomembranas —incluida la envoltura nuclear—, a las mitocondrias y a los peroxisomas.

Las membranas celulares no son simples fronteras inertes que **compartimentan** a la célula, sino estructuras que ejercen actividades complejas, como las siguientes:

1) Constituyen verdaderas barreras permeables selectivas que controlan el pasaje de iones y de moléculas pequeñas, es decir, de solutos. Así, la permeabilidad selectiva de las membranas impide el intercambio indiscriminado de los componentes de los organoides entre sí y de los componentes extracelulares con los de la célula.

2) Proveen el soporte físico para la actividad ordenada de las enzimas que se asientan en ellas.

3) Mediante la formación de pequeñas vesículas transportadoras hacen posible el desplazamiento de sustancias por el citoplasma (cap. 7-1).

4) La membrana plasmática participa en los procesos de endocitosis y de exocitosis. Por el primero, la célula incorpora sustancias desde el exterior (cap. 7-29); por el segundo, las secreta (cap. 7-22).

5) En la membrana plasmática existen moléculas mediante las cuales las células se reconocen y se adhieren entre sí y con componentes de la matriz extracelular (cap. 6-1).

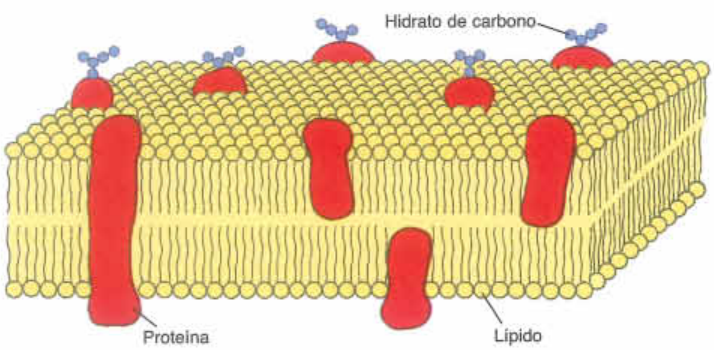


Fig. 3-1. Dibujo tridimensional de una membrana celular.

6) La membrana plasmática posee receptores que interactúan específicamente con moléculas provenientes del exterior, como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y otros inductores químicos. A partir de estos receptores se desencadenan señales que se transmiten por el interior de la célula; sus primeros eslabones se sitúan cerca del receptor, en general en la propia membrana plasmática (cap. 11-8).

ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS CELULARES

3-2. La estructura básica de las membranas celulares corresponde a una bicapa lipídica

Los lípidos fundamentales de las membranas biológicas son fosfolípidos de distinta clase y colesterol. En el capítulo 2-7 se señaló la naturaleza anfipática de los primeros; son moléculas que poseen una cabeza polar o hidrofílica y largas cadenas hidrocarbonadas apolares o hidrofóbicas. Esta dualidad tiene suma importancia en la estructuración de las membranas.

Cuando los fosfolípidos se colocan entre un aceite y una solución acuosa forman una capa de una molécula de espesor (monocapa), en la que todas las cabezas polares se orientan hacia la solución acuosa y los ácidos grasos se alejan de ella, de modo que los fosfolípidos quedan perpendiculares al plano de la interfase agua/aceite (fig. 3-2). Más aún, si los fosfolípidos y el aceite son "empujados" hacia el interior de la solución acuosa se forman pequeñas vesículas, con las cabezas de los fosfolípidos en la periferia —en contacto con el medio acuoso— y los ácidos grasos orientados hacia el aceite en el interior vesicular (fig. 3-2).

En cambio, en las soluciones acuosas puras los fosfolípidos no forman monocapas sino bicapas que se cierran sobre sí mismas, lo cual da lugar a vesículas de hasta 1 μm de diámetro llamadas **liposomas** (fig. 3-3). Como es de esperar, los ácidos grasos hidrofóbicos se unen en el interior de la bicapa y las cabezas polares hidrofílicas de cada monocapa se orientan hacia las soluciones acuosas. Dado que los liposomas pueden fusionarse con las membranas plasmáticas, se los utiliza como vehículos para incorporar diversos compuestos a las células; para ello se los construye en un medio acuoso al que se le agrega uno o más compuestos (medicamentos, cosméticos), lo cual asegura su incorporación al interior vesicular.

Cuando se colocan fosfolípidos entre dos soluciones acuosas separadas por un tabique incompleto, forman una bicapa lipídica que completa la sepa-

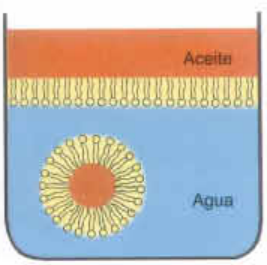


Fig. 3-2. Esquema que ilustra cómo se ordenan los fosfolípidos cuando se los coloca en una interfase de aceite y agua.

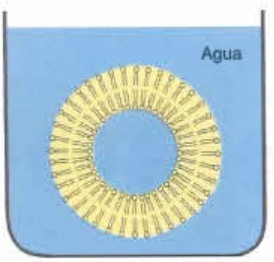


Fig. 3-3. Liposoma derivado del ordenamiento espontáneo de los fosfolípidos cuando se los coloca en un medio acuoso.

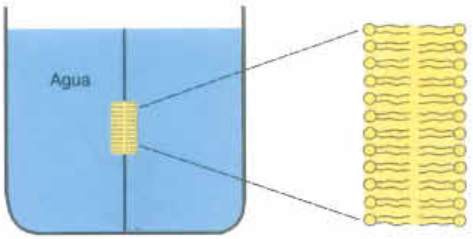


Fig. 3-4. Bicapa lipídica artificial formada al colocarse fosfolípidos entre dos medios acuosos.

ración (fig. 3-4). Aquí también las cabezas polares de los fosfolípidos se dirigen hacia las soluciones acuosas y los ácidos grasos se orientan hacia el interior de la bicapa, que por tal motivo resulta altamente hidrofóbico. Estas ***bicapas lipídicas artificiales*** se construyen para estudiar la permeabilidad y las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, dado que exhiben una estructura básica y un comportamiento semejantes.

3-3. Los fosfolípidos son los lípidos más abundantes de las membranas celulares

Las membranas celulares están formadas por bicapas lipídicas similares a las descritas en la sección anterior. En la figura 3-5 se muestran cuatro bicapas lipídicas tal como se observan con el microscopio electrónico.

Estas bicapas contienen fosfolípidos y colesterol, pero los primeros suelen ser las moléculas lipídicas más abundantes.

Las estructuras de las distintas clases de fosfolípidos presentes en las membranas fueron descritas en el capítulo 2-7. Debe recordarse que las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos pueden estar saturadas o no (fig. 2-20). En las cadenas saturadas los enlaces simples entre los carbonos les confieren a los ácidos grasos una configuración extendida, lo que hace que éstos se hallen perpendiculares respecto del plano de la bicapa lipídica y que en cada monocapa los fosfolípidos queden agrupados en conjuntos bastante compactos. En cambio, los enlaces dobles de las cadenas no saturadas producen angulosidades en los ácidos grasos, lo cual separa a los fosfolípidos y le da a la bicapa una configuración menos compacta (fig. 3-6).

El fosfolípido que predomina en las membranas celulares es la **fosfatidilcolina**. Le siguen, en este orden, la **fosfatidiletanolamina**, la **fosfatidilserina**, la **esfingomielina** y el **fosfatidilinositol**. Un derivado de este último, el fosfatidilinositol 4,5-difosfato o PIP_2 (fig. 2-16), cuando es hidrolizado genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), dos pequeñas moléculas implicadas en la transmisión de señales intracelulares (caps. 11-14 y 11-17). En cambio, cuando al PIP_2 se le añade un fosfato se convierte en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato o PIP_3 (caps. 11-14 y 11-20).

La membrana interna de la mitocondria contiene un fosfolípido doble llamado **difosfatidilglicerol** o **cardiolipina** (cap. 2-7) (fig. 2-17).

El **colesterol** es un componente cuantitativamente importante de las membranas celulares, especialmente en la membrana plasmática. Debido a que es anfipá-

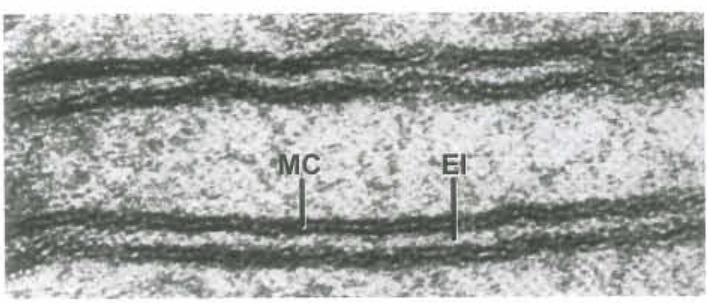


Fig. 3-5. Micrografía electrónica de cuatro membranas celulares (*MC*). En cada una se observa la bicapa lipídica. *EI*, espacio intercelular. 240.000×. (De E. D. De Robertis.)

tico, en cada monocapa se dispone entre los fosfolípidos, con el grupo OH del C3′ de su núcleo cíclico orientado hacia la solución acuosa (cap. 2-7) (fig. 3-7).

En la membrana del retículo endoplasmático existe un lípido especial llamado **dolicol** (figs. 2-24 y 7-15), necesario para la incorporación de los oligosacáridos a las moléculas proteicas durante la formación de algunas glicoproteínas (cap. 7-16).

Los distintos componentes lipídicos se mantienen en la bicapa gracias a sus interacciones con el medio acuoso y con los ácidos grasos de los fosfolípidos vecinos, sin que se produzcan uniones covalentes entre ellos.

Las dos capas de la bicapa lipídica no son idénticas en su composición, razón por la cual se dice que las membranas son asimétricas. La fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol predominan en la capa que está en contacto con el citosol, mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomielina predominan en la capa no citosólica (en la membrana plasmática, la que da al exterior; en un organoide, la que da a su cavidad).

La composición de las membranas celulares presenta diferencias cuantitativas y cualitativas, según se analice la membrana plasmática o la membrana de algún organoide en particular. Por ejemplo, la membrana mitocondrial interna posee difosfatidilglicerol y la del retículo endoplasmático contiene dolicol, lípidos que no existen en otras membranas. En cambio, el colesterol abunda en la membrana plasmática y es muy escaso en la membrana interna de la mitocondria. También existen diferencias entre las membranas cuando se las analiza en los distintos tipos celulares.

A temperaturas fisiológicas la bicapa lipídica se comporta como una estructura fluida. La fluidez aumenta cuando se eleva la proporción de ácidos grasos cortos y no saturados en los fosfolípidos. Vimos que la saturación de los ácidos grasos hace que los fosfolípidos se agrupen en conjuntos más compactos, lo cual le confiere mayor rigidez a la bicapa. El colesterol produce consecuencias similares.

Decir que la bicapa lipídica se comporta como una estructura fluida significa que sus componentes rotan en torno de sus ejes y se desplazan libremente por la superficie membranosa (fig. 3-8). Además de estos movimientos, los lípidos pueden pasar de una capa a la otra por un tipo de movimiento llamado "flip-flop" (por su semejanza con la conocida cabriola gimnástica). Este último movimiento es poco común comparado con la rotación y el desplazamiento lateral.

En la sección 3-7 veremos que algunos lípidos membranosos se hallan asociados con hidratos de carbono bajo la forma de glicolípidos.

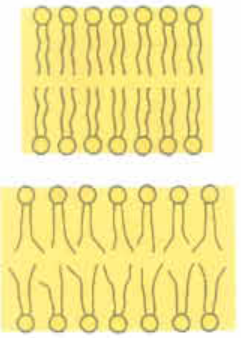


Fig. 3-6. Esquemas que ilustran cómo los dobles enlaces en los ácidos grasos distancian a los fosfolípidos en las bicapas lipídicas.

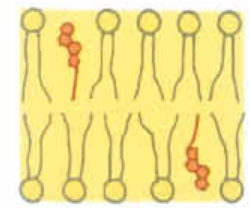


Fig. 3-7. Moléculas de colesterol entre los fosfolípidos de las membranas celulares.

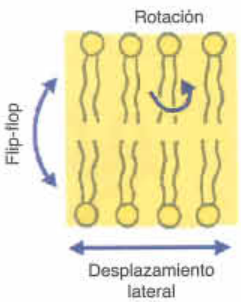


Fig. 3-8. Movimientos que experimentan los fosfolípidos en las membranas de la célula.

3-4. Las proteínas de las membranas celulares se clasifican en integrales y periféricas

Las membranas celulares contienen importantes cantidades de proteínas. En promedio, la proporción de lípidos y de proteínas es equivalente, aunque varía en los distintos tipos de membranas. Por ejemplo, la membrana de las vainas de mielina posee un 80% de lípidos y un 20% de proteínas, mientras que en la membrana interna de las mitocondrias esa relación se invierte.

Las proteínas de las membranas celulares exhiben una asimetría mayor que los lípidos y se clasifican en periféricas e integrales (fig. 3-9).

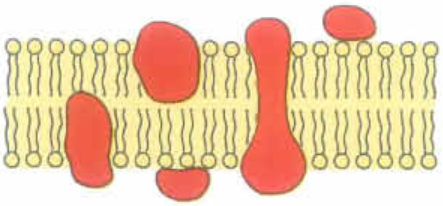


Fig. 3-9. Posiciones de las proteínas integrales y de las proteínas periféricas en las membranas celulares.

Las **proteínas periféricas** se hallan sobre ambas caras de la membrana, ligadas a las cabezas de los fosfolípidos o a proteínas integrales por uniones no covalentes. Así, pueden ser extraídas con cierta facilidad mediante tratamientos con soluciones salinas. De la superficie de las proteínas emergen los residuos de los aminoácidos polares (fig. 2-25), los cuales interactúan con grupos químicos de la propia membrana y de los medios que la bañan.

Las **proteínas integrales** se hallan empotradas en las membranas, entre los lípidos de la bicapa, por lo que para su extracción se necesitan procedimientos relativamente drásticos, mediante detergentes o solventes especiales. Algunas se extienden desde la zona hidrofóbica de la bicapa hasta una de las caras de la membrana, por donde emergen (fig. 3-9). Otras, en cambio, atraviesan la bicapa totalmente, de ahí que se las llame **transmembranosas** (fig. 3-9). El extremo carboxilo de estas proteínas suele hallarse en el lado citosólico de la membrana y el extremo amino en el lado no citosólico. Dichos extremos se vinculan con los medios acuosos que bañan a ambas superficies de la membrana, por lo que poseen un predominio de aminoácidos hidrofílicos. En cambio, las partes de las proteínas integrales que se hallan entre los ácidos grasos de los fosfolípidos presentan una mayor proporción de aminoácidos hidrofóbicos. Comúnmente, la zona intramembranosa exhibe una estructura secundaria en hélice α, con su superficie exterior hidrofóbica en contacto con los ácidos grasos, también hidrofóbicos (fig. 3-10).

Muchas proteínas transmembranosas atraviesan la bicapa lipídica más de una vez —de ahí que se llamen ***multipaso***—, por lo que forman una sucesión de asas cuyas curvas emergen por ambas caras de la membrana (fig. 3-10).

Algunas proteínas transmembranosas se asocian con otras para formar estructuras cilíndricas huecas, como las que se muestran en la figura 3-21. Sus aminoácidos se distribuyen de tal manera que la pared exterior del cilindro hueco —en contacto con los ácidos grasos— resulta apolar, mientras que la superficie interna se halla cubierta por grupos polares, los cuales delimitan un túnel cuyas bocas se abren en ambos lados de la bicapa. Más adelante analizaremos las características de estos túneles y su importancia para el transporte de los solutos a través de las membranas.

Debe agregarse que existen proteínas que se comportan como integrales —pues requieren métodos drásticos para ser removidas— pero que tienen posiciones periféricas. Su estabilidad en la membrana se debe a que se hallan li-

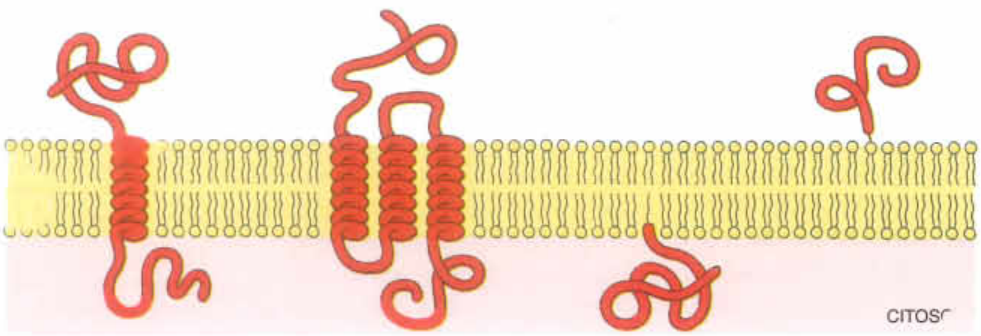


Fig. 3-10. Esquemas de cuatro proteínas integrales, dos transmembranosas (una de ellas multipaso) y dos situadas en posiciones periféricas.

gadas mediante uniones covalentes a un ácido graso o a un fosfatidilinositol, según estén en el lado citosólico o en el lado no citosólico, respectivamente (fig. 3-10).

En la sección 3-7 se verá que muchas proteínas membranosas están asociadas con hidratos de carbono, es decir, son glicoproteínas. Más aún, en la membrana plasmática casi todas las proteínas pertenecen a esta categoría.

3-5. Las membranas celulares responden al modelo llamado de mosaico fluido

Como los lípidos, las proteínas también pueden girar en torno de sus propios ejes y desplazarse lateralmente en el plano de la bicapa. Se las ha comparado con "icebergs" que flotan en la bicapa lipídica. A esta propiedad dinámica de las membranas biológicas se le da el nombre de mosaico fluido.

La capacidad de migrar por la bicapa indicaría que las interrelaciones químicas entre proteínas y lípidos son efímeras. Sin embargo, en la mayoría de los casos tienen cierta estabilidad. Así, los lípidos que rodean a una proteína dada se mantienen asociados a ella, lo cual parece ser importante para asegurar la configuración de la proteína. Comúnmente, las proteínas membranosas muestran propiedades diferentes cuando se encuentran en las membranas y cuando han sido aisladas y purificadas. Ello ha llevado a revalorizar el entorno lipídico en que se hallan y a reconocer la existencia de movimientos combinados de las proteínas con los lípidos. Más aún, las actividades de las proteínas podrían variar por modificaciones en los lípidos anexos.

Algunas proteínas de la membrana plasmática tienen restringida su movilidad lateral por hallarse unidas a componentes del citoesqueleto, los cuales las inmovilizan en determinados puntos de la membrana (cap. 5-24) (fig. 5-31). Por otra parte, la unión oclusiva (cap. 6-11) (fig. 6-9) impide que las proteínas pasen de un lado al otro del límite marcado por ella (fig. 3-27).

3-6. La fluidez de las proteínas en la bicapa lipídica ha sido comprobada mediante distintas técnicas biológicas

Vimos que la fluidez de la membrana hace referencia al desplazamiento de los lípidos y de las proteínas en el plano de la bicapa. Esta fluidez ha sido comprobada mediante anticuerpos ligados a fluorocromos, que son fáciles de detectar con el microscopio de fluorescencia (cap. 23-25). Examinemos los siguientes experimentos:

Si se trata a linfocitos con anticuerpos fluorescentes que se unen a receptores (proteínas) localizados en sus membranas plasmáticas, puede observarse el desarrollo de una especie de capuchón (fig. 3-11). Este se forma porque los receptores se desplazan por la membrana y se agrupan en un polo de la célula. Además, allí la membrana plasmática puede invaginarse hacia el citosol y formar vesículas de endocitosis (cap. 7-29), lo cual se detecta también con el microscopio de fluorescencia.

Si en un cultivo celular se fusionan dos células de especies diferentes (por ejemplo, una humana y otra de ratón), se obtiene una célula con dos núcleos llamada **heterocarión**, que comparte los citoplasmas, los núcleos y las membranas plasmáticas de las células participantes (fig. 3-12) (cap. 21-4). La

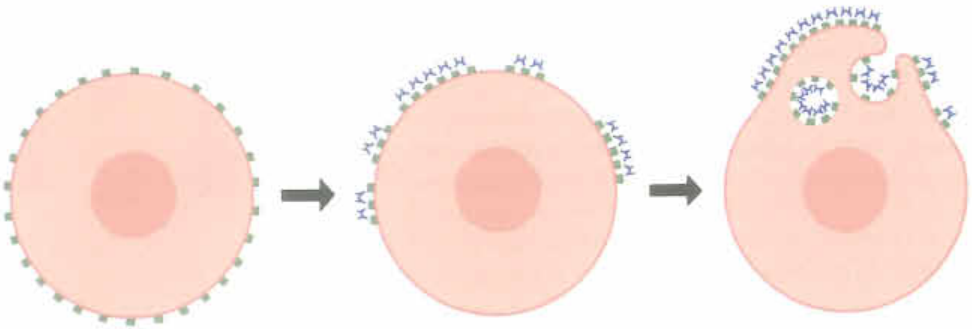


Fig. 3-11. Linfocito tratado con un anticuerpo fluorescente que se une a receptores proteicos de la membrana plasmática. Obsérvese el desplazamiento de los receptores y su agrupamiento en un polo de la célula (el cercano al complejo de Golgi), donde pueden ingresar por endocitosis. (De S. de Pretris y M. C. Raff.)

unión de las células se consigue con la ayuda del virus *Sendai* inactivado o del polietilenglicol, cuyas propiedades fusógenas propician el contacto y la integración de las membranas plasmáticas. Si previamente se marcan las células con sendos anticuerpos fluorescentes de colores diferentes (como la fluoresceína, que es verde, y la rodamina, que es roja), luego de la fusión pueden reconocerse en la membrana plasmática del heterocarión las partes aportadas por cada célula. No obstante, debido a que los receptores marcados se desplazan por la membrana, pronto los dos colores se entremezclan en toda la superficie de la célula.

En la figura 3-13 se representa el posible mecanismo molecular de fusión de membranas. Cuando se hallan próximas entre sí y bajo la influencia de elementos fusógenos (en nuestro caso, el virus *Sendai* o el polietilenglicol), se suceden los siguientes fenómenos: 1) se despejan las proteínas membranosas, lo que deja a las bicapas sin otro tipo de moléculas que los lípidos; 2) las bicapas establecen íntimo contacto a través de sus respectivas monocapas enfrentadas; 3) dichas capas desaparecen y se desarrolla una interfase de estructuras lipídicas hexagonales entre las dos monocapas restantes (esta interfase parece ser esencial en todos los procesos de fusión de membranas); 4) finalmente, la interfase desaparece y se completa la fusión. El mecanismo descrito se produce en todos los procesos fisiológicos de fusión de membranas y en ellos intervienen **agentes fusógenos** presentes en el citosol. Se describirán cuando analicemos la dinámica de las vesículas transportadoras en el sistema de endomembranas (cap. 7-41) y la fusión del espermatozoide con el ovocito durante la fecundación (cap. 19-19).

Otro método utilizado para estudiar el desplazamiento lateral de las proteínas en el plano de las membranas es la técnica de **recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo**, conocida con la sigla **FRAP** (por *fluorescence recovery after photobleaching*). Aquí ciertas proteínas membranosas son marcadas con fluorocromos y un pequeño sector de la membrana es irradiado con rayos láser. Dicho sector se "blanquea", es decir, queda sin fluorescencia. No obstante, pronto es invadido por proteínas fluorescentes provenientes de las regiones no irradiadas. La velocidad de recupera-

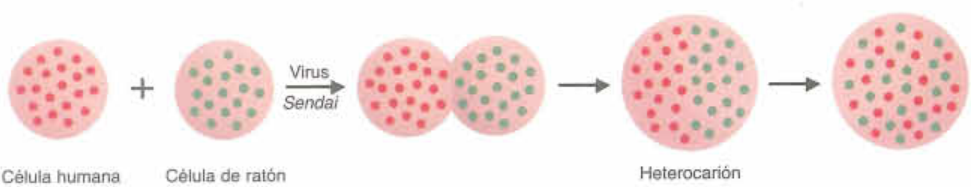


Fig. 3-12. Obtención de un heterocarión al unirse dos células de especies diferentes mediante el virus *Sendai* inactivado.

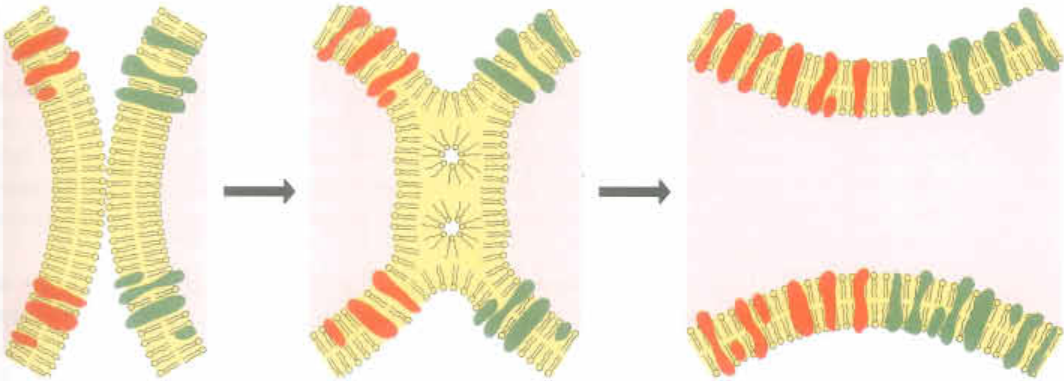


Fig. 3-13. Esquema que ilustra el posible mecanismo molecular responsable de la fusión de dos membranas celulares. (De R. Schaier y P. Overath.)

ción de la fluorescencia puede calcularse mediante un índice llamado "coeficiente de difusión".

3-7. Los hidratos de carbono de las membranas celulares forman parte de glicolípidos y de glicoproteínas

Las membranas celulares contienen entre 2 y 10% de hidratos de carbono. Estos se hallan solamente en la superficie no citosólica de la bicapa lipídica, unidos covalentemente a lípidos y a proteínas de la membrana, es decir, bajo la forma de glicolípidos y glicoproteínas (fig. 3-14).

Los **glicolípidos** se clasifican en cerebrósidos y gangliósidos (cap. 2-7). Los ***cerebrósidos*** se forman por la unión de una galactosa o de una glucosa con la ceramida (fig. 2-21). La estructura de los ***gangliósidos*** es similar, pero el hidrato de carbono no es un monosacárido sino un oligosacárido que contiene uno a tres ácidos siálicos (fig. 2-22).

Por su lado, las **glicoproteínas** contienen oligosacáridos o polisacáridos.

Los ***oligosacáridos*** se hallan ligados a las proteínas a través de enlaces N-glicosídicos u O-glicosídicos (cap. 2-6) (figs. 2-7 y 2-8). Habitualmente los monómeros que se localizan en la periferia de los oligosacáridos son ácidos siálicos. Una proteína puede contener una o varias cadenas oligosacáridas (fig. 3-14).

Los ***polisacáridos*** ligados a proteínas son ***glicosaminoglicanos*** (uno o varios por proteína) y forman glicoproteínas llamadas **proteoglicanos** (cap. 2-6) (figs. 2-10 y 2-11). En los capítulos 6-3 y 7-18 se verá que muchos proteoglicanos son transferidos hacia el medio extracelular, donde abundan. No obstante, algunos regresan a la célula y se instalan en la membrana plasmática como glicoproteínas periféricas. Así, puede decirse que estos proteoglicanos son moléculas recuperadas por la célula.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE BIBLIOTECA FILIAL CIUDAD DEL ESTE

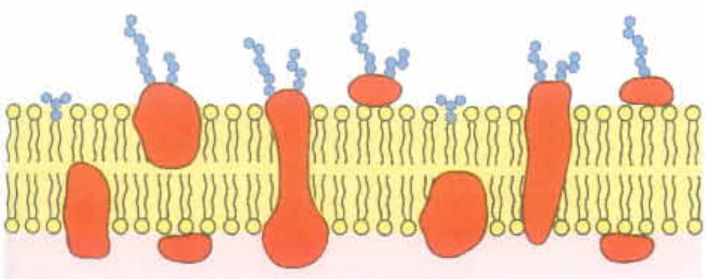


Fig. 3-14. Presencia de hidratos de carbono (integrantes de glicolípidos y glicoproteínas) en la cara no citosólica de las membranas celulares.

3-8. Los hidratos de carbono cumplen funciones relevantes en las membranas celulares

Los hidratos de carbono de los glicolípidos y de las glicoproteínas que se localizan en la superficie no citosólica (o luminal) de la membrana de los organoides integrantes del sistema de endomembranas cumplen diversas funciones. Los correspondientes a la membrana de los lisosomas, por ejemplo, la protegen de las enzimas hidrolíticas presentes en el interior del organoide (cap. 7-33).

Los hidratos de carbono de los glicolípidos y de las glicoproteínas que se localizan en la cara externa de la membrana plasmática forman una cubierta llamada **glicocáliz** (fig. 3-14). Sus funciones son las siguientes:

1) Protegen a la superficie de la célula de agresiones mecánicas y químicas. Por ejemplo, el glicocáliz de las células situadas en la superficie de la mucosa intestinal las protege del contacto con los alimentos y de los efectos destructivos de las enzimas digestivas.

2) Debido a la presencia de ácidos siálicos en muchos de los oligosacáridos del glicocáliz, la carga eléctrica en su superficie es negativa. Ello atrae a los cationes del medio extracelular, que quedan retenidos en la cara exterior de la célula. Esta condición es importante particularmente en las células nerviosas y en las musculares, puesto que necesitan incorporar gran cantidad de Na^+ de fácil disponibilidad durante la despolarización de sus membranas.

3) Algunos oligosacáridos del glicocáliz son necesarios para los procesos de reconocimiento y de adhesión celular (caps. 6-8 y 6-9).

4) La membrana plasmática que circunda varias veces el axón de algunas neuronas para formar la vaina de mielina contiene abundantes glicolípidos, los cuales contribuyen al aislamiento eléctrico del axón.

5) La especificidad del sistema ABO de grupos sanguíneos se halla determinada por ciertos oligosacáridos muy cortos y parecidos entre sí, presentes en la membrana plasmática de los glóbulos rojos. Estos oligosacáridos sólo difieren por sus monómeros terminales y están ligados a una proteína transmembranosa o a una ceramida, como muestra la figura 3-15. Así, en los eritrocitos pertenecientes al grupo A el monosacárido terminal de la cadena oligosacárida es la N-acetilgalactosamina y en los del grupo B es la galactosa; cuando estos monosacáridos terminales están ausentes los eritrocitos pertenecen al grupo sanguíneo O (fig. 3-15).

6) En las células tumorales malignas se han observado cambios en algunos oligosacáridos membranosos, lo cual ha llevado a postular que influyen en la conducta anómala que ellas asumen. Se cree que alteran la recepción de las señales que controlan las divisiones celulares.

7) Algunas toxinas, bacterias y virus se unen a oligosacáridos específicos presentes en la membrana plasmática de las células que atacan. Por ejemplo, se sabe que algunas bacterias se unen a las manosas de oligosacáridos de la membrana plasmática de las células que infectan como paso previo a su invasión. Por otro lado, para iniciar sus acciones patógenas, algunas toxinas —como las que elaboran las bacterias del cólera, del tétanos, del botulismo y de la difteria— se unen selectivamente a oligosacáridos de gangliósidos presentes en la superficie celular.

8) En algunas células, determinadas glicoproteínas del glicocáliz tienen

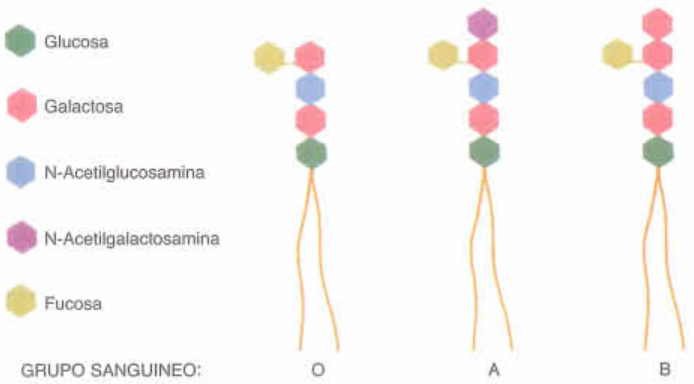


Fig. 3-15. Oligosacáridos de la membrana plasmática del eritrocito, determinantes de los grupos sanguíneos O, A y B.

propiedades enzimáticas. Por ejemplo, diversas glicoproteínas pertenecientes al glicocáliz de las células que revisten el intestino son peptidasas y glicosidasas que tienen por función completar la degradación de las proteínas y de los hidratos de carbono ingeridos, iniciada por otras enzimas digestivas.

PERMEABILIDAD DE LAS MEMBRANAS CELULARES

3-9. Los solutos y las macromoléculas atraviesan las membranas celulares mediante mecanismos diferentes

Existe un flujo continuo de sustancias que entran y salen de la célula y circulan por su interior. Para ello, los **solutos** (es decir, los iones y las moléculas pequeñas) deben pasar a través de las membranas celulares; tal fenómeno se denomina ***permeabilidad*** y será estudiado en las próximas secciones de este capítulo.

En lo que respecta a las **macromoléculas**, para atravesar las membranas algunas utilizan canales proteicos especiales llamados ***translocones***, otras pasan por ***poros*** de sofisticada composición y otras se valen de ***vesículas*** pequeñas. Estas transferencias serán analizadas en los capítulos dedicados al sistema de endomembranas (caps. 7-1 y 7-12), la mitocondria (cap. 8-28), el peroxisoma (cap. 10-5) y la envoltura nuclear (cap. 12-4).

3-10. El pasaje de solutos a través de las membranas celulares puede ser pasivo o activo

El incesante intercambio de solutos entre el medio que rodea a la célula y el citosol, y entre éste y el interior de los organoides, se realiza a través de la membrana plasmática y de las membranas de dichos organoides, respectivamente. Según los casos, el pasaje se produce sin gasto de energía o por mecanismos que requieren de ella. Cuando no consume energía, el proceso se denomina transporte pasivo; el dependiente de energía, transporte activo.

El **transporte pasivo** se cumple a través de los componentes de la ***bicapa lipídica*** o a través de estructuras especiales, constituidas por proteínas transmembranosas organizadas para el paso de los solutos (fig. 3-16); estas estructuras son de dos tipos: los ***canales iónicos*** y las ***permeasas***, llamadas también ***transportadores***. El transporte pasivo a través de la bicapa lipídica se denomina **difusión simple**, y el que se realiza a través de los canales iónicos y las permeasas lleva el nombre de **difusión facilitada**.

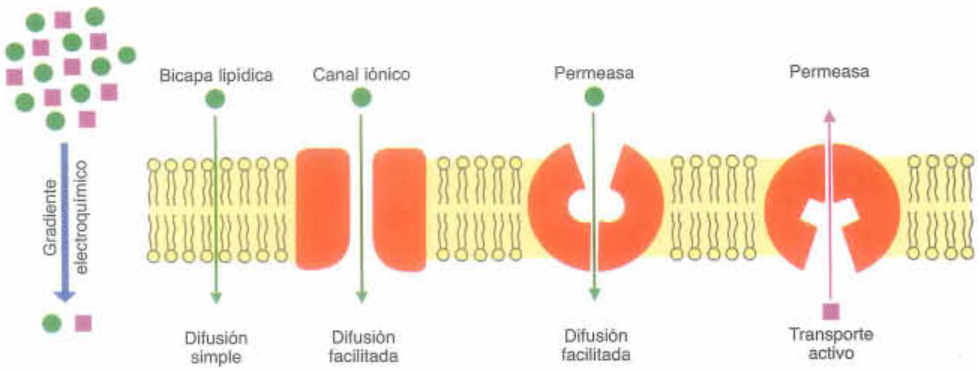


Fig. 3-16. Distintos mecanismos y estructuras membranosas utilizados por los solutos para atravesar las membranas de la célula.

El **transporte activo** tiene lugar exclusivamente a través de ***permeasas*** (fig. 3-16).

3-11. El transporte pasivo de los solutos se produce por difusión

Cuando se disuelve un soluto en un solvente, las partículas del primero se dispersan en forma progresiva por todo el solvente hasta quedar uniformemente distribuidas. El movimiento del soluto —llamado **difusión**— se realiza desde los sitios en que se halla más concentrado hasta los de menor concentración, con una velocidad proporcional a la diferencia entre las concentraciones (fig. 3-17). Esta diferencia se denomina **gradiente de concentración**. Si el soluto posee carga eléctrica, gravita además el **gradiente de voltaje** o **potencial eléctrico** que se establece entre los distintos puntos de la solución. La suma de los gradientes de concentración y de voltaje se conoce como **gradiente electroquímico**. La difusión a favor de tales gradientes es un proceso que ocurre espontáneamente, ***sin gasto de energía***, de ahí que lleve el nombre de transporte pasivo.

3-12. La difusión simple se produce a través de la bicapa lipídica

El transporte pasivo de solutos puede también ocurrir entre compartimientos acuosos separados por membranas semipermeables, como lo son las **bicapas lipídicas** de las membranas celulares. Este tipo de transporte se denomina **difusión simple**. Dichas membranas se llaman semipermeables porque los solutos están obligados a sortear el tamiz que representa su doble capa de lípidos.

Las sustancias que se disuelven en los lípidos atraviesan con cierta facilidad la zona hidrofóbica de las membranas. Existe una relación lineal directa entre la solubilidad en lípidos de una sustancia y su velocidad de difusión

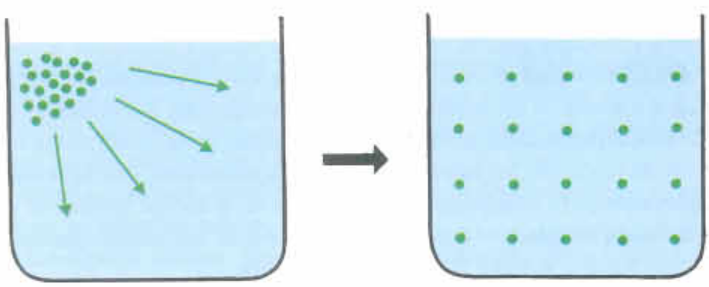


Fig. 3-17. Difusión de una sustancia disuelta en un solvente.

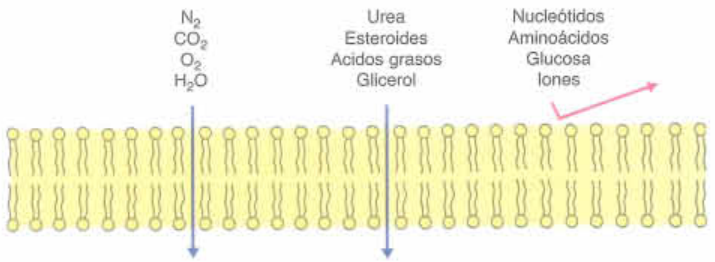


Fig. 3-18. Solutos que atraviesan las membranas de la célula por difusión simple.

a través de las membranas semipermeables. Tal relación se expresa mediante el coeficiente de partición aceite/agua, que se mide agitando el soluto en una mezcla de ambos fluidos. Cuando se separan las dos fases, se determina la concentración de la sustancia disuelta en cada una de ellas. La relación concentración del soluto en aceite/concentración del soluto en agua da el valor del coeficiente de partición.

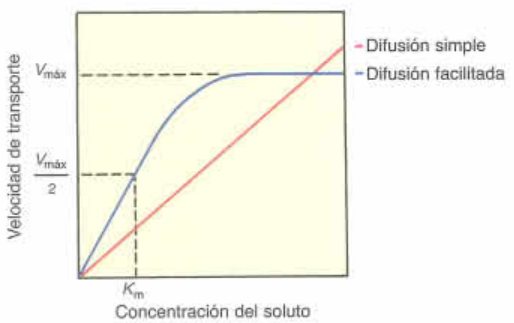
Las moléculas no polares pequeñas —como el O_2, el CO_2 y el N_2— difunden libremente a través de las bicapas lipídicas (fig. 3-18). También lo hacen compuestos liposolubles de mayor tamaño, por ejemplo, los ácidos grasos y los esteroides. A pesar de ser moléculas polares, el glicerol y la urea atraviesan fácilmente las membranas celulares porque son pequeñas y no poseen carga eléctrica.

La bicapa lipídica de las membranas celulares permite el paso del **agua** por difusión simple. Debido a que el agua constituye el solvente en que se hallan disueltos los solutos y dispersas las macromoléculas, el sentido del movimiento de las moléculas acuosas depende del **gradiente osmótico** entre ambos lados de la membrana. En la sección 3-16 se analizarán otros aspectos vinculados con el pasaje del agua a través de las membranas celulares.

La difusión de las moléculas polares a través de la bicapa lipídica es tanto menor cuanto mayor es su tamaño; las hexosas, los aminoácidos y los nucleótidos, por ejemplo, prácticamente no difunden. En cuanto a los iones, dada su carga eléctrica se unen a varias moléculas de agua, lo cual les impide atravesar la bicapa lipídica por más pequeños que sean (en el capítulo 2-2 vimos que el agua se comporta como un dipolo).

La difusión simple se realiza en forma espontánea, con una velocidad directamente proporcional a la diferencia de concentración (o gradiente) del soluto entre uno y otro lado de la membrana, como se observa en el gráfico de la figura 3-19. Debe señalarse que la pendiente de la recta depende del grado de permeabilidad de la membrana al soluto. Como se vio, el sentido de la difusión depende del lado en que se halla más concentrado el soluto.

Fig. 3-19. Velocidades de flujo de los solutos al atravesar una membrana por difusión simple y difusión facilitada, según sus gradientes de concentración.



3-13. La difusión facilitada se produce a través de canales iónicos y de permeasas

La mayoría de las sustancias que atraviesan las membranas celulares a favor de gradientes —es decir, ***sin gasto de energía***— lo hacen a una velocidad mayor a la esperable si su pasaje fuera por difusión simple. La diferencia se explica por la presencia de ciertos componentes membranosos proteicos llamados

canales iónicos y **permeasas**, a través de los cuales se facilita —aunque también se regula— la transferencia de los solutos de un lado al otro de la membrana.

El sentido de la difusión se realiza siempre a favor de los gradientes de concentración y voltaje. Así, ante una inversión de esos gradientes, el sentido de la difusión también se invierte. Como vemos, en la **difusión facilitada** la fuerza que impulsa la movilización de las partículas del soluto es el gradiente, y por lo tanto no consume energía. Desde este punto de vista, la difusión facilitada es similar a la difusión simple; la diferencia reside en que en la primera participan estructuras proteicas reguladoras y en la segunda no.

Durante el transporte pasivo de solutos por difusión facilitada, los complejos soluto-canal iónico y soluto-permeasa muestran características de especificidad y saturabilidad similares a las del complejo enzima-sustrato. Así, si en un sistema de coordenadas se representa la velocidad del flujo en función de la concentración del soluto, se obtiene una ***curva hiperbólica***, lo cual marca una notable diferencia con la relación lineal directa de la difusión simple (fig. 3-19). La hipérbola es semejante a la derivada de la actividad enzimática en función de la concentración del sustrato (fig. 2-34). Tal comportamiento indica que el proceso es saturable. Cuando en un canal iónico o en una permeasa se alcanza la velocidad máxima de flujo, ésta ya no aumenta por más que se incremente la concentración del soluto.

Igual que en el caso de las enzimas, se puede definir la constante K_m como la concentración de soluto en que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de flujo. En la mayoría de las circunstancias el valor K_m tiene una relación inversa con la afinidad del transportador por el soluto. A menor valor de K_m, mayor es la afinidad, y viceversa. En consecuencia, en este tipo de sistema la velocidad de flujo del soluto puede expresarse mediante una ecuación similar a la empleada para las enzimas (cap. 2-15):

$$J = \frac{J_{máx}\,[S]}{K_m + [S]},$$

donde J es la velocidad de flujo; $J_{máx}$ la velocidad máxima de flujo; [S] la concentración del soluto, y K_m la concentración del soluto a la cual el flujo es igual a la mitad del máximo.

Como ocurre con las enzimas, existen sustancias que poseen estructuras moleculares semejantes a la de los solutos y que pueden unirse a los canales iónicos y a las permeasas y producir inhibiciones competitivas (cap. 2-17). También se producen inhibiciones de tipo no competitivo.

3-14. Existen dos clases de canales iónicos, los dependientes de ligando y los dependientes de voltaje

Los **canales iónicos** son poros o túneles hidrofílicos que atraviesan las membranas, formados por proteínas integrales transmembranosas generalmente de tipo multipaso.

Existen canales iónicos en todas las células, tanto en la membrana plasmática como en las de los organoides. Son altamente selectivos, de modo que hay canales específicos para cada tipo de ion (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-, etc.). Los más abundantes en la membrana plasmática son los canales para el K^+.

Tabla 3-1. Concentración de los iones principales dentro y fuera de la célula

	Intracelular	*Extracelular*
Na^+	12	145
K^+	140	4
Mg^{2+}	0,5	1,5
Ca^{2+}	< 0,0005	1,5
H^+	pH 7,2	pH 7,4
Cl^-	10	110
HCO_3^-	27	10

El flujo de un ion es impulsado por el gradiente electroquímico resultante, como vimos, de la suma de los gradientes de concentración y de voltaje entre ambos lados de la membrana. En la tabla 3-1 se informan las concentraciones de los principales iones dentro y fuera de la célula. Normalmente, el lado citosólico de la membrana plasmática es electronegativo con respecto al lado exterior, lo cual favorece el ingreso —o dificulta el escape— de los iones con carga positiva. Con los iones negativos se da la situación inversa. Por ejemplo, el gradiente de voltaje se opone a la salida del K^+ de la célula, mientras que el gradiente de concentración la favorece. Cuando estas fuerzas opuestas se equilibran, el gradiente electroquímico es igual a cero y el flujo del ion se detiene.

El potencial de equilibrio de un ion puede calcularse conociendo su concentración en el interior de la célula y en el medio extracelular, mediante la ecuación de Nernst:

$$V = \frac{RT}{zF} - \ln \frac{Ce}{Ci} = 2{,}303 \frac{RT}{zF} - \log \frac{Ce}{Ci},$$

donde V es el potencial de equilibrio (en voltios); R es la constante de los gases (1,987 cal · mol^{-1} · $°K^{-1}$); T es la temperatura absoluta; F, la constante de Faraday (2,3 × 10^{-4} cal · V^{-1}); z, la carga del ion, y Ce y Ci son las concentraciones extracelular e intracelular del ion.

La mayoría de los canales iónicos no están abiertos en forma permanente, pues poseen un dispositivo de apertura y cierre semejante al de una "compuerta", accionado por dos clases de factores (fig. 3-20): algunos canales abren su "compuerta" en respuesta a un cambio en el potencial eléctrico de la membrana y otros cuando les llega una sustancia inductora (ligando) por el lado citosólico o por el lado no citosólico (caps. 11-2 y 11-18). A los primeros se los llama canales **dependientes de voltaje**; a los segundos, canales **dependientes de ligando**. Surge de lo expuesto que para que se produzca el pasaje de un soluto a través de un canal iónico no sólo es necesaria la existencia de un gradiente electroquímico, sino también un estímulo apropiado, el cual, según los casos, corresponde a un cambio en el potencial de membrana o al arribo de una sustancia inductora (ligando).

La estructura de un canal iónico semeja un cilindro hueco que atraviesa a la membrana. Su conducto central se estrecha y se ensancha de forma semejante a un reloj de arena, de modo que posee amplias bocas de acceso y de

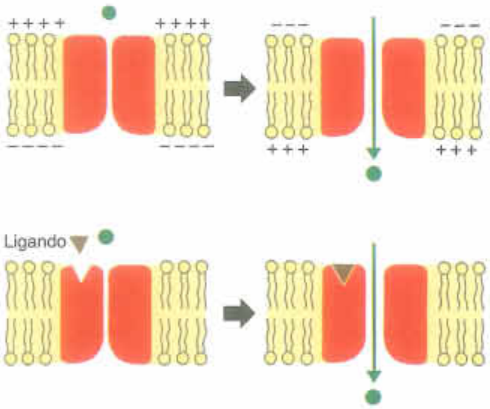


Fig. 3-20. Esquemas que muestran los mecanismos de pasaje de los iones a través de los canales iónicos dependientes de voltaje (**arriba**) y de ligando (**abajo**).

salida. En un punto el conducto alcanza un diámetro muy pequeño; esta zona le da la especificidad al canal, puesto que en ella se produce el reconocimiento del ion según su tamaño y su carga.

La pared del cilindro se forma con varias proteínas transmembranosas, ***cuatro*** en los canales regulados por cambios de voltaje y ***cinco*** en los canales dependientes de ligando (fig. 3-21).

Los canales iónicos mejor estudiados son los de las células nerviosas; incluso se han clonado los genes que codifican sus proteínas y analizado la secuencia de sus nucleótidos. Ello permitió establecer que son estructuras que se han conservado con pocas modificaciones a través de la evolución, ya que existe una notable homología en dichos canales en especies filogenéticamente muy distantes.

3-15. Los ionóforos aumentan la permeabilidad de las membranas biológicas a ciertos iones

Existen sustancias —llamadas **ionóforos**— que tienen la propiedad de incorporarse a las membranas biológicas y aumentar su permeabilidad a diversos iones. Son moléculas de tamaño relativamente pequeño, con una superficie hidrofóbica que les permite insertarse en la bicapa lipídica. Se conocen dos tipos de ionóforos, los transportadores móviles y los formadores de canales. Como los canales iónicos, permiten flujos de iones basados en gradientes electroquímicos.

Los **transportadores móviles** atrapan al ion en un lado de la membrana, lo engloban en el interior de sus moléculas, giran 180° en la bicapa lipídica y lo liberan del otro lado de la membrana (fig. 3-22A). A este grupo pertenece el antibiótico ***valinomicina***, un péptido anular que transfiere K^+. Otro ionóforo de esta clase es el llamado ***A 23187***, que transfiere Ca^{2+} y Mg^{2+}; es utilizado en experimentos en los que se desea incrementar rápidamente la concentración intracelular de Ca^{2+}.

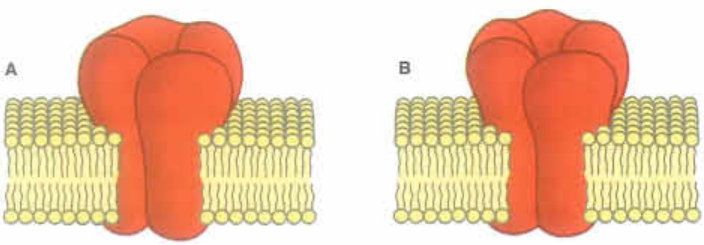


Fig. 3-21. Esquemas tridimensionales de los canales iónicos dependientes de voltaje (**A**) y de ligando (**B**).

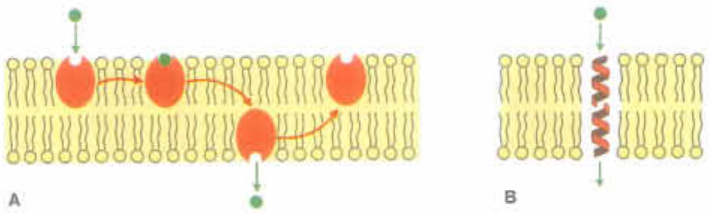


Fig. 3-22. A. Pasaje de iones a través de ionóforos transportadores móviles. **B.** Pasaje de iones a través de ionóforos formadores de canales.

Los ionóforos **formadores de canales** son conductos hidrofóbicos que permiten el pasaje de cationes monovalentes (H^+, Na^+, K^+). A este grupo pertenece la ***gramicidina A***, un antibiótico oligopeptídico compuesto por 15 aminoácidos. Tiene una configuración helicoidal, y el conducto que se halla en el interior de la hélice constituye el poro. Su corta longitud hace necesaria la participación de dos moléculas longitudinalmente alineadas para construir un poro transmembranoso continuo (fig. 3-22B).

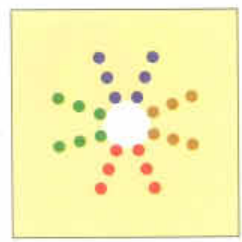
3-16. Las acuaporinas son canales especiales que permiten el paso selectivo del agua

Aunque no se trata de canales iónicos, resulta oportuno analizar aquí un dispositivo molecular que posibilita el pasaje de agua a través de algunas membranas celulares.

En varias clases de células —particularmente los glóbulos rojos y las epiteliales de los plexos coroideos, la vesícula biliar y el túbulo proximal de la nefrona— la membrana plasmática es excepcionalmente permeable al agua, mucho más de lo esperable si su transporte se realizara exclusivamente mediante el mecanismo de difusión simple analizado en la sección 3-12. Ello se debe a la presencia de canales de paso especiales conocidos con el nombre de **acuaporinas**.

Las acuaporinas están constituidas por cuatro proteínas de 28 kDa iguales entre sí (menos una, que está glicosilada), denominadas **CHIP** (por *channel-forming integral protein*), cada una de las cuales se compone de seis α hélices transmembranosas. Como muestra la figura 3-23, en la formación de la pared del canal intervienen solamente las dos α hélices intermedias de cada CHIP. Si bien se sabe que el pasaje de agua a través de las acuaporinas se realiza sin la compañía de iones ni de otro tipo de solutos, no se conocen las bases de esa especificidad.

Fig. 3-23. Acuaporina. Se ilustra un corte transversal que pasa por el plano de la membrana. Obsérvense las cuatro CHIP y el canal acuoso central. Cada punto representa una hélice α transmembranosa.



3-17. Existen distintas clases de permeasas pasivas, involucradas en procesos de monotransporte, cotransporte y contratransporte

Como en los canales iónicos, la pared de las **permeasas** está comúnmente integrada por varias proteínas transmembranosas multipaso. Cada permeasa posee sitios de unión específicos para una o dos clases de solutos, accesibles desde una o desde ambas caras de la bicapa. La fijación del soluto produce un cambio conformacional en la permeasa, merced al cual se transfiere el material hacia el otro lado de la membrana (fig. 3-24).

En esta sección sólo analizaremos a las permeasas que permiten el traspaso pasivo de solutos, correspondiente al mecanismo de difusión facilitada. La aclaración se debe a que la célula posee proteínas transportadoras similares pero conformadas para el traspaso activo de solutos, con gasto de energía (sección 3-18).

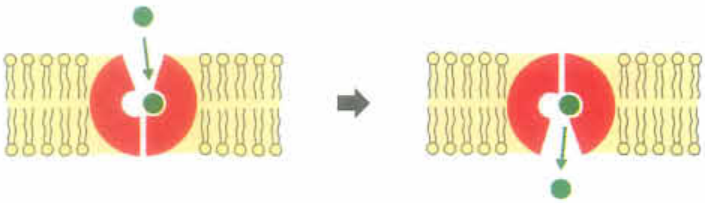


Fig. 3-24. Esquema que representa a una permeasa y el modo como la atraviesan los solutos.

Existen tres clases de permeasas (fig. 3-25): 1) las que transfieren un solo tipo de soluto; esta forma de transferencia se llama **monotransporte** (en inglés, *uniport*); 2) las que transportan dos tipos de solutos simultáneamente, ambos en el mismo sentido; este mecanismo se denomina **cotransporte** (*symport*); 3) las que transfieren dos tipos de solutos en sentidos contrarios; esta clase de transferencia recibe el nombre de **contratransporte** (*antiport*). Debe señalarse que en el cotransporte y en el contratransporte las transferencias de los dos solutos se hallan acopladas obligadamente, es decir, una no se produce sin la otra.

Son ejemplos de difusión facilitada mediante permeasas: 1) el monotransporte de glucosa y el cotransporte de Na^+ y glucosa en la membrana plasmática de las células de la mucosa intestinal (sección 3-21); 2) el contratransporte de Na^+ y H^+ a través de la membrana plasmática de casi todos los tipos de células; 3) el contratransporte de Cl^- y HCO_3^- por una permeasa de la membrana plasmática de los eritrocitos, llamada banda 3 (cap. 5-36); 4) el contratransporte de ADP y ATP por la membrana interna de la mitocondria (cap. 8-16) (fig. 8-10).

3-18. El transporte activo requiere energía

Cuando el transporte de un soluto se realiza en dirección contraria a su gradiente de concentración o de voltaje, sólo es posible ***con gasto de energía***, de ahí que a este tipo de pasaje se lo llame transporte activo.

El transporte activo tiene lugar a través de **permeasas** llamadas bombas, y en este caso también existen formas de monotransporte, cotransporte y contratransporte. Más aún, el transporte activo de solutos presenta las mismas características de especificidad y saturabilidad señaladas para la difusión facilitada, aunque difiere de ésta por realizarse en contra del gradiente del soluto.

Existen innumerables ejemplos de permeasas involucradas en procesos de transporte activo. En las próximas secciones describiremos unas pocas, representativas de la mayoría.

3-19. La bomba de Na^+K^+ es un sistema de contratransporte

Uno de los sistemas de transporte activo más difundidos es el que establece las diferencias en las concentraciones de Na^+ y de K^+ entre el interior de la célula y el líquido extracelular, que por ello es responsable del mantenimiento del potencial eléctrico de la membrana plasmática. Se lo denomina **bomba de Na^+K^+** o **Na^+K^+-ATPasa** y tiene por función expulsar Na^+ al espacio extracelular e introducir K^+ en el citosol (fig. 3-26). Dado que transfiere solutos diferentes en sentidos contrarios, se trata de un sistema de contratransporte.

La bomba de Na^+K^+ es un complejo integrado por cuatro subunidades —dos α y dos β ($\alpha_2\beta_2$)—, que son proteínas integrales de la membrana plas-

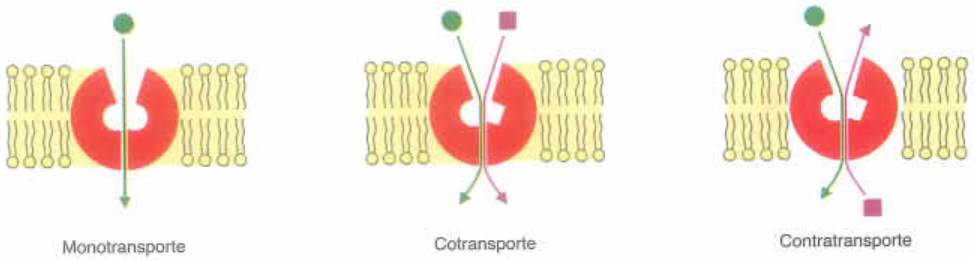


Fig. 3-25. Tipos de permeasas según sean atravesadas por uno o por dos solutos y, en el segundo caso, las direcciones en que lo hacen.

mática. Cada subunidad α posee una masa de alrededor de 100 kDa y atraviesa la membrana unas ocho veces. En cambio, cada subunidad β es una glicoproteína de unos 45 kDa que posee varias cadenas oligosacáridas en el extremo que da a la cara no citosólica de la membrana. Los lípidos de la bicapa vecinos a las cuatro cadenas polipeptídicas influirían en el funcionamiento de la bomba, ya que ésta se inactiva cuando se la aísla y se extraen los lípidos que la acompañan.

Las subunidades α tienen sitios específicos para la fijación del Na^+ en sus extremos citosólicos y sitios reservados para la unión del K^+ en sus extremos externos. Las transferencias de Na^+ hacia el exterior y de K^+ hacia el citosol se hallan acopladas: una no puede realizarse sin la otra. Como consecuencia, el funcionamiento de la bomba provoca el intercambio de Na^+ intracelular por K^+ extracelular; ambos flujos se realizan en contra de sus respectivos gradientes.

El sistema necesita energía, que se obtiene de la hidrólisis del ATP. Para ello, la Na^+K^+-ATPasa cataliza dicha hidrólisis mediante una reacción que requiere la presencia no sólo de Na^+ y de K^+ sino también de Mg^{2+}. El ATP se une a un sitio específico de la subunidad α en la cara citosólica de la membrana y su hidrólisis se halla acoplada al transporte de los iones. Cada ATP que se hidroliza posibilita el transporte de tres Na^+ hacia el espacio extracelular y de dos K^+ hacia el citosol. El resultado del funcionamiento de la bomba puede resumirse mediante esta ecuación:

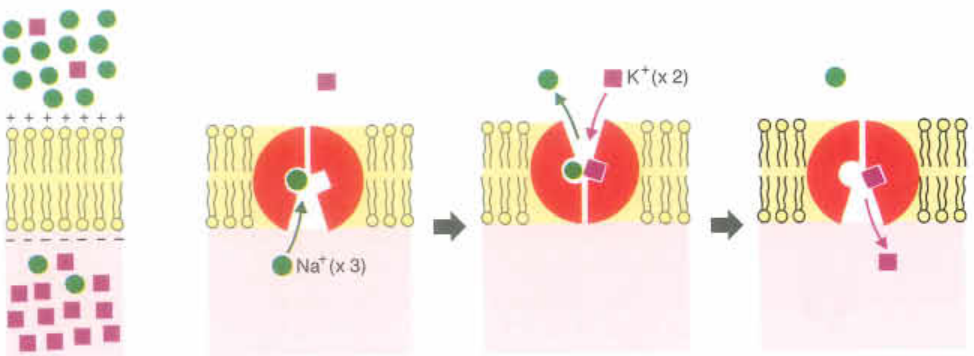
$$3\ Na^+_i + 2\ K^+_e + ATP \rightarrow 3\ Na^+_e + 2\ K^+_i + ADP + P\ ,$$

donde los subíndices *i* y *e* junto a los símbolos Na^+ y K^+ indican "intracelular" y "extracelular", respectivamente.

El sentido del flujo puede revertirse si las concentraciones de Na^+_e y de K^+_i aumentan por encima de ciertos límites y se agrega ADP y P; en este caso

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Fig. 3-26. Na^+K^+-ATPasa o bomba de Na^+K^+.



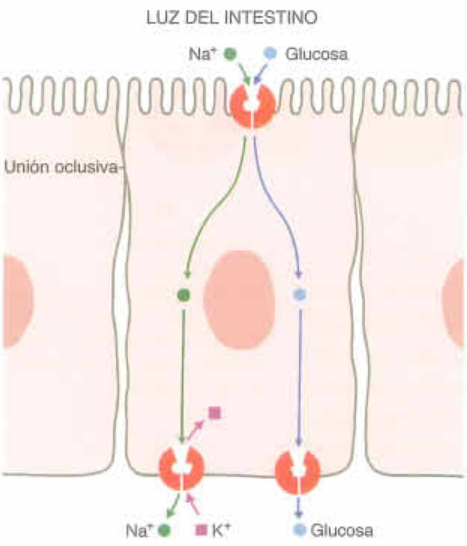


Fig. 3-27. Transporte transcelular de glucosa en el epitelio intestinal. A raíz de la presencia de uniones oclusivas entre las células epiteliales (cap. 6-11), la glucosa debe atravesar las células para llegar a los capilares sanguíneos situados debajo del epitelio. Aunque la glucosa ingresa en la célula en contra de su gradiente, lo hace pasivamente. Ello se debe a que entra junto con el Na^+ a través de una permeasa cotransportadora pasiva. Sin embargo, este transporte de glucosa insume energía, ya que el Na^+ debe ser expulsado hacia la matriz extracelular por el lado opuesto de la célula mediante una permeasa activa, la bomba de Na^+K^+.

la Na^+K^+-ATPasa actúa como una ATP sintasa. No obstante, normalmente la bomba actúa de acuerdo con la ecuación antedicha: expele tres Na^+ por cada dos K^+ que ingresan (fig. 3-26). Ello crea la diferencia de voltaje (o el potencial eléctrico) que existe entre ambos lados de la membrana plasmática, donde el lado citosólico es normalmente electronegativo con respecto al lado extracelular (fig. 3-26). A las bombas que generan potenciales eléctricos de membrana se las define como ***electrogénicas***.

Durante su funcionamiento, la Na^+K^+-ATPasa atraviesa ciclos de fosforilación y desfosforilación que determinan cambios alternados en su forma. De los mecanismos propuestos para explicar cómo actúa la bomba, el que más se ajusta a los resultados experimentales es el siguiente:

1) En las subunidades α existen sitios de alta afinidad para tres Na^+, un ATP y un Mg^{2+}, fácilmente accesibles desde la superficie citosólica de la membrana plasmática. Cuando se produce la hidrólisis del ATP, se libera el ADP y el tercer fosfato es transferido a un ácido aspártico de una de las subunidades α, lo cual propicia la fijación de tres Na^+ en el interior del transportador.

2) Pronto se produce un cambio conformacional en la estructura de la permeasa. Como resultado, los Na^+ quedan expuestos hacia el lado exterior de la célula. Además disminuye su afinidad por las subunidades α, por lo que los Na^+ son liberados en el medio extracelular.

3) Entre tanto, dos K^+ del líquido extracelular se unen a la permeasa y se fijan en sus sitios en las subunidades α. Esta unión provoca la liberación del fosfato ligado al transportador.

4) Tal desfosforilación hace que el transportador recupere su configuración original, por lo cual los K^+ quedan expuestos hacia el interior de la célula. Dado que además disminuye su afinidad por las subunidades α, estos iones ingresan en el citosol, lo cual completa el ciclo.

3-20. Algunos fármacos cardiotónicos inhiben la bomba de Na^+K^+

La Na^+K^+-ATPasa es inhibida por fármacos del tipo de la ***ouabaína*** y la ***digitoxina*** —ampliamente utilizados como cardiotónicos—, los cuales bloquean el contratransporte de Na^+ y K^+ en concentraciones de 10^{-5} M. Estas sustancias actúan en la superficie de las células uniéndose a los sitios de las subunidades α reservados para los K^+. La inhibición de la bomba de Na^+K^+ se debe a que los cardiotónicos, al competir con el K^+, impiden la liberación del fosfato ligado a la subunidad α del transportador. Como consecuencia, el sistema se bloquea y disminuye la salida de Na^+ al medio extracelular. Esto hace caer el rendimiento de un contratransportador pasivo —el de Na^+ y Ca^{2+}—, mediante el cual ingresa Na^+ en la célula y sale Ca^{2+}. Dada la menor oferta de Na^+ desde el líquido extracelular, se inhibe su intercambio con el Ca^{2+}, que se retiene en el citosol. La mayor concentración de Ca^{2+} citosólico hace contraer a las células musculares cardíacas con más fuerza (caps. 5-33 y 5-34).

3-21. Diversos transportadores pasivos, aunque ajenos a la bomba de Na^+K^+, funcionan bajo su dependencia

La dependencia del contratransportador de Na^+ y Ca^{2+} de la actividad de la bomba de Na^+K^+ es sólo un ejemplo de los muchos que existen durante el funcionamiento normal de la célula. En efecto, una amplia variedad de transportadores son impulsados por el gradiente de Na^+ generado por esa bomba, el cual "arrastra" a los demás. En consecuencia, si la bomba de Na^+K^+ se detiene, los transportadores pasivos que dependen de ella dejan de funcionar.

El transportador de glucosa y el cotransportador de Na^+ y glucosa, responsables del transporte transcelular del monosacárido a través del epitelio de la mucosa intestinal, son otros ejemplos representativos de transporte acoplado al funcionamiento de la bomba de Na^+K^+ (fig. 3-27).

También lo es el contratransporte de Na^+ y H^+. El Na^+ ingresa en el citosol a favor de su gradiente y se intercambia por H^+, que es expulsado de la célula. Este mecanismo tiene gran importancia en la regulación del pH intracelular y se halla presente en casi todos los tipos celulares.

3-22. Una bomba de K^+H^+ es responsable de la formación del HCl gástrico

En la membrana plasmática de las células parietales de la mucosa gástrica existe una **bomba de K^+H^+** cuya estructura no es bien conocida. Da lugar al contratransporte de K^+ y H^+ con gasto de energía. Hace que se incrementen los niveles de K^+ en el citosol y permite que se alcancen elevadas concentraciones de H^+ en la secreción gástrica. Secundariamente, el gradiente electroquímico del K^+ determina su salida pasiva desde la célula a la cavidad estomacal. Ella es acompañada por la salida de Cl^-, que en la luz del estómago se une al H^+ y forma HCl (fig. 3-28). Como puede verse, la formación de HCl en el jugo gástrico depende de la actividad de la bomba de K^+H^+.

El K^+ y el Cl^- salen de la célula por sendas permeasas monotransportadoras. El Cl^- proviene de la sangre e ingresa en la célula por el lado opuesto del epitelio gástrico a través de un contratransportador pasivo de Cl^- y HCO_3^- similar al de los eritrocitos (sección 3-17).

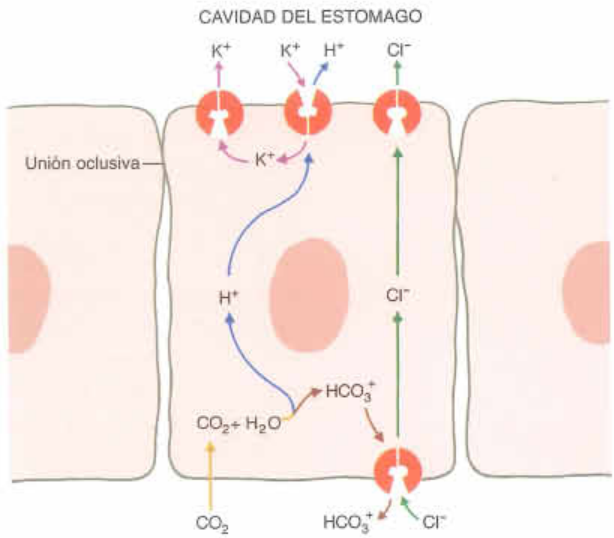


Fig. 3-28. Formación del HCl en la cavidad estomacal. Obsérvense las uniones oclusivas, el transporte transcelular de Cl^- y de qué manera la actividad de la bomba de K^+H^+ se combina con las funciones de los otros transportadores.

3-23. Distintas bombas de Ca^{2+} mantienen la concentración del ion en el citosol en niveles muy bajos

La concentración de Ca^{2+} en el citosol se mantiene en niveles bajísimos (más de 1.000 veces menores que los existentes en la matriz extracelular) debido a que existe un sistema que lo expulsa. Así, tanto en la membrana plasmática como en la membrana del retículo endoplasmático (o del retículo sarcoplasmático, en la célula muscular) existen **bombas de Ca^{2+}** que transfieren el catión desde el citosol hacia el espacio extracelular y hacia el interior del citado retículo, respectivamente. La bomba de Ca^{2+} posee sitios específicos

de alta afinidad para el Ca^{2+} en la cara citosólica de ambas membranas. Al igual que la bomba de Na^+K^+, la bomba de Ca^{2+} requiere Mg^{2+} y energía, que toma del ATP.

3-24. Una bomba de H^+ disminuye el pH de los endosomas y los lisosomas

Una alta concentración de H^+ en el interior de los endosomas y los lisosomas es crucial para la activación de sus enzimas hidrolíticas, las cuales se hallan en condiciones de actuar sólo cuando el pH en esos organoides se reduce, respectivamente, a 6,0 y a 5,0 (cap. 7-33). El transporte de H^+ desde el citosol al interior del endosoma y del lisosoma es un proceso activo que depende de una **bomba de H^+** (o **bomba protónica**) presente en la membrana de ambos organoides (caps. 7-28, 7-30, 7-31 y 7-33) (figs. 7-22 y 7-24).

3-25. Existen dos tipos de transporte de H^+ en la mitocondria, uno activo y otro pasivo

El traslado de H^+ a través de la membrana interna de la mitocondria durante el avance de los electrones por la cadena respiratoria es otro ejemplo de transporte activo, aunque en él la energía no es provista por el ATP sino por el citado recorrido electrónico (cap. 8-15).

El gradiente electroquímico que se crea entre ambos lados de la membrana mitocondrial interna es utilizado para sintetizar ATP, al retornar los H^+ a la matriz mitocondrial a través de un transportador pasivo asociado a la ATP sintasa (figs. 8-10 y 8-12).

3-26. Las MDR son transportadores que confieren a las células resistencia a ciertas drogas

Las proteínas **MDR** (por *multidrug resistance*) pertenecen a una familia de transportadores activos que se identifican con la sigla **ABC** (por *ATP-binding cassette*) porque poseen un par de dominios o "casetes" con actividad ATPasa. Esta hidroliza el ATP que provee la energía necesaria para movilizar a determinados solutos en contra de sus gradientes.

Los transportadores ABC se encuentran normalmente en las membranas de muchos tipos celulares. Han sido identificados en la membrana plasmática, en la del retículo endoplasmático, en la del peroxisoma y en la membrana mitocondrial interna. Algunos de esos transportadores tienen por función eliminar sustancias tóxicas derivadas del metabolismo celular normal. En cambio, otros permiten el paso de moléculas de tamaño mayor que el esperado, como polipéptidos pequeños (caps. 7-14 y 7-24).

A veces, ciertos tipos de transportadores ABC aparecen en gran número en la membrana plasmática de varias clases de células cancerosas, a las que les confieren una indeseada resistencia contra algunas drogas citotóxicas. Ello es debido a que las MDR bombean a esas drogas fuera de las células cancerosas, lo que hace que éstas se vuelvan resistentes a la quimioterapia.

Por otro lado, se ha observado un aumento similar de proteínas MDR en la membrana plasmática de los linfocitos infectados por el *virus tipo I de la inmunodeficiencia adquirida* (HIV-1), lo que contribuiría a su resistencia a drogas antivirales como la ***AZT***.

También se produce un incremento de proteínas MDR en la membrana plasmática de las células de algunos parásitos, que por tal motivo se hacen resistentes a las drogas antiparasitarias. Por ejemplo, la *Leishmania* (agente de la leishmaniasis) puede desarrollar resistencia al ***antimonio*** y a otros compuestos, mientras que el *Plasmodium falciparum* (agente de la malaria) suele hacer lo propio con la ***cloroquina***, la ***halofantrina***, la ***primaquina*** y la ***mefloquina***. Como en los casos anteriores, aquí también las MDR bombean las drogas fuera de las células, lo que anula su poder terapéutico.

3-27. En la fibrosis quística se halla alterado un canal iónico para el Cl^-

La fibrosis quística es un grave desorden causado por la producción de secreciones muy viscosas que obstruyen la luz de los bronquios, los conductos de varias glándulas (como el páncreas), el tubo intestinal, etc. Se manifiesta en individuos homocigotos que poseen mutado el gen codificador de la proteína **CFTR** (por *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que en algunas células epiteliales se comporta como una permeasa y en otras como un canal iónico dependiente de ligando. La proteína CFTR se halla involucrada en el transporte de Cl^- a través de la membrana plasmática, y cuando es defectuosa el mecanismo que lleva a la fibrosis quística es el siguiente. Dado que el transporte de Cl^- a través de la CFTR se bloquea, disminuye el anión en la luz de los conductos afectados y, por consecuencia, disminuye también el catión Na^+ (fig. 3-29). Finalmente, la menor concentración de estos iones determina que el agua se retire y ello aumenta la viscosidad de las secreciones.

Debido a que la CFTR pertenece a la familia de transportadores **ABC**, resulta llamativo que en algunas células no actúe como una permeasa activa sino como un canal iónico dependiente de ligando, que como se sabe es pasivo. En esas células, una quinasa activada por el AMP cíclico (cap. 11-15) controla la apertura del canal iónico y, por ende, el paso del Cl^- a favor de su gradiente electroquímico.

LA MEMBRANA PLASMATICA Y LA PARED DE LA CELULA VEGETAL

3-28. La membrana plasmática de la célula vegetal se halla rodeada por una especie de exoesqueleto

Las células de las plantas son similares a las de los animales, aunque presentan algunas diferencias (figs. 1-6 y 1-7). Por ejemplo, la célula vegetal posee una gruesa **pared celular** que envuelve a la membrana plasmática, como si se tratara de un exoesqueleto.

Además de darle protección y sostén mecánico a la célula y determinar su forma, dicha pared participa en el mantenimiento del balance entre la presión osmótica intracelular y la tendencia del agua a penetrar en el citosol.

También el crecimiento y la diferenciación de las células vegetales dependen en gran medida de la organización de la pared celular. Así, a partir de ésta se produce la diferenciación de las células del ***cámbium***, de los vasos cribosos del ***floema*** (los cuales sirven para el transporte de material desde las hojas) y de los vasos del ***xilema*** (que se lignifican).

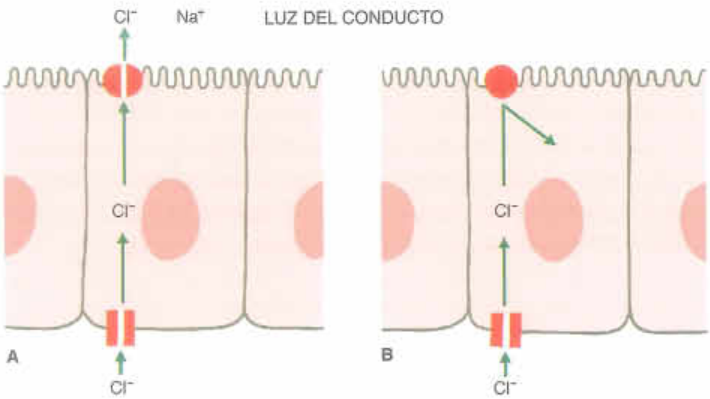


Fig. 3-29. A. Transporte de Cl^- a través de la proteína CFTR, situada en la membrana plasmática que da a la luz del conducto. **B.** Bloqueo del pasaje de Cl^- a consecuencia de un defecto en la CFTR.

3-29. La pared celular contiene un reticulo microfibrilar

La estructura de la pared celular puede ser comparada con la de un plástico reforzado con fibras de vidrio, ya que está constituida por un retículo microfibrilar incluido en una matriz de moléculas unidas entre sí.

Las microfibrillas de la pared celular están compuestas principalmente por celulosa, el producto más abundante en la Tierra. Se trata de cadenas rectas de polisacáridos formados por unidades de glucosa, ligadas por enlaces β1-4 (fig. 3-30). Estas son las cadenas de **glucano**, que mediante uniones de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares producen la unidad estructural o **microfibrilla**, la cual tiene 25 nm de diámetro y está compuesta por casi 2.000 cadenas de glucano. Las microfibrillas de celulosa se asocian entre sí y componen un enrejado semicristalino, que se combina con proteínas y con polisacáridos no celulósicos para formar la pared celular.

La matriz de la pared celular contiene algunos polisacáridos y lignina, el principal componente de la madera. Los polisacáridos más importantes son: 1) sustancias pécticas solubles en agua, que contienen galactosa, arabinosa y ácido galacturónico, y 2) hemicelulosas, compuestas por glucosa, xilosa, manosa y ácido glucurónico. La lignina se encuentra sólo en las paredes de las células maduras y está formada por un compuesto aromático derivado de la polimerización de fenoles.

Algunas paredes celulares pueden tener sustancias cuticulares (ceras) y depósitos minerales, como silicatos y carbonatos de sodio y de magnesio. En los hongos y las levaduras la matriz de la pared celular contiene quitina, un polímero de la glucosamina.

3-30. La pared celular se compone de una pared primaria y una secundaria

La pared celular es bastante compleja y en algunos vegetales se halla muy diferenciada. Suele contener dos componentes —la pared primaria y la pared secundaria—, los cuales se desarrollan secuencialmente y se distinguen por la composición de sus matrices y por la disposición de sus microfibrillas.

La **pared primaria** comienza a formarse con la división celular, a partir de una estructura llamada **placa celular**, que aparece durante la telofase en el plano ecuatorial entre las futuras células hijas (cap. 18-21). La placa está compuesta por vesículas del complejo de Golgi que se alinean en el plano

ecuatorial de la célula y forman el primer rudimento o capa intermedia de la futura pared celular. Esta capa sólo contiene pectina, un compuesto amorfo que posee ácido galacturónico.

Posteriormente, cada célula hija deposita otras capas, compuestas por pectina, hemicelulosa y un retículo laxo de microfibrillas celulósicas orientadas transversalmente con respecto al eje mayor de la célula, cuyo conjunto constituye la citada pared primaria.

Sólo cuando la célula alcanza su madurez aparece la **pared secundaria**, que comprende materiales agregados sobre la superficie interna de la pared primaria, sea como espesamientos localizados (vasos del xilema) o como un espesamiento homogéneo (tubos cribosos del floema). En ambos casos la pared secundaria queda formada por celulosa, hemicelulosa y escasas sustancias pécticas.

La diferenciación ulterior del xilema se produce por la infiltración de lignina en los espesamientos localizados. En este caso, el polímero reemplaza al agua e infiltra a la matriz y a las microfibrillas celulósicas. Cuando la pared se lignifica, la célula vegetal muere.

3-31. Los componentes de la pared celular se originan en el complejo de Golgi o en relación con la membrana plasmática

Se han descrito dos vías principales para la biogénesis de la celulosa y de otros componentes de la pared celular. Una comprende al complejo de Golgi (cap. 7-44) y la otra está asociada con la membrana plasmática.

La intervención del complejo de Golgi es evidente en ciertas algas cuyas paredes están formadas por escamas. Estas tienen un material amorfo y un retículo microfibrilar radial asociado con otro espiral. Las membranas del complejo de Golgi polimerizan cadenas de glucosa para formar microfibrillas de celulosa por medio de glucosiltransferasas. Luego las microfibrillas se organizan en escamas y se liberan en la superficie.

La membrana plasmática es el sitio más frecuente para la síntesis de la celulosa. Ello no descarta las funciones esenciales que desempeñan el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi, ya que las glucosiltransferasas son sintetizadas en ribosomas asociados a dicho retículo, pasan al complejo de Golgi y de ahí a la membrana plasmática, donde se produce la síntesis de las microfibrillas celulósicas.

Antes se señaló que en los hongos y en las levaduras la pared celular se compone principalmente de quitina. Este polisacárido es sintetizado por la enzima quitina sintetasa en presencia de UDP-acetilglucosamina. La enzima

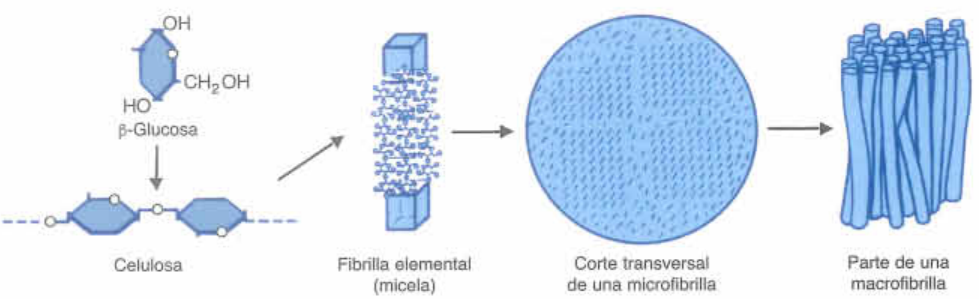


Fig. 3-30. Elementos estructurales de la celulosa en sus sucesivos niveles de organización. (De D. K. Mühlethaler.)

es activada por proteólisis y por la luz, que acelera la síntesis de quitina. Se ha encontrado quitina transferasa en los **quitisomas**, unos organoides vesiculares de 40 a 70 nm de diámetro que parecen ser los vehículos que entregan la enzima a los sitios de síntesis en la superficie celular.

BIBLIOGRAFIA

Al-Awqati Q. (1995) Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. Science 269:805.

Carafoli E. (1992) The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. J. Biol. Chem. 267:2115.

Chen Y., Lagerholm B.C. and Jacobson K. (2006) Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. Methods 39:147.

Chrispeels M.J. and Agre P. (1994) Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. TIBS 19:421.

Cleves A.E. and Kelly R.B. (1996) Protein translocation: rehearsing the ABCs. Curr. Biol 6:276.

Dean M. and Allikmets R. (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:779.

Gadsby D.C., Vergani P. and Csanady L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure cause cystic fibrosis. Nature 440:477.

Gouaux E. and MacKinnon R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. Science 310:1461.

Groot B. and Grubmüller H. (2001) Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics aquaporin-1 and GlpF. Science 294:2353.

Gupta S. and Gollapudi S. (1993) P-glycoprotein (MDR1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1). J. Clin. Immunol. 13:289.

Jacobson K., Sheets E.D. and Simson R. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. Science 268:1441.

King L.S., Kozono D. and Agre P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5:687.

Lipowsky R. (1995) The morphology of lipid membranes. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:531.

McConnell H.M. and Radhakrishnan A. (2003) Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 1610:159.

Montal M. (1995) Molecular mimicry in channel-protein structure. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:501.

Monteith G.R. and Roufogalis B.D. (1995) The plasma membrane calcium pump. A physiological perspective on its regulation. Cell Calcium 18:459.

Nielsen S., Smith B.L., Christensen E.I. and Agre P. (1993) Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7275.

Parisi M. et al. (1995) Water pathways across a reconstituted epithelial barrier formed by Caco-2 cells: Effects of medium hypertonicity. J. Memb. Biol. 143:237.

Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B. and Agre P. (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. J. Biol. Chem. 268:17.

Reithmeier R.A.F. (1995) Characterization and modeling of membrane proteins using sequence analysis. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:491.

van Os C., Deen P.M.T. and Dempster J.A. (1994) Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. Biochem. Biophys. Acta 1197:291.

Citosol 4

4-1. Introducción

En el capítulo 1-3 se vio que las células eucariotas poseen algunas semejanzas con las procariotas. Así, el **citosol** —o **matriz citoplasmática**— de la célula eucariota contiene muchos de los componentes que se encuentran en el protoplasma de la bacteria, por ejemplo, complejos enzimáticos de diverso orden y moléculas de ARN ribosómico, mensajero y de transferencia. Las diferencias entre ambos tipos celulares están dadas por la presencia en la célula eucariota de varias estructuras singulares, como el núcleo, el citoesqueleto, los organoides que integran el sistema de endomembranas, las mitocondrias, los cloroplastos (en la célula vegetal) y los peroxisomas.

La célula eucariota se halla dividida en numerosos **compartimientos**, entre los cuales sobresale el núcleo. La parte de la célula que no corresponde al núcleo —es decir, el citoplasma— puede ser subdividida esquemáticamente en dos espacios, el correspondiente al citosol y el encerrado en el interior de los organoides. En este esquema, el citosol es considerado como el verdadero medio interno celular, que se extiende desde la envoltura nuclear hasta la membrana plasmática y que llena el espacio no ocupado por el sistema de endomembranas, las mitocondrias y los peroxisomas (fig. 1-6).

En promedio, el citosol representa el 50% del volumen del citoplasma, cifra que aumenta en las células embrionarias y en las menos diferenciadas.

El pH del citosol es de 7,2.

4-2. El citosol contiene componentes muy variados

Mediante la técnica del fraccionamiento celular descrita en el capítulo 23-28, se obtiene —además de las fracciones nuclear, mitocondrial y microsómica— una fracción fluida sobrenadante que contiene los componentes citosólicos.

En ella se detectan los elementos del citoesqueleto —incluido el centrosoma con los centríolos—, un gran número de enzimas (por ejemplo, las que intervienen en la glucólisis), la mayoría de las moléculas que conducen señales dentro de la célula, los elementos que dirigen la síntesis de las proteínas celulares y extracelulares (es decir, los ribosomas, los ARN mensajeros y los ARN de transferencia), las chaperonas, los proteasomas, las inclusiones, etcétera.

4-3. El citosol suele contener inclusiones

Cuando se acumulan en el citosol en grandes cantidades, ciertas macromoléculas forman estructuras detectables con el microscopio —denominadas **inclusiones**— que carecen de membrana.

Por ejemplo, tanto en los hepatocitos como en las células musculares estriadas es común la presencia en el citosol de **gránulos de glucógeno** (figs. 1-11 y 4-1). Se llaman **glicosomas**, miden entre 50 y 200 nm y están compuestos por subpartículas de 20 a 30 nm de diámetro. Es preciso señalar que en las imágenes ultramicroscópicas los glicosomas no corresponden directamente al glucógeno; representan a las proteínas enzimáticas que intervienen en la síntesis y en la degradación del polisacárido, cuya molécula no toma los colorantes electrónicos de uso corriente. Los gránulos de glucógeno constituyen depósitos de energía para las células; ello es claramente visible en la célula muscular, en la que los gránulos desaparecen durante las contracciones debido a la glucogenólisis producida para proveer glucosa. Existen enfermedades congénitas producidas por mutaciones de los genes que codifican a las enzimas que regulan la síntesis y la degradación del glucógeno, conocidas como ***glucogenosis***. En ellas las células muestran una acumulación excesiva de inclusiones de glucógeno o formas anormales del polisacárido.

Diversos tipos de células contienen **gotitas de grasa** (triacilgliceroles) en el citosol, que también constituyen reservas de energía. Son muy comunes en los hepatocitos y en las células musculares estriadas. En las células musculares las inclusiones de grasa se localizan cerca de las mitocondrias, hacia las cuales se dirigen los ácidos grasos de los triacilgliceroles para su oxidación (cap. 8-8). Las células llamadas adipocitos contienen una gran gota de grasa —con numerosas gotitas a su alrededor— que ocupa casi todo el citosol (fig. 1-8).

En el citosol de las células secretoras de la glándula mamaria en actividad

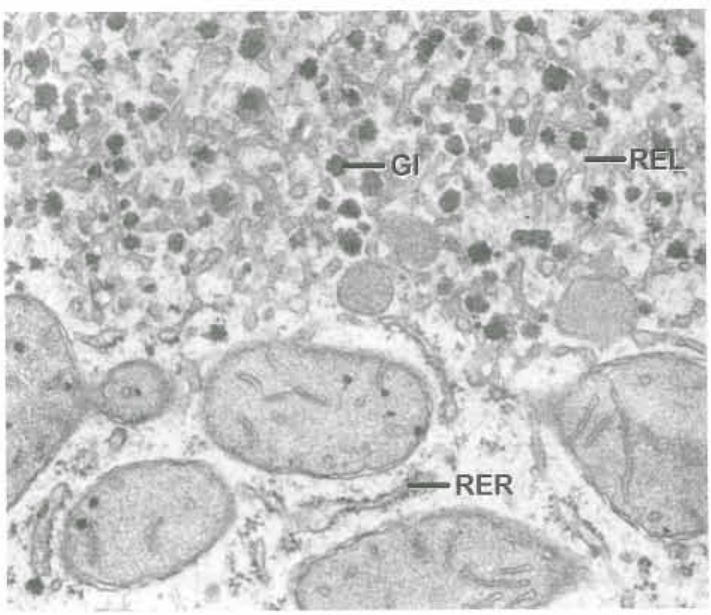


Fig. 4-1. Micrografía electrónica de un sector del citoplasma de la célula hepática. En el citosol vecino al retículo endoplasmático liso (*REL*) se distinguen numerosos gránulos de glucógeno (*GI*). Obsérvese el retículo endoplasmático rugoso (*RER*). 45.000×. (Cortesía de G. E. Palade.)

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

se generan gotas de grasa que se convierten en elementos importantes de la leche. Durante la secreción mamaria, cada gota sale de la célula envuelta por una fina capa de citosol rodeada por una fracción de la membrana plasmática (***secreción apocrina***) (fig. 4-2).

En algunos tipos celulares el citosol contiene **pigmentos** (sustancias con color propio) que se elaboran en la misma célula o provienen del exterior. El más difundido es la ***lipofuscina***, de color marrón, compuesto por fosfolípidos combinados con proteínas. Debido a que aumenta con la edad, se lo conoce como ***pigmento de desgaste*** (cap. 7-33).

Finalmente, en el citosol de algunas células hay **cristales** de proteínas, de significado por lo general desconocido.

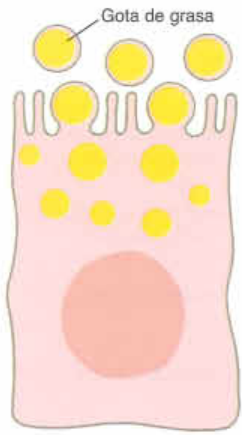


Fig. 4-2. Esquema de una célula mamaria activa, con numerosas gotas de grasa en el citosol. Obsérvese la salida de las gotas de grasa por secreción apocrina.

4-4. En el citosol los ribosomas sintetizan proteínas

La síntesis de las proteínas celulares tiene lugar en los **ribosomas**, de cuyo estudio nos ocuparemos en el capítulo 16. Se trata de estructuras ribonucleoproteicas muy complejas, la mayoría de las cuales se localizan en el citosol (en los capítulos 8-11 y 9-15 se verá que también existen ribosomas en las mitocondrias y los cloroplastos).

Solamente una parte de las proteínas que se sintetizan en los ribosomas citosólicos permanece en el citosol, ya que las restantes emigran hacia el núcleo, el sistema de endomembranas, las mitocondrias y los peroxisomas (fig. 4-3).

Como es lógico, para que las proteínas puedan llegar a esos destinos se requiere de un sistema de señales específicas que sean capaces de discriminarlos, a fin de asegurar la llegada de cada proteína al lugar que le corresponde. Tales señales se encuentran en las mismas moléculas proteicas y consisten en una o varias secuencias de unos pocos aminoácidos, denominadas **péptidos señal** y **señales de anclaje** (cap. 7-12).

Según cuál sea el destino de la proteína que emerge del ribosoma, esas secuencias se localizan en el extremo amino, en el extremo carboxilo o en uno o más puntos intermedios de la cadena proteica. La tabla 4-1 informa sobre las señales más comunes halladas en las proteínas que se dirigen al núcleo, al sistema de endomembranas, a las mitocondrias y a los peroxisomas. Naturalmente, las proteínas que no emigran y se radican en el citosol no necesitan ningún tipo de señal.

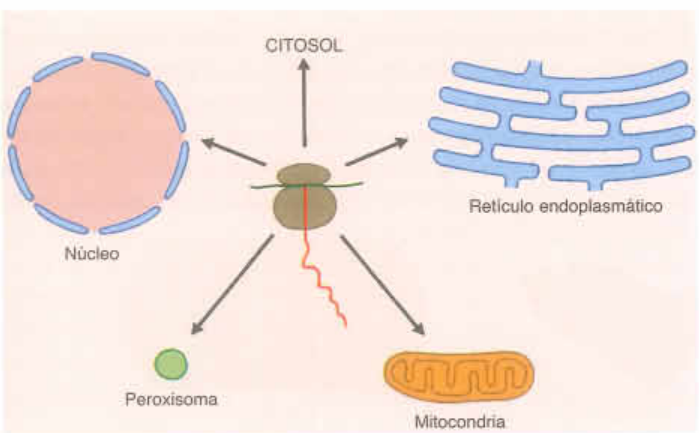


Fig. 4-3. Destinos de las proteínas sintetizadas en los ribosomas citosólicos.

Tabla 4-1. Ejemplos de péptidos señal y señales de anclaje

Péptido señal para el retículo endoplasmático	$^{+}H_3N$–Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln———– $-COO^-$
Señal de anclaje para el retículo endoplasmático	$^{+}H_3N$– ———Lys-Ile-Ile-Thr-Ile-Gly-Ser-Ile-Cys-Met-Val-Val-Gly-Ile-Ile-Ser-Leu-Ile-Leu-Gln-Ile-Gly-Asn-Ile-Ile-Ser-Ile-Trp-Ile-Ser-His———– $-COO^-$
Péptido señal para el núcleo	$^{+}H_3N$– ———Lys-Arg-Pro-Ala-Ala-Ile-Lys-Lys-Ala-Gly-Gln-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys———– $-COO^-$
Péptido señal para la mitocondria	$^{+}H_3N$–Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu———– $-COO^-$
Péptido señal para el peroxisoma	$^{+}H_3N$– ———Ser-Lys-Leu–COO^-

4-5. Las chaperonas asisten a las proteínas para su oportuno y adecuado plegamiento

Si bien las proteínas adoptan formas tridimensionales que dependen de la secuencia lineal de los aminoácidos que las componen (cap. 2-9), no siempre se pliegan correctamente. Para que sus plegamientos sean correctos se necesita, entre otros requisitos, que se produzcan en el lugar adecuado y en el momento oportuno, lo cual se logra por la intervención de unas estructuras llamadas **chaperonas**, que se designan así porque acompañan a las proteínas y —sin ejercer acciones directas sobre ellas— previenen sus plegamientos prematuros y cuidan que sean correctos.

Existen tres familias de chaperonas, denominadas **hsp60**, **hsp70** y **hsp90** (por *heat shock protein*). La sigla hsp se debe a que en las células sometidas a golpes de calor se pierde el plegamiento de las proteínas (se desnaturalizan) y aumenta considerablemente el número de las chaperonas, las cuales asisten a las proteínas desnaturalizadas para que vuelvan a plegarse. El número que acompaña a la sigla hsp corresponde al peso molecular de la primera chaperona descubierta en cada grupo.

Las chaperonas hsp70 son monoméricas y poseen un surco en el que cabe sólo una parte de la proteína asistida, de manera que se necesitan varias chaperonas hsp70 para cada proteína (fig. 4-4). En cambio, las chaperonas hsp60 son poliméricas y están integradas por 14 o 18 polipéptidos denominados **chaperoninas**, los cuales componen una estructura cilíndrica en torno a un espacio central, adonde ingresa la proteína que va a ser asistida (fig. 4-4).

Para ejemplificar cómo actúan las chaperonas hsp70 y hsp60 analizaremos sus efectos sobre las proteínas del citosol. A medida que emana del ribo-

Fig. 4-4. Esquemas de las chaperonas hsp70 y hsp60. El mecanismo de acción de la chaperona hsp90 se ilustra en la figura 11-3.

soma, cada proteína citosólica se asocia con sucesivas chaperonas hsp70, cuya función es prevenir el plegamiento prematuro —a menudo errado— de los tramos proteicos que van saliendo del ribosoma. Además evitan que la proteína naciente se combine con moléculas inapropiadas. Cuando la proteína termina de sintetizarse, se desprende del ribosoma y de las chaperonas hsp70, concluye su plegamiento y se instala en el citosol. No obstante, si algunas de sus partes no se plegaron o lo hicieron mal, ingresa temporalmente en una chaperona hsp60, dentro de la cual —aislada de los demás componentes citosólicos— termina de plegarse o deshace su plegamiento incorrecto y se pliega de nuevo, tratando de hacerlo sin errores.

Las proteínas destinadas al sistema de endomembranas, a diferencia de las citosólicas, debido a que a medida que salen del ribosoma ingresan en el retículo endoplasmático, se pliegan en la cavidad de este organoide, que cuenta con chaperonas hsp70 (cap. 7-12).

Respecto de las proteínas destinadas a las mitocondrias, desde que salen del ribosoma son asistidas por chaperonas hsp70 citosólicas, las cuales las mantienen desplegadas hasta que llegan a su paradero. En el capítulo 8-28 se verá que se pliegan después que se incorporan a las mitocondrias, en cuya matriz hay chaperonas hsp70 y hsp60.

Opuestamente, las proteínas destinadas a los peroxisomas los abordan después de haberse plegado en el citosol (cap. 10-5), de lo cual se deduce que se pliegan con la asistencia de chaperonas hsp70 y hsp60 citosólicas y que los peroxisomas carecen de chaperonas.

Lo mismo ocurre con las proteínas destinadas al núcleo, que tampoco posee chaperonas. En el capítulo 12-4 se analizará cómo estas proteínas —plegadas en el citosol— atraviesan los poros de la envoltura nuclear, y en el capítulo 11-6 se verá que algunas lo hacen asociadas a chaperonas de la familia hsp90.

Debe agregarse que las chaperonas consumen energía derivada del ATP y que pueden ser reutilizadas apenas concluyen sus funciones.

4-6. En el citosol los proteasomas degradan a las proteínas que deben desaparecer

En el citosol existen estructuras que desempeñan funciones opuestas a las de los ribosomas, ya que destruyen a las proteínas. Así, cuando una proteína debe desaparecer —porque se ha plegado mal, se ha dañado o su función ha concluido—, es degradada por un complejo enzimático de unos 700 kDa llamado **proteasoma**.

El proteasoma es de forma cilíndrica y se compone de varias proteasas dispuestas en torno a una cavidad central, adonde ingresa la proteína que va a ser degradada (fig. 4-5). Su estructura es más compleja, ya que junto a cada extremo del cilindro se halla un "casquete" proteico integrado por alrededor de 20 polipéptidos reguladores.

Para poder ingresar en el proteasoma, las proteínas destinadas a desaparecer deben ser previamente "marcadas" por un conjunto de polipéptidos citosólicos iguales entre sí, de 76 aminoácidos cada uno, llamados **ubiquitinas**. En la figura 4-5 se resume el ciclo seguido por estas moléculas. La primera ubiquitina es activada por la enzima **E1**, que la transfiere a la enzima **E2**. A continuación, con la ayuda de la ligasa **E3**, el complejo ubiquitina-E2 se une

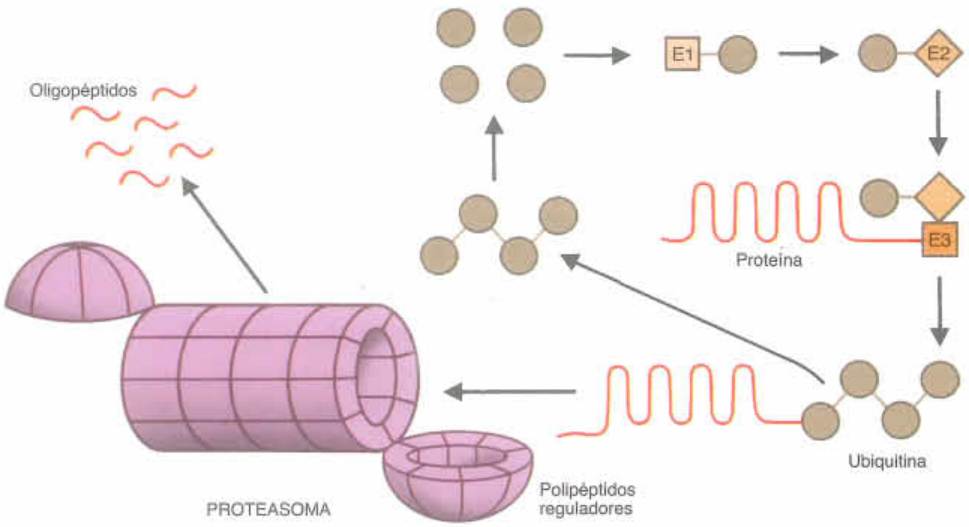


Fig. 4-5. Degradación de proteínas en el proteasoma.

a la proteína que debe degradarse. Puesto que el proceso de transferencia entre las enzimas E1 y E2 se repite varias veces, la proteína queda conectada con una corta cadena de ubiquitinas.

De inmediato este complejo es reconocido por los polipéptidos reguladores de uno de los casquetes, los cuales separan a las ubiquitinas, deshacen el plegamiento de la proteína y la introducen en la cavidad del proteasoma, donde es degradada por las proteasas. Se originan oligopéptidos cortos, los cuales salen del proteasoma y se vuelcan en el citosol.

El proceso descrito consume energía. Esta es cedida por moléculas de ATP, de cuya hidrólisis se encargan seis ATPasas situadas en los casquetes del proteasoma.

Cuando finaliza la degradación de la proteína, el proteasoma y las ubiquitinas quedan disponibles para su reutilización.

BIBLIOGRAFIA

Clarke A.R. (1996) Molecular chaperones in protein folding and translocation. Curr. Opin. Struc. Biol. 6:43.

Craig E.A. (1993) Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. Science 260:1902.

Ellis R.J. (1996) The "bio" in biochemistry: protein folding inside and outside the cell. Science 272:1448.

Frydman J. and Hartl F.U. (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: difference between in vitro and in vivo mechanisms. Science 272:1497.

Georgopoulos C. (1992) The emergence of the chaperone machines. TIBS 17:295.

Goldberg A.L. (1995) Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. Science 268:522.

Görlich D. and Mattaj I.W. (1996) Nucleocytoplasmic transport. Science 271:1513.

Hartl F.U. and Martin J. (1995) Molecular chaperones in cellular protein folding. Curr. Opin Struc. Biol. 5:92.

Hershko A. (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. TIBS 21:445.

Hiller M.M. et al. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. Science 273:1725.

Hilt W. and Wolf D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. TIBS 21:96.

Kalderon D. (1996) Protein degradation: de-ubiquitinate to decide your fate. Curr. Biol. 6:662.

Rassow J. and Pfanner N. (1996). Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides. Curr. Biol. 6:115.

Sue W., Maurizi M.R. and Gottesman S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. Science 286:1888.

Varshavsky A (2005) Regulated protein degradation. Trends in Biochem. Sci. 30:283.

Verma R. et al. (2002) Role of Rnp11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by 26S proteasome. Science 298:611.

Young JC, Agashe VR, Siegers K et al (2004) Pathways of chaperone mediated protein folding in the cytosol. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5:781.

Yu H. et al. (1996) Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. Curr. Biol. 6:455.

Citoesqueleto
Forma y motilidad

5

5-1. El citoesqueleto está compuesto por tres tipos de filamentos y numerosas proteínas accesorias

Las células eucariotas poseen un armazón proteico filamentoso desplegado por todo el citosol, al que se le ha dado el nombre de **citoesqueleto**. Está integrado por tres clases de **filamentos** —los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina (fig. 5-1)— y un conjunto de **proteínas accesorias**, clasificadas como reguladoras, ligadoras y motoras.

Las ***proteínas reguladoras*** controlan el nacimiento, el alargamiento, el acortamiento y la desaparición de los tres filamentos principales del citoesqueleto. Estos procesos se basan en las propiedades moleculares de los filamentos, puesto que son polímeros integrados por unidades monoméricas —dispuestas linealmente— que pueden sumarse o restarse.

Las ***proteínas ligadoras*** conectan a los filamentos entre sí o con otros componentes de la célula.

Las ***proteínas motoras*** sirven para trasladar macromoléculas y organoides de un punto a otro del citoplasma. También hacen que dos filamentos contiguos y paralelos entre sí se deslicen en direcciones opuestas, lo cual constituye la base de la motilidad, la contracción y los cambios de forma de la célula. Esta propiedad le confiere una función adicional al citoesqueleto, la de ser el "sistema muscular" de la célula, es decir, la **citomusculatura**. El ejemplo más estructurado de interacción entre filamentos y proteínas motoras se encuentra en la miofibrilla de la célula muscular esquelética, en la que componen un armazón macromolecular adaptado para la contractilidad.

El citoesqueleto da la forma —estable o cambiante— a las células, como resultado de la interacción de los tres tipos de filamentos con distintas proteínas accesorias.

En primer término serán analizados los filamentos intermedios, luego los microtúbulos y finalmente los filamentos de actina, cada uno con sus respectivas proteínas accesorias.

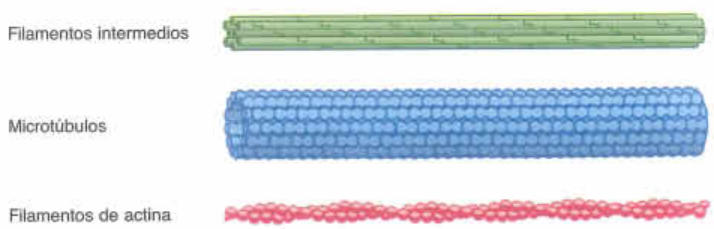


Fig. 5-1. Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto.

FILAMENTOS INTERMEDIOS

5-2. El diámetro de los filamentos intermedios es de 10 nm

En el citoesqueleto de la mayoría de las células existen filamentos de 10 nm de diámetro; se denominan intermedios porque tienen un grosor menor que el de los microtúbulos y mayor que el de los filamentos de actina (fig. 5-1).

La composición química de los **filamentos intermedios** es diversa. Por esta causa, aunque también por su morfología y su distribución en las distintas clases de células, se los agrupa en seis tipos, llamados: 1) laminofilamentos; 2) filamentos de queratina; 3) filamentos de vimentina; 4) filamentos de desmina; 5) filamentos gliales, y 6) neurofilamentos.

Todos los filamentos intermedios muestran la misma organización estructural. Se trata de polímeros lineales cuyos monómeros son proteínas que presentan una estructura en hélice α fibrosa (fig. 5-2). Esto los diferencia de los microtúbulos y los filamentos de actina, que poseen monómeros globulares.

Las proteínas fibrosas están integradas por una sucesión de secuencias idénticas de siete aminoácidos cada una (...abcdefgabcdefgabcdefg...), lo que les permite combinarse entre sí lado con lado y componer dímeros lineales. En virtud de que los dímeros vuelven a combinarse entre sí —también de a dos, pero en forma desfasada y antiparalela— se generan tetrámeros como los ilustrados en la figura 5-2. A continuación, los tetrámeros se conectan por sus extremos y dan lugar a estructuras cilíndricas alargadas llamadas ***protofilamentos***. Los filamentos intermedios se forman con el concurso de cuatro pares de protofilamentos, los cuales se adosan por sus lados y componen una estructura fibrilar de 10 nm de grosor (fig. 5-2).

A pesar de las diferencias entre los monómeros de las distintas clases de filamentos intermedios, casi todos se organizan de la forma en que se acaba de describir. Los monómeros son codificados por multigenes que se expresan de manera diferente en los distintos tipos de células. Más aún, a veces en una línea celular se expresan sucesivamente varios de esos genes conforme avanza su diferenciación.

Los filamentos intermedios forman una red continua tendida entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, alrededor de la cual componen

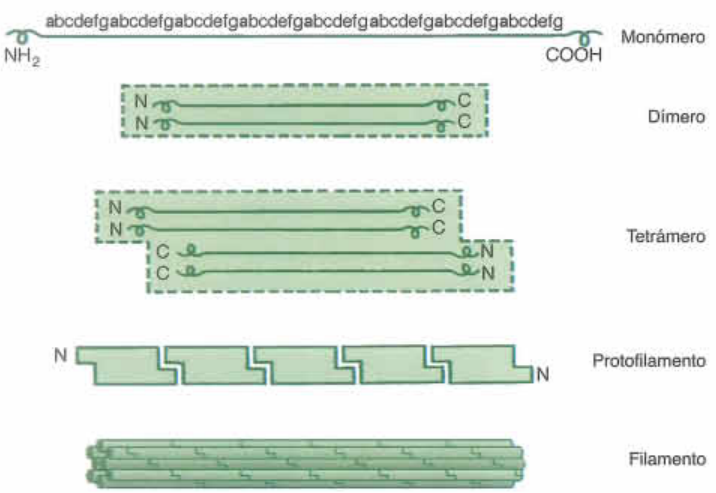


Fig. 5-2. Pasos en la formación de los filamentos intermedios y su organización estructural definitiva.

una malla filamentosa compacta (fig. 5-3A). Otra malla como ésta cubre la cara interna de la envoltura nuclear, de modo que se trata de filamentos intermedios que no se localizan en el citoplasma sino en el interior del núcleo. La distribución de los filamentos intermedios puede apreciarse en la figura 5-3B, que muestra a una célula epitelial tratada con anticuerpos antiqueratina fluorescentes.

Los filamentos intermedios contribuyen al mantenimiento de la forma celular y establecen las posiciones de los organoides en el interior de la célula. No obstante, su función principal es de índole mecánica, de ahí que se encuentren mucho más desarrollados en las células sometidas a grandes tensiones.

5-3. Diversas propiedades caracterizan a los distintos tipos de filamentos intermedios

La siguiente es una breve descripción de las características principales de los seis tipos de filamentos intermedios:

Laminofilamentos. En todas las células, apoyada sobre la cara interna de la envoltura nuclear existe un delgado entramado de filamentos intermedios conocido como **lámina nuclear** (cap. 12-2) (figs. 12-1, 12-3 y 12-4), los cuales se caracterizan por ser los únicos que no se localizan en el citosol. Además, porque los dominios fibrosos de sus tres clases de monómeros —**las laminas** A, B y C— son más largos que los dominios fibrosos de los monómeros de los demás filamentos intermedios.

Al igual que los monómeros de los filamentos citosólicos, las laminas A, B y C se unen por sus lados para formar dímeros, luego tetrámeros y a continuación protofilamentos (fig. 5-2). Estos últimos —conocidos como **laminofilamentos**— también se unen entre sí, pero no lo hacen por sus lados sino ortogonalmente, lo que da lugar a un entramado relativamente delgado adherido a la membrana interna de la envoltura nuclear (fig. 12-1). La lámina nuclear es responsable de la forma y la resistencia mecánica de la envoltura nuclear.

Filamentos de queratina. Los filamentos de queratina —llamados también ***tonofilamentos***— se encuentran en las células epiteliales, particularmente en la epidermis y sus derivados (pelos, uñas, etc.), en las mucosas y en las glándulas. En los capítulos 6-7 y 6-13 veremos que se asocian a los hemidesmosomas y a los desmosomas, con los cuales componen una trama filamentosa continua desplegada por todo el epitelio, al que le confieren gran parte de su resistencia mecánica.

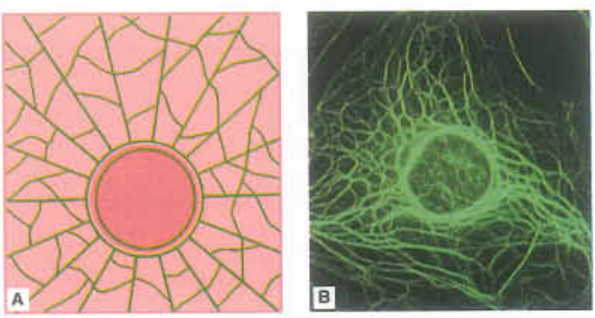


Fig. 5-3. A. Distribución de los filamentos intermedios en el núcleo y en el citoplasma. Los nucleares, llamados laminofilamentos, forman una malla sobre la cara interna de la envoltura nuclear. **B.** Micrografía de una célula tratada con anticuerpos antiqueratina fluorescentes. (De R. D. Goldman.)

Una proteína ligadora denominada **filagrina** une a los filamentos de queratina donde se entrecruzan.

Los monómeros de los filamentos de queratina se llaman **citoqueratinas**. Existen alrededor de 30 citoqueratinas distintas, clasificadas en dos grupos: las de ***clase I***, que son ácidas, y las de ***clase II***, que son neutras o básicas.

Los distintos tipos de células epiteliales contienen filamentos de queratina diferentes debido a que cada uno fabrica citoqueratinas de distinta calidad. Por ejemplo, las células epiteliales de la vejiga contienen una combinación particular de citoqueratinas, pertenecientes a las clases I y II. Algo similar ocurre en los otros epitelios. Estas combinaciones particulares son aprovechadas para diagnosticar el origen de algunos tumores cancerígenos y sus metástasis, ya que las citoqueratinas no se modifican con la transformación cancerosa y pueden identificarse con la ayuda de anticuerpos específicos (cap. 23-26).

Filamentos de vimentina. Los filamentos de vimentina (del latín *vimentus*, ondulado) presentan un aspecto ondulado y sus monómeros tienen un peso molecular de 54 kDa. Son muy comunes en las células embrionarias. En el organismo desarrollado se localizan en las células de origen mesodérmico, como fibroblastos, células endoteliales, células sanguíneas, etcétera.

La proteína ligadora que une a los filamentos de vimentina donde se entrecruzan es la **plactina**.

Dado que los anticuerpos contra los monómeros de vimentina muestran reacciones cruzadas en células de mamíferos, aves y anfibios, puede afirmarse que son proteínas que se han conservado en el curso de la evolución.

Filamentos de desmina. Los filamentos de desmina están formados por monómeros de 53 kDa y se encuentran en el citoplasma de todas las células musculares, sean estriadas (voluntarias y cardíacas) o lisas. En las estriadas ligan a las miofibrillas por sus lados (sección 5-33). En las células cardíacas también se asocian a los desmosomas de los discos intercalares (sección 5-34 y cap. 6-13). En las células musculares lisas se asocian con los filamentos de actina (sección 5-35).

Los filamentos de desmina se unen entre sí mediante una proteína ligadora específica, denominada **sinamina**.

Neurofilamentos. Los neurofilamentos son los principales elementos estructurales de las neuronas, incluidas las dendritas y el axón. En éste forman un enrejado tridimensional que convierte al axoplasma (el citosol del axón) en un gel altamente resistente y estructurado. En los neurofilamentos se han reconocido tres clases de monómeros, con pesos que van de 68 a 200 kDa.

Filamentos gliales. Los filamentos gliales se encuentran en el citosol de los astrocitos y de algunas células de Schwann. Están compuestos por monómeros ácidos de 50 kDa. Los oligodendrocitos no contienen esta clase de filamentos intermedios.

MICROTUBULOS

5-4. El diámetro de los microtúbulos es de 25 nm

Los **microtúbulos** son filamentos del citoesqueleto que se hallan en casi todas las células eucariotas y poseen un diámetro de 25 nm (fig. 1-9). Se caracterizan por su aspecto tubular y porque son notablemente rectilíneos y unifor-

mes. En los cortes transversales presentan una configuración anular, con una pared de 6 nm de espesor y una luz central uniformemente clara (fig. 5-1).

De acuerdo con su localización, los microtúbulos se clasifican en: 1) **citoplasmáticos**, presentes en la célula en interfase; 2) **mitóticos**, correspondientes a las fibras del huso mitótico; 3) **ciliares**, localizados en el eje de los cilios, y 4) **centriolares**, pertenecientes a los centríolos y a los cuerpos basales. Aunque todos los microtúbulos tienen las mismas características morfológicas, difieren en unas pocas propiedades. Por ejemplo, los ciliares y los centriolares son muy estables comparados con los citoplasmáticos y los mitóticos, que cambian permanentemente de longitud.

Las proteínas accesorias de los microtúbulos (reguladoras, ligadoras y motoras) reciben el nombre de **MAP** (por *microtubule-associated proteins*).

5-5. Los microtúbulos citoplasmáticos nacen en el centrosoma, que contiene un par de centríolos y una matriz

Los microtúbulos citoplasmáticos nacen en una estructura contigua al núcleo llamada **centrosoma**. Desde allí se extienden por todo el citoplasma hasta arribar a la membrana plasmática, en la que se fijan; en consecuencia, parecen rayos que van del centro a la periferia celular (fig. 5-4A). Esta disposición de los microtúbulos puede apreciarse en la figura 5-4B, que muestra a una célula cultivada tratada con anticuerpos antitubulina fluorescentes.

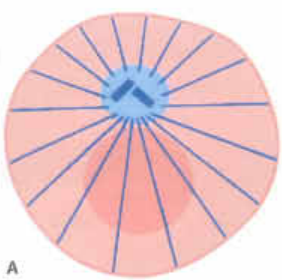
El centrosoma se llama también **centro organizador de los microtúbulos** o **MTOC** (por *microtubule-organizing centre*). Está compuesto por un par de **centríolos** o **diplosoma** (del griego *diplóos*, doble, y *sôma*, cuerpo) y una sustancia aparentemente amorfa que los circunda, la **matriz centrosómica** (figs. 5-4A y 5-23). Esta matriz contiene numerosas copias de un complejo de proteínas reguladoras denominadas **γ-tubulinas**.

Dada la semejanza de los centríolos con los cuerpos basales de los cilios, serán descritos junto a éstos en la sección 5-14.

5-6. La tubulina es el componente monomérico de los microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros compuestos por unidades proteicas llamadas **tubulinas**. A su vez, cada tubulina es un heterodímero de 110 a 120 kDa, cuyas dos subunidades —denominadas ***α-tubulina*** y ***β-tubulina***— son proteínas de tipo globular (fig. 5-5). Existen seis tipos diferentes de α-tubulinas y seis de β-tubulinas, pero siempre se combinan una α-tubulina con una β-tubulina, nunca dos α-tubulinas ni dos β-tubulinas entre sí.

En el capítulo 16-22 serán analizados los mecanismos que regulan la producción de las α-tubulinas y de las β-tubulinas en los ribosomas.



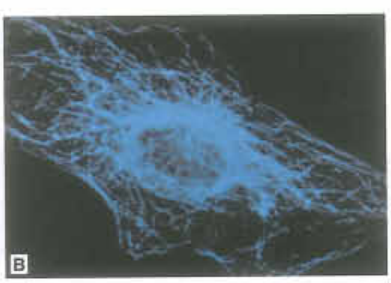


Fig. 5-4. A. Distribución de los microtúbulos en el citoplasma. Todos nacen en la matriz centrosómica, que además contiene el par de centríolos del diplosoma. **B.** Micrografía de una célula cultivada tratada con anticuerpos antitubulina fluorescentes. (De M. Osborn and K. Weber.)

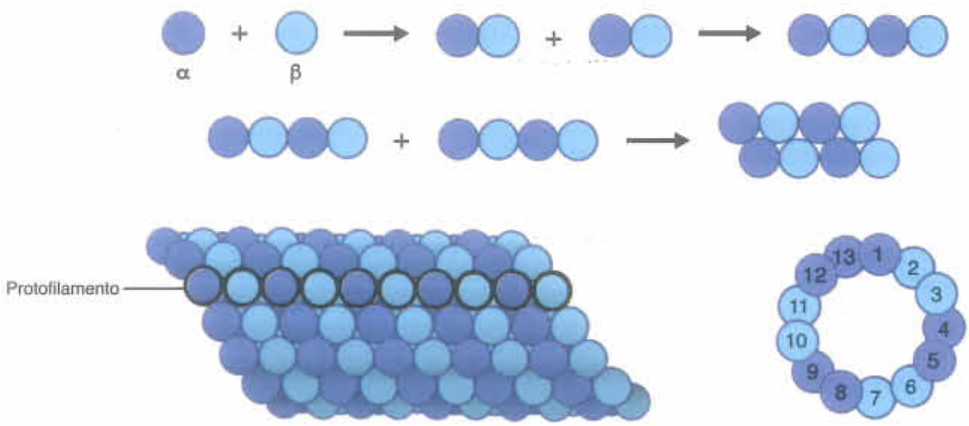


Fig. 5-5. Formación y organización estructural de los microtúbulos. Se ilustra el modo como se combinan las tubulinas entre sí para formar la pared tubular, integrada por trece protofilamentos.

Además de ser distintas, las dos subunidades de las tubulinas son muy afines, lo cual permite que la subunidad α de cada tubulina pueda combinarse no sólo con la subunidad β del propio heterodímero, sino también —por medio de su extremo libre— con la subunidad β de otra tubulina (fig. 5-5). Por añadidura, los heterodímeros pueden unirse entre sí por sus flancos, y lo hacen de un modo tal que se cierran en círculo. Estas particularidades llevan a la formación de una estructura tubular cuya pared parece estar integrada por varios filamentos que recorren el eje longitudinal del microtúbulo, conocidos como ***protofilamentos***. Observado el microtúbulo en un corte transversal, puede verse que contiene 13 protofilamentos (fig. 5-5).

La figura 5-5 permite comprobar que existe un desfase entre las α-tubulinas y las β-tubulinas de los protofilamentos contiguos. Es por ello que en los cortes transversales de los microtúbulos no se observa una alternancia regular entre las α-tubulinas y las β-tubulinas sino dos o tres subunidades iguales contiguas (fig. 5-5).

Debido a la polaridad de las tubulinas, el propio microtúbulo resulta polarizado, ya que en uno de sus extremos quedan expuestas las subunidades α y en el otro las subunidades β. Los heterodímeros pueden agregarse (polimerizarse) o retirarse (despolimerizarse) por ambos extremos. Como es obvio, durante la polimerización el microtúbulo se alarga, y durante la despolimerización se acorta.

Uno de los extremos del microtúbulo se llama **más [+]**; el otro, **menos [–]** (fig. 5-6). Estas designaciones se deben a que por el extremo [+] el microtúbulo se alarga y se acorta más rápidamente que por el extremo [–] (fig. 5-6).

5-7. Los microtúbulos citoplasmáticos son estructuras dinámicas

El extremo [–] de los microtúbulos se localiza en el centrosoma y coincide con las subundades α de las tubulinas. Obviamente, el extremo [+] corresponde a las subunidades β. En el extremo [–] los procesos de polimerización y de despolimerización se encuentran bloqueados por influencia de un componente centrosómico (más adelante se verá que se trata del complejo proteico de γ-tubulinas).

Fig. 5-6. Polimerización (alargamiento) y despolimerización (acortamiento) de los microtúbulos por sus dos extremos.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Los microtúbulos citoplasmáticos son estructuras dinámicas, ya que incesantemente se forman microtúbulos nuevos a la vez que algunos se alargan y otros se acortan hasta desaparecer (fig. 5-7).

Los microtúbulos comienzan a formarse en la matriz centrosómica. Para ello, unas pocas tubulinas (provenientes del depósito de tubulinas libres que se encuentran en el citosol) concurren a la matriz centrosómica y se nuclean (se polimerizan). Este núcleo constituye el primer esbozo del microtúbulo y se forma por influencia del complejo proteico de **γ-tubulinas**, que promueve el ensamblaje de las primeras 13 tubulinas del extremo [–]. Los centríolos no desempeñan ningún papel en este proceso. De inmediato el microtúbulo comienza a crecer por su extremo [+], al agregarse nuevas tubulinas provenientes del depósito de tubulinas del citosol.

El complejo de γ-tubulinas tiene forma anular, su diámetro es similar al de los microtúbulos y se comporta como un molde a partir del cual se nuclean las primeras 13 tubulinas. Su forma —que sería como la de la figura 5-8— explica el desfase que existe entre las tubulinas de los protofilamentos contiguos (fig. 5-5).

Adicionalmente, el complejo de γ-tubulinas actúa como un capuchón que bloquea el crecimiento y el acortamiento del microtúbulo por su extremo [–].

Cuando las tubulinas se despolimerizan de los microtúbulos, pasan a formar parte del depósito de tubulinas libres del citosol. Inicialmente, cada tubulina contiene un GDP en su subunidad β, que no tarda en intercambiarse por un GTP en el mismo citosol (fig. 5-9). Luego las tubulinas con GTP son atraídas por los extremos [+] de los microtúbulos en crecimiento y se unen a ellos. A diferencia de lo que ocurre en el citosol, la polimerización hace que el GTP de las tubulinas se hidrolice en GDP y fosfato. Como se ve, la formación de los microtúbulos es un proceso que consume energía.

Llamativamente, las tubulinas con GDP tienden a despolimerizarse del extremo [+] de los protofilamentos (fig. 5-9), lo cual se debe al encorvamiento que experimenta tal extremo por influencia precisamente del GDP (fig. 5-10).

Así descrito, el proceso de polimerización y despolimerización de las tubulinas comprendería un círculo vicioso, ya que la polimerización —con la consiguiente formación de GDP— llevaría a la inmediata despolimerización de los monómeros. Esto no ocurre debido a que las tubulinas recién incorpo-

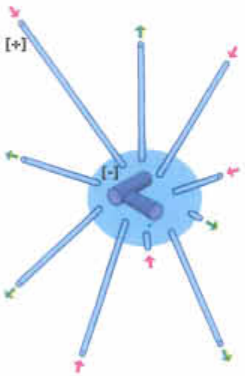


Fig. 5-7. Nacimiento de un microtúbulo a partir de la matriz centrosómica, mientras otros se alargan, se acortan o desaparecen.

Fig. 5-8. Representación del complejo anular de γ-tubulinas. Numerosos complejos como éste se localizan en la matriz centrosómica, donde actúan como moldes para la gestación de los microtúbulos.

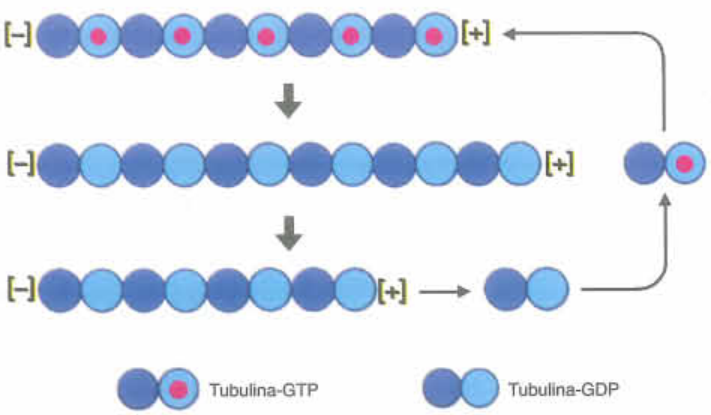


Fig. 5-9. Intercambio de las tubulinas-GDP y de las tubulinas-GTP entre los microtúbulos y el citosol.

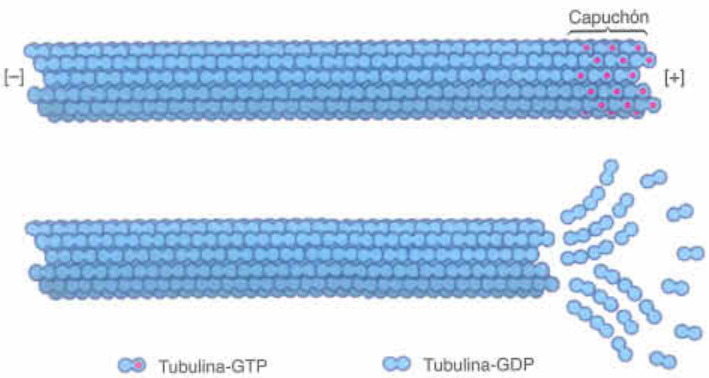


Fig. 5-10. Formación del capuchón de tubulinas-GTP en el extremo del microtúbulo. Obsérvese que cuando el GTP se convierte en GDP y no se renueva el capuchón, se desprenden las tubulinas.

radas demoran un tiempo en hidrolizar sus GTP y forman un **capuchón de tubulinas-GTP** en el extremo del microtúbulo, el cual impide la salida de las tubulinas arribadas con anterioridad, a pesar de que en ellas el GTP ya se convirtió en GDP (fig. 5-10).

A causa de esta particularidad —denominada ***inestabilidad dinámica***—, cuando un microtúbulo alcanza la longitud deseada, para mantenerla debería alternar breves períodos de polimerización con otros de despolimerización. Dado que en términos energéticos ello sería muy oneroso, se descuenta la existencia de proteínas reguladoras que se unen al extremo [+] del microtúbulo para evitar esa inestabilidad.

La despolimerización del microtúbulo es mucho más rápida que la polimerización. La diferencia de velocidad se hace evidente cuando el microtúbulo pasa de una fase de alargamiento a otra de acortamiento, y viceversa. En el primer caso la despolimerización es tan abrupta que se la conoce como "catástrofe". En cambio, cuando el acortamiento cesa y el microtúbulo comienza a alargarse, el proceso —por ser relativamente lento— lleva el nombre de "salvamento".

En el citosol existe una proteína reguladora —llamada **catastrofina**— que detiene el crecimiento de los microtúbulos y lleva a su despolimerización tras la pérdida del capuchón de tubulinas-GTP.

La ***colchicina***, un medicamento utilizado para el tratamiento de la ***gota***, actúa en forma semejante, ya que se une a las tubulinas e impide su polimerización, lo que lleva —al no formarse el capuchón— a la desaparición de los microtúbulos. El ***colcemid*** es un derivado de la colchicina que posee los mismos efectos.

5-8. Los microtúbulos citoplasmáticos son necesarios para el transporte de los organoides y las macromoléculas

Los microtúbulos citoplasmáticos constituyen verdaderas vías de transporte por las que se movilizan macromoléculas y organoides (mitocondrias, vesículas transportadoras, etc.) de un punto a otro del citoplasma. Esta función es realizada con la asistencia de dos proteínas motoras, la **quinesina** y la **dineína**. Cuando se hallan "cargadas" con el material a transportar, la quinesina se desliza hacia el extremo [+] del microtúbulo y la dineína hacia el extremo [–] (fig. 5-11).

Estas proteínas motoras están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos livianas (fig. 5-12). Cada cadena pesada contiene un

Fig. 5-11. Utilización de los microtúbulos como vías sobre las cuales se desplazan las proteínas motoras dineína y quinesina para transportar materiales entre distintos puntos del citoplasma.

dominio globular (o cabeza) y uno fibroso (o cola). El fibroso se conecta con el material a transportar y el globular se une al microtúbulo.

En la membrana de los organoides y de las vesículas transportadoras se han identificado las proteínas transmembranosas **quinectina** y **dinactina**, con las cuales se unen la quinesina y la dineína, respectivamente.

La energía consumida durante el transporte es aportada por el ATP, luego de su hidrólisis por ATPasas presentes en las cabezas de las proteínas motoras. Se ha calculado que la quinesina se desplaza unos 8 nm por cada ATP hidrolizado.

Un ejemplo de transporte mediante estas proteínas se observa en los melanocitos de la piel, cuyos gránulos de melanina, ante determinados estímulos, se deslizan a lo largo de los microtúbulos tanto centrípeta como centrífugamente. Otro ejemplo corresponde a los axones, donde las quinesinas conducen moléculas y vesículas desde el cuerpo neuronal hasta el terminal axónico, y las dineínas las retornan.

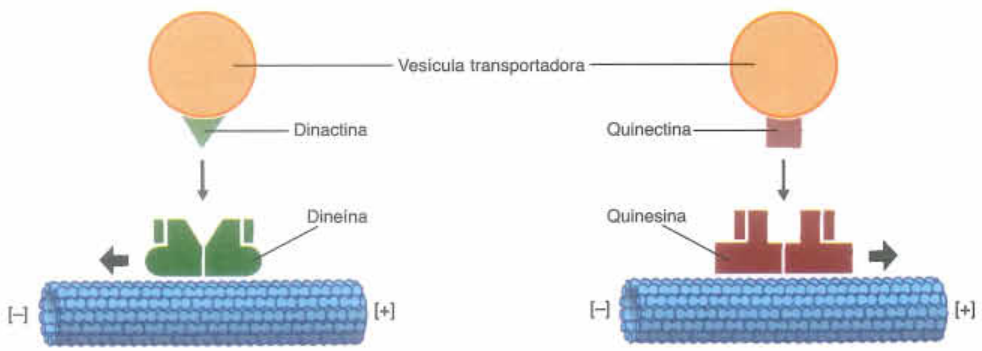
Las neuronas contienen otra proteína motora ligada a los microtúbulos. Se llama **dinamina** y, a diferencia de la quinesina y la dineína, posee actividad GTPasa. Además, como se verá en el capítulo 7-37, en todos los tipos celulares la dinamina provoca el desprendimiento de las vesículas transportadoras que se generan mediante cubiertas de clatrina.

5-9. Los microtúbulos citoplasmáticos contribuyen a establecer la forma celular

Los microtúbulos contribuyen al establecimiento de las formas que adquieren las células. Además, mediante proteínas accesorias, mantienen al retículo endoplasmático y al complejo de Golgi en sus posiciones en el citoplasma, lo que determina la polaridad celular. Se ha comprobado que en la estabilización de estos organoides intervienen, respectivamente, la quinesina y la dineína, dos proteínas motoras.

Fig. 5-12. Unión de las vesículas transportadoras a la quinesina y a la dineína mediante las proteínas transmembranosas quinectina y dinactina, respectivamente.

En las neuronas, los microtúbulos se hallan también en las dendritas y en el axón (fig. 5-13). Más aún, el crecimiento del axón depende del alargamiento de sus microtúbulos. Durante ese alargamiento, a la altura del cono de cre-



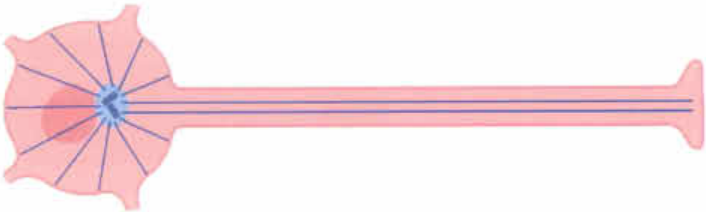


Fig. 5-13. Distribución de los microtúbulos en el cuerpo y en el axón de las neuronas.

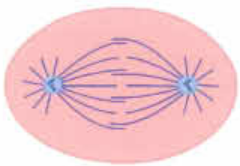
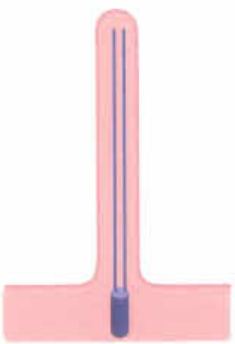


Fig. 5-14. Distribución de los microtúbulos mitóticos (o fibras del huso mitótico) durante la división celular.



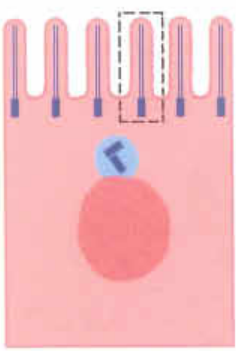


Fig. 5-15. Microtúbulos ciliares. Obsérvese su nacimiento en el cuerpo basal o cinetosoma.

cimiento del axón, se ha descubierto entre los microtúbulos a la antes mencionada dinamina. Provoca el deslizamiento de algunos microtúbulos sobre otros, lo que sería necesario para el proceso de avance del cono por la matriz extracelular (sección 5-28).

En el cuerpo neuronal y en el axón se ha identificado una MAP reguladora llamada **tau** (por la letra griega τ) que inhibe la despolimerización de las tubulinas en los extremos de los microtúbulos. Ejerce también una función ligadora, ya que establece puentes entre los microtúbulos contiguos y les confiere estabilidad. Otras MAP ligadoras, llamadas **MAP1** y **MAP2**, crean puentes similares entre los microtúbulos neuronales.

Las tau contienen un número determinado de fosfatos, cuyo aumento altera su funcionamiento normal. El aumento de los fosfatos podría producirse por la presencia de quinasas sobreactivas o de fosfatasas hipoactivas. Esto ocurre en la ***enfermedad de Alzheimer***, caracterizada por un deterioro neuronal progresivo a consecuencia de la inestabilidad de los microtúbulos. Como se vio en la sección anterior, éstos son imprescindibles para el transporte intracelular de organoides y de otros materiales vitales para la célula.

5-10. Los microtúbulos mitóticos movilizan a los cromosomas durante la mitosis y la meiosis

Las funciones de los microtúbulos mitóticos serán analizadas detalladamente en el capítulo 18-14.

La célula en mitosis y en meiosis posee dos centrosomas en lugar de uno, y los microtúbulos citoplasmáticos que se observan en la interfase son reemplazados por los microtúbulos mitóticos, llamados también **fibras del huso mitótico** (fig. 5-14). A diferencia de los citoplasmáticos, en los microtúbulos mitóticos el extremo [–] no se halla bloqueado por la matriz centrosómica, de modo que los microtúbulos pueden polimerizarse y despolimerizarse también por ese extremo.

Se puede hacer desaparecer a los microtúbulos mitóticos mediante el uso de la ***vinblastina*** y la ***vincristina***. Estas drogas actúan de forma semejante a la colchicina (sección 5-7), aunque lo hacen casi selectivamente sobre las fibras del huso, de ahí que se las utilice para bloquear las divisiones de las células neoplásicas en el tratamiento del cáncer. El ***taxol*** es otra droga usada para tratar el cáncer, pues impide la despolimerización de las fibras del huso e induce su crecimiento descontrolado, incompatible con la división celular.

5-11. Los microtúbulos ciliares forman el eje de los cilios y los flagelos

Los **cilios** son apéndices delgados —de 0,25 μm de diámetro y varios micrones de largo— que surgen de la superficie de diversos tipos celulares (fig. 1-6). Los de mayor longitud se llaman **flagelos**. Cada uno está compuesto por

un eje citosólico —la matriz ciliar— envuelto por una prolongación de la membrana plasmática. En medio de dicha matriz, siguiendo el eje longitudinal del cilio, se encuentra un armazón filamentoso regular llamado **axonema**, integrado por varios microtúbulos paralelos entre sí asociados con proteínas accesorias (figs. 5-15 y 5-16). Más adelante describiremos su composición y sus funciones.

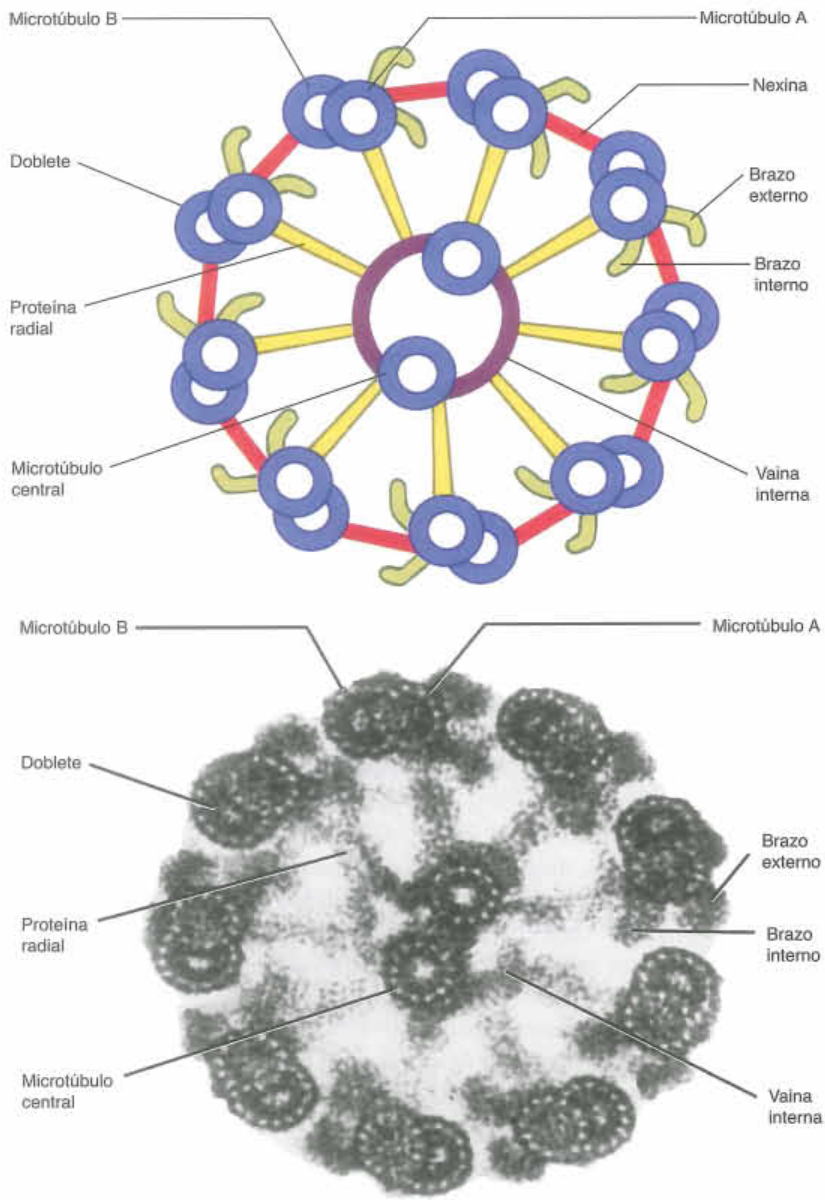


Fig. 5-16. Arriba. Esquema de un corte transversal del axonema que muestra la configuración 9 + 2 característica de los microtúbulos del cilio. La vista se dirige de la raíz a la punta del cilio. Debe resaltarse la disposición de los microtúbulos periféricos, los cuales se hallan asociados entre sí de a pares, llamados dobletes. Obsérvense las distintas clases de proteínas ligadoras y cómo las proteínas motoras de dineína forman "brazos" orientados en la dirección de las agujas del reloj. **Abajo.** Micrografía electrónica de un axonema revelado mediante ácido tánico. (De D. W. Fawcett.)

Cada cilio nace en un **cuerpo basal** o **cinetosoma** (del griego *kineetós*, movible, y *sôma*, cuerpo), que es una estructura idéntica a un centríolo del diplosoma. Los cuerpos basales y los centríolos serán analizados en la sección 5-14.

5-12. Los cilios se mueven

Los cilios son estructuras que se mueven. Según las células en que se hallan, sus movimientos sirven para arrastrar fluidos y partículas (como ocurre en el árbol respiratorio), para desplazar a otras células (por ejemplo, los espermatozoides, el ovocito o el cigoto en la trompa uterina) o para movilizar a células autónomamente (por ejemplo, los espermatozoides).

El movimiento ciliar puede ser pendular, unciforme, infundibuliforme u ondulante. En el movimiento pendular el cilio parece rígido y se flexiona en su base. En el unciforme (el más común en los metazoos) el cilio se dobla y adquiere la forma de un garfio. En el infundibuliforme, rota describiendo una figura cónica. En el ondulante, característico de los flagelos, el movimiento se desplaza desde el extremo proximal al extremo distal del cilio.

En las superficies epiteliales cubiertas por cilios puede verse que éstos se mueven coordinadamente y dan lugar a verdaderas ondas que se desplazan por el epitelio en una determinada dirección. Estas ondas se producen porque cada cilio se mueve con un pequeño retraso (o adelanto) con respecto al situado por delante (o por detrás) de él. El paso de la onda de una célula a la vecina derivaría del pasaje de ciertos solutos (señales) a través de las uniones comunicantes que vinculan a las células epiteliales entre sí (cap. 6-14) (fig. 6-12).

El movimiento ciliar es producido por el axonema (figs. 5-15 y 5-16). Observados en un corte transversal, los microtúbulos del axonema muestran una configuración especial, conocida como "9 + 2". Ello obedece a que en la parte periférica de esta estructura se observan nueve pares de microtúbulos —los cuales forman un círculo—, y en la parte central, dos microtúbulos más. Se dice "9 + 2" porque los dos microtúbulos de cada par periférico están firmemente unidos entre sí —forman un doblete— y los del par central están separados. Uno de los microtúbulos de cada par periférico, identificado con la letra A, es completo, es decir, posee 13 protofilamentos; el otro, llamado B, es incompleto, pues posee 10 u 11 protofilamentos (fig. 5-17). Los dobletes se disponen en forma oblicua, de modo que el microtúbulo A se halla más próximo al centro del cilio que el microtúbulo B. Además, los extremos [–] de ambos microtúbulos apuntan hacia el cuerpo basal (fig. 5-18).

El axonema contiene proteínas ligadoras y proteínas motoras (fig. 5-16).

Las ***proteínas ligadoras*** unen a los dobletes entre sí y los sostienen en sus posiciones en el interior del cilio, lo cual mantiene la integridad del axonema durante el movimiento ciliar. Así, las **nexinas** unen el microtúbulo A de un doblete con el microtúbulo B del doblete vecino; la **vaina interna** rodea a los microtúbulos centrales, y las **proteínas radiales** unen a los microtúbulos A con esa vaina.

Las ***proteínas motoras*** están representadas por la **dineína ciliar**. Esta se diferencia de la dineína citoplasmática porque es más grande y tiene tres cadenas pesadas y tres cadenas livianas, en lugar de dos de cada

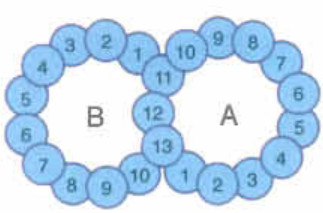


Fig. 5-17. Disposición en doblete de un par de microtúbulos periféricos del axonema.

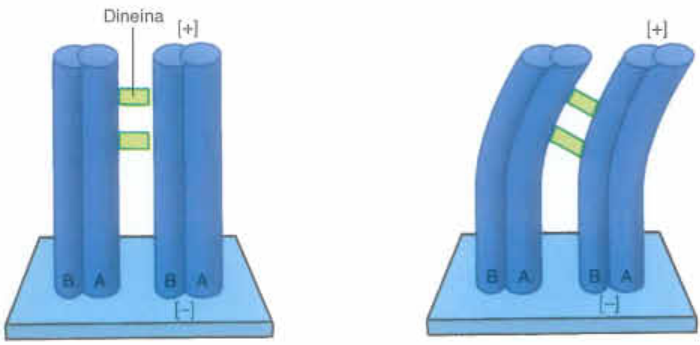


Fig. 5-18. Origen del movimiento ciliar. Está basado en el desplazamiento de las cabezas de las dineínas ciliares sobre el microtúbulo B de los dobletes, en dirección de la raíz del cilio.

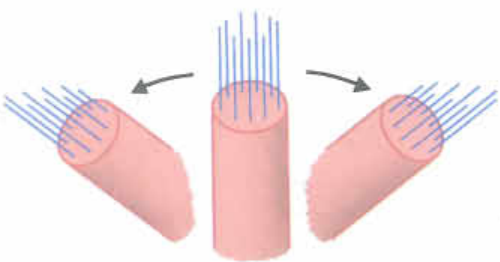
una (sección 5-8). Las colas de la dineína ciliar están ancladas en el microtúbulo A de un doblete, mientras que las cabezas globulares —con sus respectivas ATPasas— establecen uniones intermitentes con el microtúbulo B del doblete vecino. Así, las dineínas forman puentes inestables entre los dobletes contiguos.

Las dineínas se denominan también brazos internos y externos del axonema (fig. 5-16) para indicar que algunas nacen en el microtúbulo A en posiciones más periféricas respecto de otras. Si se mira al axonema desde la raíz del cilio, dichos brazos se orientan en la dirección de la marcha de las agujas del reloj.

El movimiento ciliar se produce porque las cabezas de las dineínas recorren un pequeño tramo del microtúbulo B hacia su extremo [–] (fig. 5-18) (en la sección 5-8 señalamos que esta clase de proteína motora se mueve siempre en esa dirección). Debido a que los microtúbulos del axonema se hallan fijos en sus posiciones dentro del cilio (mediante las proteínas ligadoras) y sus extremos proximales están anclados en el cuerpo basal, el desplazamiento de las dineínas sobre el microtúbulo B hace que ambos dobletes se curven, puesto que no pueden desplazarse linealmente en direcciones contrarias. Como ello ocurre con las dineínas localizadas entre varios de los nueve dobletes, la suma de fuerzas hace que todo el axonema se doble, lo que genera el movimiento ciliar (fig. 5-19). El desplazamiento de las dineínas se produce como consecuencia de la formación y la ruptura alternadas de los puentes transversales de dineína. Este proceso requiere energía, que es tomada del ATP.

Durante el movimiento ciliar no todos los dobletes operan a la vez. Más aún, se sospecha que los situados en un lado del axonema flexionan al cilio y los del lado opuesto intervienen en el movimiento de retorno.

Fig. 5-19. Movimiento ciliar. Se produce ante la imposibilidad del deslizamiento de los dobletes del axonema entre sí, por lo cual se doblan.



5-13. En el síndrome de Kartagener los cilios son inmóviles

El ***síndrome de Kartagener*** se debe a una o más mutaciones de los genes que codifican a la dineína ciliar o a otras proteínas accesorias del axonema. Por consecuencia, los cilios y los flagelos son inmóviles, lo que provoca cuadros de bronquitis crónicas y esterilidad en la mujer y en el varón (los cilios del árbol respiratorio y de las trompas uterinas y el flagelo de los espermatozoides carecen de movimiento).

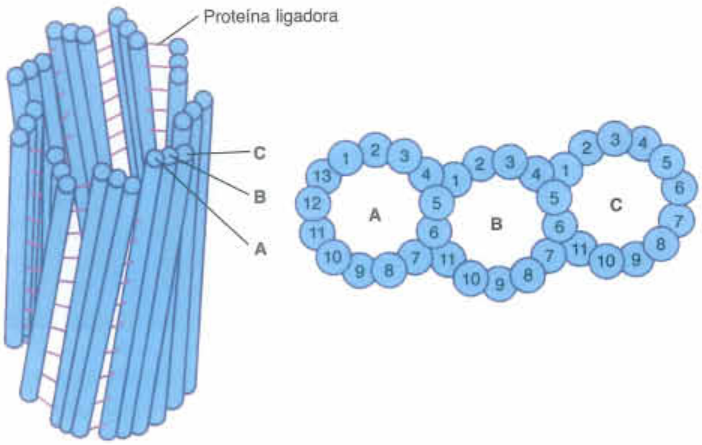


Fig. 5-20. Izquierda. Esquema de un centríolo o de un cuerpo basal, con su característica configuración 9 + 0. **Derecha.** Se ilustra la triple asociación característica de los microtúbulos centriolares, conocida como triplete.

5-14. La estructura de los cuerpos basales es idéntica a la de los centríolos

Los microtúbulos ciliares nacen en el **cuerpo basal**. Este se localiza por debajo de la membrana plasmática, a la altura de la raíz del cilio (figs. 5-15 y 5-22). Existen tantos cuerpos basales como cilios.

Los cuerpos basales se estudian junto con los centríolos del centrosoma porque son estructuralmente idénticos. Constituyen cilindros huecos abiertos en sus extremos y miden 0,2 μm de diámetro por 0,4 μm de largo. La pared del cuerpo basal o del centríolo está formada por 9 unidades microtubulares, cada una compuesta por tres microtúbulos fusionados entre sí, llamados A, B y C (figs. 5-20, 5-21 y 5-22).

El microtúbulo A es completo, pues posee 13 protofilamentos; en cambio, los microtúbulos B y C son incompletos, ya que contienen 11 protofilamentos cada uno (fig. 5-20). Como los dobletes en el axonema, estos tripletes se disponen en forma oblicua, de manera que el microtúbulo A se halla más cerca del centro del centríolo que el microtúbulo C (fig. 5-21).

Los 9 tripletes del cuerpo basal están conectados entre sí por dos clases de ***proteínas ligadoras***. Unas son fibras cortas que enlazan el microtúbulo A de un triplete con el microtúbulo C del triplete vecino. Las otras son fibras largas que unen a los tripletes de forma semejante a los rayos de una rueda (fig. 5-21).

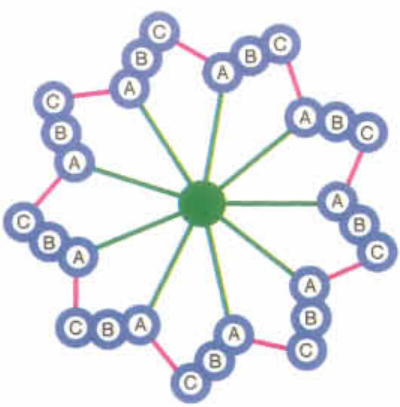


Fig. 5-21. Izquierda. Esquema de un corte transversal del centríolo en el que se ilustran los nueve tripletes y las proteínas ligadoras. **Derecha.** Micrografía electrónica de un corte transversal de un centríolo revelado mediante ácido tánico. (De V. Kalnins.)

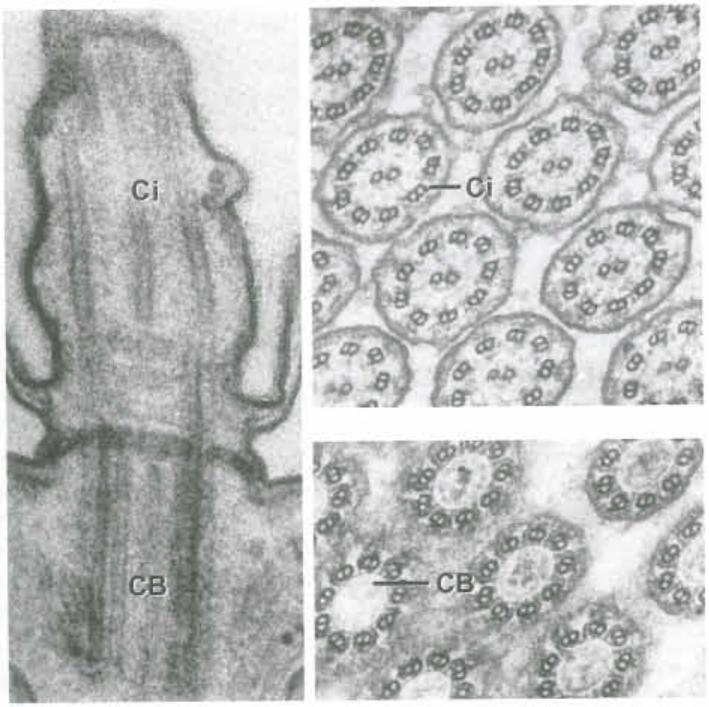


Fig. 5-22. Izquierda. Micrografía electrónica de un corte longitudinal de la raíz de un cilio (*Ci*), con su cuerpo basal o cinetosoma (*CB*). **Derecha.** Cortes transversales de cilios y cuerpos basales. 70.000×. (Cortesía de J. André y E. Fauret-Fremiet.)

Vimos que cada cilio nace de un cuerpo basal, el cual, como el cilio, se halla perpendicular a la membrana plasmática (fig. 5-15). Cabe agregar que los microtúbulos A y B de los dobletes del cilio se continúan con los microtúbulos A y B de los tripletes del cuerpo basal. Se ignora el significado de los microtúbulos C de los tripletes y dónde se originan los microtúbulos centrales del axonema.

A menudo el extremo libre del cuerpo basal muestra una raíz fibrilar corta que se interna en el citoplasma y que tiene por función sostener al cilio.

Los cuerpos basales se diferencian de los centríolos del diplosoma por las siguientes particularidades: 1) los primeros se localizan cerca de la superficie celular (en la raíz de los cilios) y los segundos cerca del núcleo (figs. 5-4A y 5-15); 2) los cuerpos basales no poseen la matriz centrosómica que envuelve a los centríolos (fig. 5-23); 3) los cuerpos basales suelen estar formados por una sola unidad, mientras que los centríolos se presentan de a dos, ambos perpendiculares entre sí (fig. 5-23).

5-15. En la ciliogénesis los microtúbulos del axonema se desarrollan a partir del cuerpo basal

En la ciliogénesis los microtúbulos A y B del cuerpo basal cumplen la función de la γ-tubulina del centrosoma, es decir, actúan como moldes para el nucleamiento (polimerización) de las primeras tubulinas de los microtúbulos A y B del axonema. Las tubulinas del axonema naciente se unen a los extremos [+] de los microtúbulos A y B del cuerpo basal, que apuntan hacia la superficie de la célula. Por lo tanto, los extremos [–] de los microtúbulos de los cilios se localizan junto al cuerpo basal. Luego del nucleamiento inicial se agregan nuevas tubulinas, lo cual alarga a los microtúbulos del axonema hasta que el cilio alcanza su longitud definitiva.

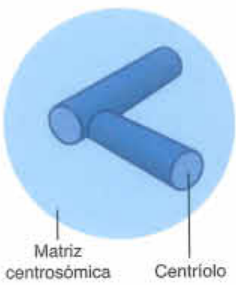


Fig. 5-23. Representación esquemática del centrosoma, que incluye la matriz centrosómica y el par de centríolos o diplosoma.

Fig. 5-24. Distribución de los filamentos de actina corticales en una célula epitelial.

5-16. Los cuerpos basales derivarían de los centríolos del centrosoma

Por lo dicho en la sección anterior se deduce que antes de que los cilios nazcan se forman los respectivos cuerpos basales. Estos aparecerían como consecuencia de una reproducción dicotómica por parte de los centríolos del diplosoma, mediante un proceso basado en el desarrollo de **procentríolos** similar al que se muestra en la figura 18-5. Otra teoría sugiere que los cuerpos basales se formarían *de novo*, sin la participación de los centríolos.

FILAMENTOS DE ACTINA

5-17. El diámetro de los filamentos de actina es de 8 nm

Los **filamentos de actina** o **microfilamentos** poseen un diámetro de 8 nm y son más flexibles que los microtúbulos. Suelen asociarse en haces o atados, de modo que raramente se los ve aislados (fig. 1-9).

Sobre la base de su distribución en la célula, los filamentos de actina se clasifican en: 1) **corticales**, los cuales se ubican por debajo de la membrana plasmática, donde constituyen el componente citosólico más importante (fig. 5-24), y 2) **transcelulares**, dado que atraviesan el citoplasma en todas las direcciones (fig. 5-25A). De igual forma que los microtúbulos tratados con anticuerpos antitubulina, los filamentos de actina pueden ser localizados con la ayuda de anticuerpos antiactina fluorescentes (fig. 5-25B).

Como se describirá en la parte final del capítulo, los filamentos de actina también hacen posible la motilidad celular, forman el esqueleto de las microvellosidades e integran el armazón contráctil de las células musculares.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FIL. I CIUDAD DEL ESTE

Los filamentos de actina son polímeros construidos por la suma lineal de monómeros, cuyo ensamblaje les da a los filamentos una configuración helicoidal doble característica (figs. 5-1 y 5-26). Los monómeros se encuentran libres en el citosol, donde forman un depósito al que la célula recurre cuando los necesita. Cada monómero es un polipéptido de 375 aminoácidos que se halla asociado a un ADP o a un ATP; su estructura terciaria es globular, de ahí que reciba el nombre de **actina G**.

Al igual que los microtúbulos, los filamentos de actina poseen un extremo [+] y un extremo [–] (sección 5-6); por el primero se alargan y se acortan más rápidamente que por el segundo (fig. 5-26). Esta bipolaridad se debe a que los propios monómeros la poseen.

5-18. Los filamentos de actina se forman a partir de dos monómeros de actina G

Cada filamento de actina comienza a formarse por la intervención de la proteína reguladora **formina**, a partir de un núcleo de dos monómeros de actina G que se unen entre sí, en cualquier punto del citosol donde la construcción de filamentos de actina sea necesaria (fig. 5-26). El alargamiento del núcleo originario se produce como consecuencia del agregado sucesivo de nuevos monómeros en los extremos [+] y [–] del filamento en ciernes. La polimerización requiere que las actinas G contengan un ATP.

Poco tiempo después de la polimerización, este ATP se hidroliza en ADP y P, condición que induce a los monómeros a despolimerizarse. Sin embargo, ello no ocurre porque en los extremos de los filamentos de actina se produce

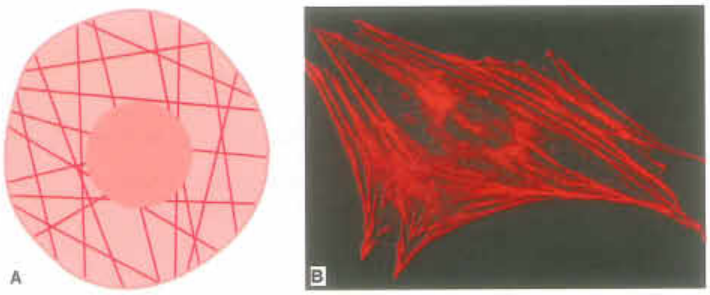


Fig. 5-25. A. Distribución de los filamentos de actina transcelulares (fibras tensoras) en una célula conectiva. **B.** Célula cultivada tratada con anticuerpos antiactina fluorescentes.

un fenómeno de inestabilidad dinámica análogo al descrito para los microtúbulos (sección 5-7), derivado de la formación de un capuchón cuyos monómeros demoran un tiempo en convertir sus ATP en ADP.

Puesto que el mantenimiento de esta inestabilidad tiene un alto costo en ATP, cuando el filamento alcanza la longitud deseada, varias proteínas reguladoras se colocan en sus extremos para estabilizarlo.

La polimerización de los monómeros de actina en el extremo [+] depende de la propia formina y de otra proteína reguladora, la **profilina**, a pesar de que inducen la hidrólisis de los ATP en los monómeros ya polimerizados.

En el proceso de despolimerización participan varias proteínas reguladoras, entre las cuales se destacan la **timosina** y la **cofilina**, llamada también **ADF** (por *actin-depolymerizing factor*). La timosina inhibe la formación del dímero inicial de actinas G por parte de la formina y su polimerización en el filamento en crecimiento. En cambio, la cofilina se une al filamento de actina y lo despolimeriza progresivamente.

La droga ***citocalasina B*** provoca la despolimerización de los filamentos de actina debido a que se une a sus dos extremos y bloquea su crecimiento, con la consiguiente desaparición de los capuchones de actinas con ATP.

5-19. Los filamentos de actina contribuyen a establecer la forma celular

Hemos visto que existen haces de filamentos de actina que se concentran por debajo de la membrana plasmática (corticales) (fig. 5-24) y otros que cruzan el citoplasma de lado a lado (transcelulares) (fig. 5-25). Ambas localizaciones contribuyen, entre otras funciones, al establecimiento de la forma celular.

Las concentraciones y las funciones de ambos filamentos difieren según que las células sean epiteliales o conectivas. En las primeras prevalecen los filamentos corticales, que son los que establecen la forma celular. En las segundas, tal prevalencia y función les corresponde a las fibras transcelulares.

En ambos tipos celulares los filamentos corticales son también responsables de la morfología de la parte periférica de la célula. Más aún, en la sección 5-32 veremos que forman el eje de las microvellosidades.

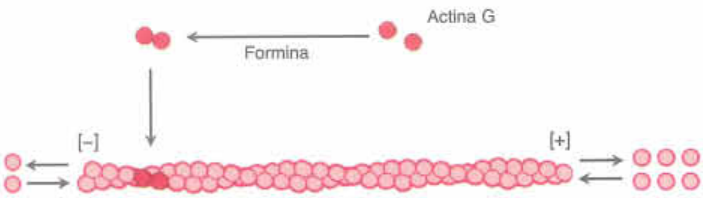


Fig. 5-26. Formación y organización estructural del filamento de actina. Se ilustran también la polimerización (alargamiento) y despolimerización (acortamiento) del filamento por sus dos extremos.

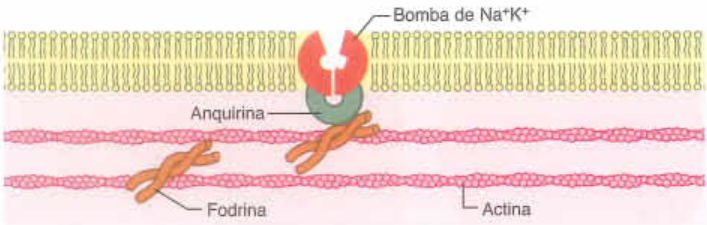


Fig. 5-27. Esquema de los filamentos de actina corticales en las células epiteliales, y de las proteínas ligadoras que los sujetan a la membrana plasmática.

5-20. En las células epiteliales los filamentos de actina corticales forman una malla por debajo de la membrana plasmática

En las células epiteliales los haces de filamentos de actina corticales se disponen en las más variadas direcciones y componen una malla continua por debajo de la membrana plasmática. Los filamentos se unen entre sí y a la membrana plasmática mediante la proteína ligadora **fodrina** (fig. 5-27). A su vez, ésta se conecta con proteínas integrales de la membrana —una de las cuales es nada menos que el contratransportador de Na^+ y K^+ visto en el capítulo 3-19— por intermedio de otra proteína ligadora, la **anquirina**. La fodrina es semejante a la **espectrina** que se encuentra en la membrana terminal de las microvellosidades (sección 5-32) y en el citoesqueleto del eritrocito (sección 5-36).

5-21. En los epitelios una franja de filamentos de actina corticales participa en la formación del cinturón adhesivo

El **cinturón adhesivo**, que será analizado en el capítulo 6-12, es una forma de unión intercelular presente cerca de la superficie apical de las células epiteliales. Consta de una franja reforzada de filamentos de actina corticales, los cuales componen una especie de anillo que circunda cada célula (figs. 6-8 y 6-10). Estos filamentos se conectan con proteínas de la membrana plasmática llamadas **cadherinas** por medio de las proteínas ligadoras **placoglobina**, **catenina**, **α-actinina** y **vinculina**. El cinturón adhesivo está integrado por los filamentos de actina, las cadherinas y las proteínas ligadoras.

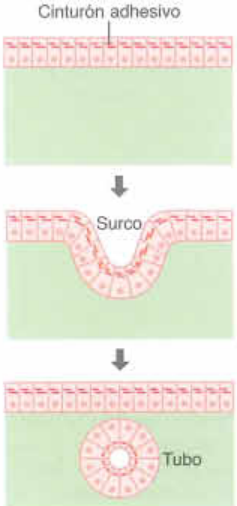


Fig. 5-28. Filamentos de actina del cinturón adhesivo (véase fig. 6-10). Merced a estos filamentos, durante el desarrollo embrionario algunos epitelios planos originan estructuras tubulares (por ejemplo, el tubo neural primitivo).

5-22. En algunos epitelios embrionarios el cinturón adhesivo tiene funciones morfogenéticas

En las células de algunos epitelios embrionarios, los filamentos de actina del cinturón adhesivo se acortan, por lo que a esa altura las células reducen su diámetro. Como consecuencia, las células pierden su forma cilíndrica y adquieren un aspecto piramidal, lo que lleva a que se genere un surco y luego un tubo separado del epitelio de origen (fig. 5-28).

5-23. En las células epiteliales los filamentos de actina transcelulares sirven para transportar organoides

Al igual que en todos los tipos de células, en las epiteliales los filamentos de actina transcelulares se hallan tendidos entre puntos opuestos de la membrana plasmática y entre ésta y la envoltura nuclear, de modo que atraviesan el citoplasma en múltiples direcciones (fig. 5-25). Asimismo, cerca de la envoltura nuclear existe una red de filamentos de actina que descansa sobre la malla perinuclear de filamentos intermedios (sección 5-2); a esa

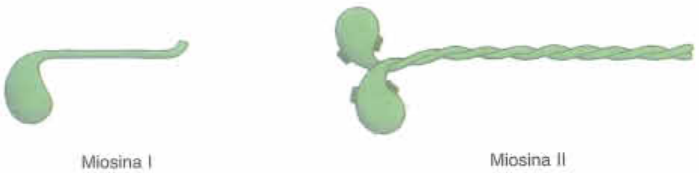


Fig. 5-29. Representación esquemática de la miosina I y la miosina II.

red se ligan los filamentos de actina que parten de la envoltura. En cambio, del lado de la membrana plasmática los filamentos transcelulares se conectan con los filamentos de actina corticales o se unen a proteínas membranosas especiales.

Los filamentos de actina transcelulares actúan como vías para transportar organoides por el citoplasma. Este transporte es mediado por las proteínas motoras miosina I y miosina V.

La **miosina I** posee una cabeza y una cola, pues uno de sus extremos es globular y el otro fibroso (fig. 5-29). Cuando esta proteína motora funciona, su cola se liga a la membrana del organoide que va a ser trasladado —por lo general una vesícula del sistema de endomembranas (cap. 7-1)— y su cabeza se une intermitentemente a un filamento de actina vecino, esto último porque la cabeza de la miosina I cambia de posición repetidamente. Las uniones y desuniones alternadas hacen que la miosina I se deslice en dirección del extremo [+] del filamento de actina (fig. 5-30).

Los cambios de posición de la cabeza —responsables de dicho deslizamiento— consumen ATP, que es hidrolizado a ADP y P por una ATPasa dependiente de Ca^{2+} situada en la propia cabeza. La miosina I se desplaza aproximadamente 10 nm por cada ATP que consume.

La **miosina V** "camina" sobre el filamento de actina, y cada "paso" que da la hace avanzar unos 37 nm. Su composición se analiza en la sección 5-28.

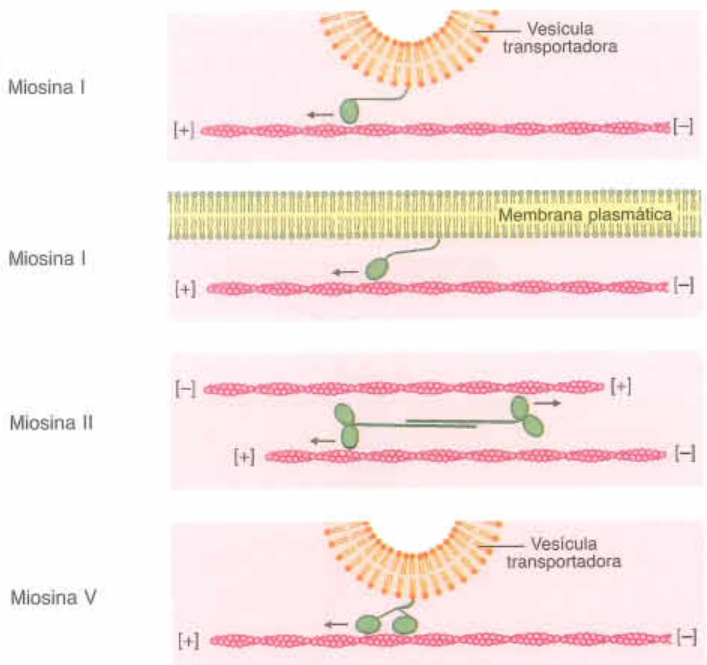


Fig. 5-30. Esquemas que ilustran el desplazamiento de las miosinas I, II y V sobre los filamentos de actina.

5-24. En las células conectivas los filamentos de actina transcelulares se llaman fibras tensoras

En las células conectivas la distribución de los filamentos de actina transcelulares —denominados **fibras tensoras**— es semejante a la indicada en la sección anterior, aunque aquí componen atados más gruesos y numerosos. En cada atado, la proteína ligadora **α-actinina** une a los filamentos de actina entre sí.

Además, cada filamento se liga a la membrana plasmática mediante una estructura conocida con el nombre de **contacto focal** (fig. 5-31). El extremo del filamento se conecta con una proteína transmembranosa heterodimérica llamada **integrina**, por medio de las proteínas ligadoras **talina**, **α-actinina**, **paxilina** y **vinculina**. El conjunto integrado por el extremo del filamento de actina, las proteínas ligadoras y la integrina constituye el contacto focal. En el capítulo 6-6 se verá que por su dominio externo la integrina se liga a una proteína de la matriz extracelular llamada **fibronectina**, y ésta a una **fibra de colágeno**.

Entre los filamentos de actina de las fibras tensoras se hallan numerosas unidades de la proteína motora **miosina II**, que se compone de dos polipéptidos pesados, cada uno combinado con dos polipéptidos livianos (fig. 5-29). Los seis polipéptidos generan una molécula fibrosa con dos cabezas en una de sus puntas, ya que en ella los polipéptidos pesados tienen una estructura globular. Como en la miosina I, las cabezas de la miosina II poseen actividad ATPasa y son responsables de las propiedades mecánicas de la molécula.

Las miosinas II no funcionan aisladas. Para poder actuar se asocian y forman conjuntos bipolares, con las colas de las moléculas fusionadas entre sí y las cabezas dirigidas hacia los extremos del conjunto (fig. 5-30). Las cabezas establecen uniones intermitentes con los filamentos de actina adyacentes. Dado que se deslizan sobre ellos en direcciones contrarias —hacia los respectivos extremos [+]— los tensan y generan fuerzas mecánicas en los contactos focales, lo cual, además de producir leves pero continuas deformaciones en la superficie celular, contribuye al establecimiento de la forma global de la célula. Es por estas propiedades que en las células conectivas los filamentos de actina transcelulares llevan el nombre de fibras tensoras. El mecanismo molecular que hace posible el deslizamiento de las miosinas II sobre los filamentos de actina será analizado en la sección 5-33, referida a la contractilidad muscular.

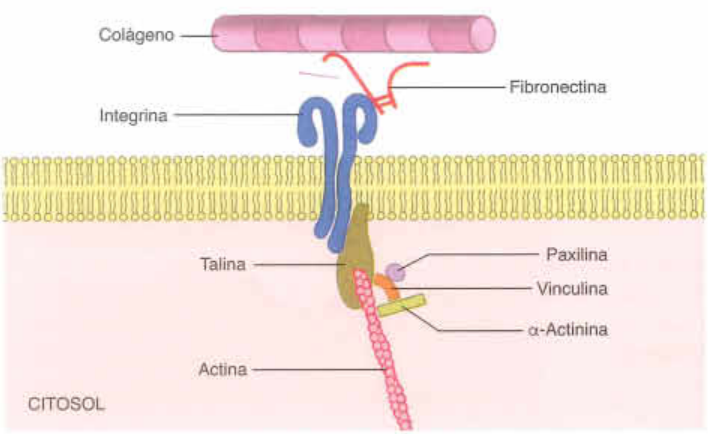


Fig. 5-31. Contacto focal y su conexión con elementos de la matriz extracelular mediante la proteína transmembranosa integrina.

Debe agregarse que las fibras tensoras y los contactos focales se forman mediante la inducción de la proteína **Rho** (por la letra griega ρ), que es miembro de una familia de GTPasas que actúan asociadas a las proteínas reguladoras GEF y GAP, de cuyo análisis nos ocuparemos en el capítulo 7-38.

De igual modo que en las células epiteliales, las fibras tensoras sirven como vías para transportar organoides por el citoplasma, con intervención de la **miosina I** y la **miosina V** (secciones 5-23 y 5-28).

5-25. En las células conectivas los filamentos de actina corticales experimentan incesantes modificaciones

En las células conectivas rodeadas por matriz extracelular los filamentos de actina corticales se distribuyen de una manera característica y además cambiante. Esto último origina modificaciones cíclicas en la consistencia de la zona periférica de las células, lo cual, junto con las tensiones en los contactos focales, produce los incesantes movimientos que se ven en la superficie celular.

Aquí los filamentos de actina arman una especie de andamio que incrementa la viscosidad del citosol, la que disminuye cuando el andamio se desarma a causa de la despolimerización de los filamentos de actina (fig. 5-32). Así, en la zona periférica de las células conectivas se alternan estados de mayor viscosidad (***gel***) con otros de menor viscosidad (***sol***), lo cual provoca cambios continuos en la forma de la superficie celular.

En la construcción del andamio interviene —además de la profilina (sección 5-18)— una proteína ligadora llamada **filamina** o **ABP** (por *actin-binding protein*), que une a los filamentos de actina entre sí (fig. 5-32). El andamio se desarma cuando actúa —antes de que lo hagan las proteínas despolimerizantes timosina y ADF— la **gelsolina**, una proteína dependiente de Ca^{2+} que fragmenta a los filamentos de actina (fig. 5-32).

5-26. Los filamentos de actina desempeñan funciones salientes durante la motilidad celular

La **migración celular** es un fenómeno muy común durante el desarrollo embrionario, decisivo no sólo para la formación de los tejidos y los órganos sino también para el ordenamiento y la orientación espacial de la mayoría de las estructuras corporales. En el organismo desarrollado la migración celular cumple importantísimas funciones vinculadas con su defensa y la reparación tisular.

A diferencia de las células musculares, en las cuales los filamentos de actina no se acortan ni se alargan, en las células locomotrices el citoesqueleto presenta un gran dinamismo, ya que la motilidad celular se debe a cambios continuos en sus componentes, que incluyen polimerizaciones y despolimerizaciones por parte de los filamentos de actina.

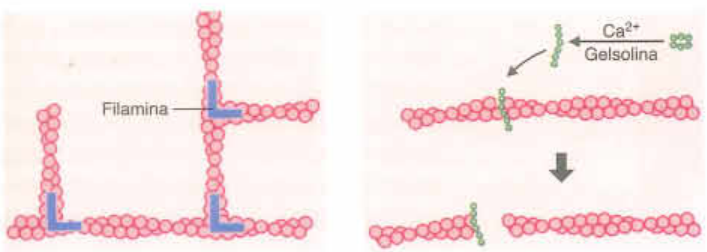


Fig. 5-32. Intervención de las proteínas filamina y gelsolina en el armado y el desarmado, respectivamente, de los andamios de actina en la corteza de las células conectivas.

La puesta en movimiento de las células epiteliales es algo más complicada que la de las células conectivas, pues para adquirir motilidad las primeras deben independizarse del epitelio originario y redistribuir sus filamentos de actina corticales y transcelulares hasta que queden como en las células conectivas.

Antes de ponerse en marcha, la célula migratoria adquiere un aspecto poligonal. Luego, a consecuencia de rápidas y extensas modificaciones en los filamentos de actina corticales, en el extremo de la célula correspondiente al futuro movimiento se forman varias láminas citoplasmáticas horizontales llamadas **lamelipodios**, de cuyos bordes libres nacen prolongaciones digitiformes denominadas **filopodios** (figs. 5-33 y 23-6). Tanto los lamelipodios como los filopodios alternan períodos de alargamiento con períodos de acortamiento, los cuales, como se verá, son esenciales para la motilidad celular.

La formación de los lamelipodios es inducida por la proteína **Rac** (por *related to the A and C kinases*), que como la Rho (sección 5-24) es miembro de una familia de GTPasas que son reguladas por las proteínas GEF y GAP (cap. 7-38)

Los lamelipodios surgen y se alargan por obra de la proteína reguladora **Arp2/3** (por *actin-related protein*), que induce la formación de armazones especiales de actina en la corteza celular. Como muestra la figura 5-34, la proteína Arp2/3 hace que los filamentos de actina se ramifiquen y —en colaboración con la profilina (sección 5-18)— que nuevas actinas G se agreguen en los extremos [+] de los filamentos, tanto en los preexistentes como en sus ramas. La figura 5-34 muestra también que los armazones son aplanados y que cada rama de actina compone con el filamento de origen un ángulo de 70°.

El acortamiento de los lamelipodios se debe al desarme de tales armazones, causado por las proteínas reguladoras timosina, ADF y gelsolina (secciones 5-18 y 5-25).

Además de alargarse y acortarse, los lamelipodios se mueven permanentemente, lo cual es posible porque en sus raíces hay moléculas de **miosina II** diméricas que hacen deslizar a los filamentos de actina en direcciones opuestas (fig. 5-30).

La formación de los filopodios es inducida por la proteína **Cdc42** (por *cell-division cycle*), que al igual que las proteínas Rho y Rac pertenece a una familia de GTPasas reguladas por las proteínas GEF y GAP (cap. 7-38).

Debe agregarse que durante la migración celular las proteínas Rho, Rac y Cdc42 funcionan coordinadamente. Lo hacen tras recibir "órdenes" de receptores localizados en la membrana plasmática, los cuales se activan cuando son inducidos por moléculas extracelulares implicadas en la estimulación de la motilidad. Puede decirse, entonces, que las proteínas Rho, Rac y Cdc42 funcionan como eslabones entre las señales extracelulares y los componentes del citoesqueleto involucrados en la migración.

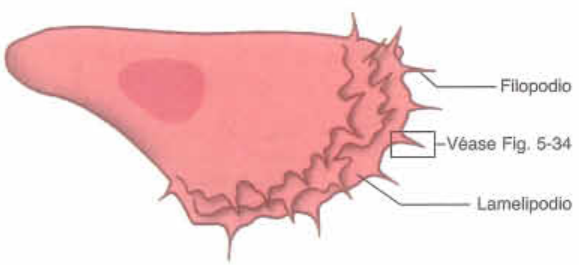


Fig. 5-33. Representación de una célula en movimiento.

Los alargamientos y acortamientos de los filopodios se explican por la presencia en sus ejes de haces de filamentos de actina que alternan ciclos de polimerización con ciclos de despolimerización (fig. 5-34). Los filamentos parten del borde libre de los lamelipodios y terminan en la membrana plasmática de la punta de los filopo-

dios, en la que se anclan mediante contactos focales. Además, se unen entre sí por medio de una proteína ligadora llamada **fimbrina**, y los más periféricos se conectan con la membrana plasmática del filopodio por intermedio de la **miosina I**. Esta proteína motora se une a los filamentos y a la membrana a través de su cabeza y de su cola, respectivamente (fig. 5-30). La miosina I movería al filopodio o cumpliría una función reguladora durante el alargamiento o el acortamiento de los filamentos de actina.

5-27. Los desplazamientos celulares son guiados por haptotaxis y quimiotaxis

La migración celular es consecuencia de los siguientes fenómenos. En primer lugar los filopodios se alargan. Luego, a través de sus puntas —pobladas de contactos focales— algunos se anclan en fibras colágenas de la matriz extracelular mediante moléculas de fibronectina (caps. 6-4 y 6-5). A continuación, mientras los filopodios anclados se acortan —lo cual tracciona a la célula hacia los puntos de anclaje—, otros filopodios se alargan y se anclan en fibras colágenas situadas más adelante en la matriz extracelular. Finalmente, los primeros filopodios se desprenden de las fibras colágenas y los segundos se acortan, de modo que la célula avanza un poco más. La migración celular resulta de la reiteración de estos episodios. Como se ve, el anclaje de los filopodios en los elementos fijos de la matriz extracelular —es decir, en las fibras colágenas— es transitorio, suficiente para que la célula pueda ser traccionada. Si el anclaje persistiera, el avance celular se detendría.

Lejos de vagar sin rumbo, las células se desplazan hasta sus puntos de destino siguiendo itinerarios predeterminados, y no se detienen antes de alcanzarlos ni avanzan más allá. Los derroteros son marcados por algunos componentes de la matriz extracelular aledaños a la célula en movimiento, por ejemplo, la concentración y la orientación de las fibronectinas que se hallan en los lugares de paso. Estas moléculas tendrían funciones relevantes durante la migración celular, pues fijarían los itinerarios al orientarse adecuadamente y concentrarse en proporciones crecientes a lo largo de las rutas. La locomoción celular guiada por gradientes de concentración de moléculas no solubles en el medio extracelular —como ocurre con la fibronectina— se denomina **haptotaxis** (del griego *háptein*, enganchar, y *taxis*, colocación).

Las sutiles señales posicionales emanadas de las fibronectinas son tanteadas por las células en movimiento, para lo cual sus filopodios se extienden y retraen (crecen y se acortan) como si estuvieran "olfateándolas". Cuando los filopodios "perciben" las señales correctas, se adhieren al colágeno; si no, continúan "explorando" el medio extracelular hasta dar con ellas.

Los desplazamientos de las células son también dirigidos por sustancias solubles emitidas por otras células —a veces distantes—, que pueden provocar su atracción o su repulsión. Si existe atracción, el fenómeno lleva el nombre de **quimiotaxis**, que define la conducción de las células migra-

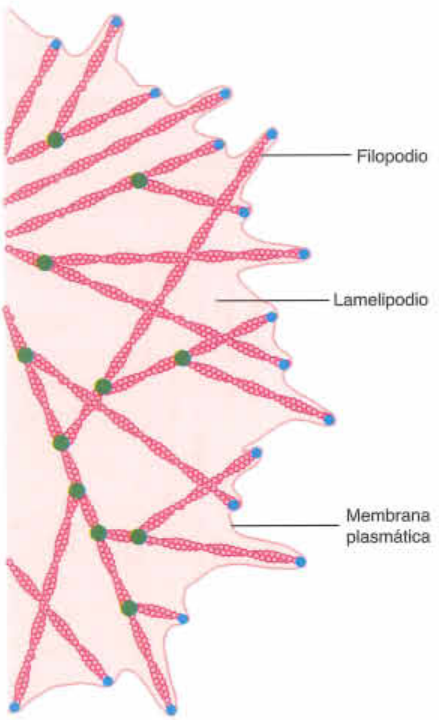


Fig. 5-34. Dinámica de los filamentos de actina en los lamelipodios y los filopodios. Los puntos de ramificación y de polimerización han sido marcados con *círculos verdes* y *círculos azules*, respectivamente. En ambos interviene la proteína reguladora Arp2/3, que a nivel de los puntos de ramificación hace que se formen ángulos de 70° entre los filamentos y sus ramas.

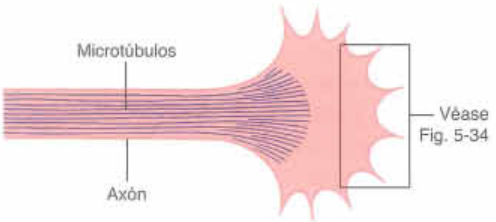


Fig. 5-35. Dibujo que ilustra el extremo del axón con su cono de crecimiento.

torias hacia el lugar de mayor concentración de la sustancia soluble. Se ha comprobado que las sustancias quimiotácticas estimulan —en la membrana plasmática de las células en movimiento— a receptores que ponen en marcha señales intracelulares que activan a la proteína Arp2/3. El fenómeno opuesto a la quimiotaxis, es decir, la **quimiorrepulsión**, depende de una proteína denominada **semaforina**.

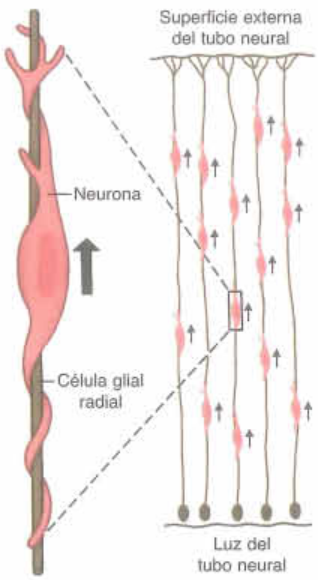
Los mecanismos por los cuales las células migratorias reconocen a otras células en sus lugares de destino y se establecen en ellos se analizan en los capítulos 6-8 y 6-9.

5-28. El avance de los axones presenta algunas semejanzas con la motilidad celular

Como se sabe, las neuronas se hallan conectadas entre sí y con las células musculares y secretorias por medio de prolongaciones citoplasmáticas llamadas axones. Las células así conectadas pueden estar separadas por distancias considerables, y la mayoría de las conexiones se establecen durante el desarrollo embrionario.

Cualquiera que sea la distancia que las separa, generalmente la neurona no necesita migrar para tomar contacto con la otra célula; sólo crece su axón, por lo que su cuerpo permanece en el sitio inicial. Para poder alargarse y avanzar, el axón desarrolla en su extremo distal (que es el área que toma contacto con la otra célula) una especialización llamada **cono de crecimiento**, análoga a la región frontal de las células migratorias, pero con filopodios bastante más largos (fig. 5-35). Las raíces de éstos contienen **miosina V**, que como se vio en la sección 5-23 es una proteína motora que en el citoplasma transporta organoides. La miosina V es doble como la miosina II, pero posee doce polipéptidos livianos en lugar de cuatro y no forma conjuntos bipolares (fig. 5-30). La semejanza del cono de crecimiento con la célula migratoria alcanza a los factores que rigen su avance por la matriz extracelular.

Fig. 5-36. Traslado de determinadas neuronas a través de la pared del tubo neural primitivo, guiadas por células gliales radiales.



En la sección 5-9 se analizaron la función que desempeñan los microtúbulos durante el alargamiento del axón y la participación de la proteína motora dinamina en la migración del cono de crecimiento.

5-29. Durante la histogénesis del sistema nervioso central algunas neuronas migran conducidas por las células gliales radiales

Durante la histogénesis del sistema nervioso central algunas neuronas del tubo neural primitivo deben migrar desde las cercanías de la luz del tubo hasta lugares próximos a su superficie externa. Tales migraciones se producen, por ejemplo, cuando se forman la corteza cerebral y la corteza cerebelosa.

Los mecanismos que hacen posible el traslado de estas neuronas difieren de los descritos hasta aquí. Como muestra la figura 5-36, intervienen elementos de la neuroglia —las llamadas **células gliales radiales**—, que transitoriamente forman soportes filamentosos sobre los cuales las neuronas "reptan" hacia sus puntos de destino. Dichos soportes son finas prolongaciones citoplasmáticas emitidas por las células gliales radiales,

que como rayos recorren la pared del tubo neural primitivo desde su luz central hasta su superficie externa.

No se conoce el mecanismo migratorio, aunque se ha descubierto una proteína que permite el establecimiento de uniones intermitentes entre la membrana plasmática de la neurona y la membrana plasmática de la célula glial radial, imprescindibles para la reptación. La proteína se llama **astrotactina** en virtud de que las células radiales se convierten en astrocitos una vez terminada la migración.

5-30. En los cultivos de tejidos se produce la llamada inhibición por contacto

A medida que van ocupando los lugares vacíos, las células que se reproducen en los cultivos de tejidos migran y establecen contactos con sus vecinas. No obstante, cuando una célula queda rodeada por otras, deja de dividirse y pierde su motilidad. Este fenómeno —denominado **inhibición por contacto**— ocurre en todas las células del cultivo, por lo que terminan formando una monocapa celular característica. Debe señalarse que las células cancerosas cultivadas no experimentan esta clase de inhibición y, dado que se siguen dividiendo y moviendo, se apilan unas sobre otras hasta formar masas irregulares de varias capas de profundidad (fig. 5-37).

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE BIBLIOTECA FILIAL CIUDAD DEL ESTE

5-31. Los filamentos de actina intervienen en la citocinesis

La citocinesis tiene lugar en las postrimerías de la mitosis, al formarse un **anillo contráctil** compuesto por filamentos de actina y **miosinas II** por debajo de la membrana plasmática en la zona ecuatorial de la célula en división (cap. 18-20) (fig. 18-7). Al igual que en las fibras tensoras, las miosinas II son diméricas y se hallan entre los filamentos de actina del anillo. La citocinesis se produce a raíz de que cada miosina II se desliza sobre dos filamentos de actina en direcciones contrarias. La suma de estos deslizamientos hace aparecer un surco en la superficie celular, que al profundizarse genera un estrangulamiento que culmina con la partición de la célula (fig. 18-8).

Debe señalarse que la progresiva reducción del diámetro del anillo contráctil no se acompaña de un aumento de su grosor, lo que indicaría que los filamentos de actina se van despolimerizando a medida que la célula se estrangula.

5-32. En las microvellosidades existen filamentos de actina estables

Las **microvellosidades** son proyecciones citoplasmáticas nacidas de la superficie celular, rodeadas por membrana plasmática (figs. 1-6 y 5-38). Se encuentran en muchos tipos celulares, pero están especialmente desarrolladas en algunos epitelios. Debido a que incrementan la superficie de la membrana

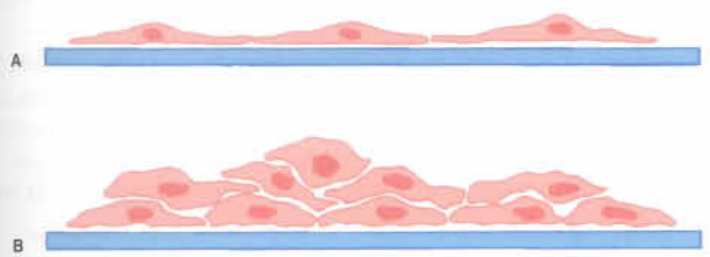


Fig. 5-37. A. Crecimiento normal, sobre un sustrato sólido, de las células en cultivo. Cuando estas células toman contacto con sus vecinas pierden su motilidad, dejan de multiplicarse y forman una monocapa característica. **B.** En circunstancias similares, las células cancerosas no se inmovilizan ni dejan de multiplicarse, por lo que forman multicapas.

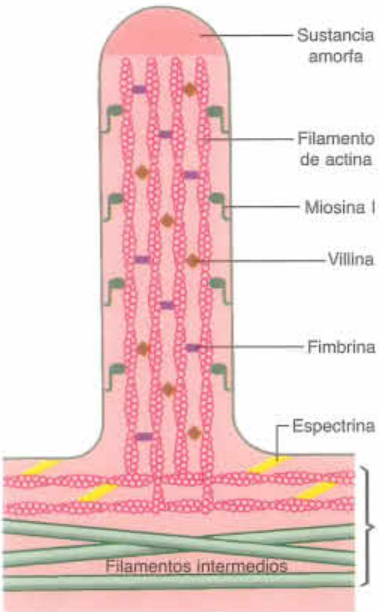


Fig. 5-38. Representación esquemática de una microvellosidad. En la corteza de la célula se señalan, con una llave, los componentes de la *membrana terminal* (véase fig. 6-8).

plasmática, permiten una mayor absorción de agua y de solutos por parte de la célula.

El diámetro de las microvellosidades es de 0,08 μm y su longitud promedio es de 1 μm. El eje citosólico de cada microvellosidad está constituido por una matriz que contiene 20 a 30 filamentos de actina paralelos, cuyos extremos [–] y [+] se hallan en la raíz y en la punta de la microvellosidad, respectivamente. Dado que no se alargan ni se acortan, se dice que estos filamentos de actina son estables.

La punta de la microvellosidad está ocupada por un fluido citosólico amorfo en el que se hallan inmersos los extremos [+] de los filamentos de actina. En cambio, en la raíz de la microvellosidad los extremos [–] se conectan con los filamentos de actina corticales, que aquí descansan sobre una delgada red de filamentos intermedios (fig. 5-38). Además, los filamentos de actina corticales están conectados entre sí y con la membrana plasmática mediante moléculas de **espectrina**, equivalentes a las fodrinas descritas en la sección 5-20.

Los filamentos de actina y los filamentos intermedios componen un enrejado por debajo de la membrana plasmática que lleva el nombre de **membrana terminal**, desde la cual nacen los filamentos de actina que ingresan en las microvellosidades (fig. 5-38). Es necesario agregar que en las células epiteliales el perímetro de la membrana terminal se continúa con los filamentos de actina del cinturón adhesivo (sección 5-21 y cap. 6-12) (fig. 6-8).

Volviendo al eje de la microvellosidad, sus filamentos de actina se unen entre sí por medio de dos proteínas ligadoras, la **villina** y la **fimbrina** (fig. 5-38). Además, los filamentos de actina más periféricos se conectan con proteínas integrales de la membrana plasmática por intermedio de moléculas de **miosina I**. Se desconoce por qué esta proteína motora se localiza en una estructura celular inmóvil.

5-33. En la contractilidad de las células musculares estriadas intervienen filamentos de actina y varias proteínas accesorias

El músculo estriado está constituido por células (o fibras) cilíndricas de 10 a 100 μm de diámetro y varios milímetros o centímetros de longitud. Los componentes del citoesqueleto comprometidos en la actividad mecánica de estas células forman estructuras regulares y estables, adaptadas para acortarse durante la contracción y alargarse en los períodos de reposo.

El músculo constituye uno de los ejemplos más claros de asociación morfofuncional y de cómo, en una célula, la energía química puede traducirse en trabajo mecánico. Las células musculares estriadas poseen un diseño tan eficiente que son capaces de contraerse y relajarse cien o más veces por segundo y de producir un trabajo mil veces superior a su propio peso.

La maquinaria contráctil de las células musculares está representada por unas estructuras regulares derivadas del citoesqueleto, las **miofibrillas** (fig. 5-39). Estas son tan largas como las propias células y se disponen paralelamente una al lado de la otra. El grosor de cada miofibrilla es de 1 a 2 μm. Su largo y su número dependen de la longitud y del diámetro de la célula muscular, respectivamente.

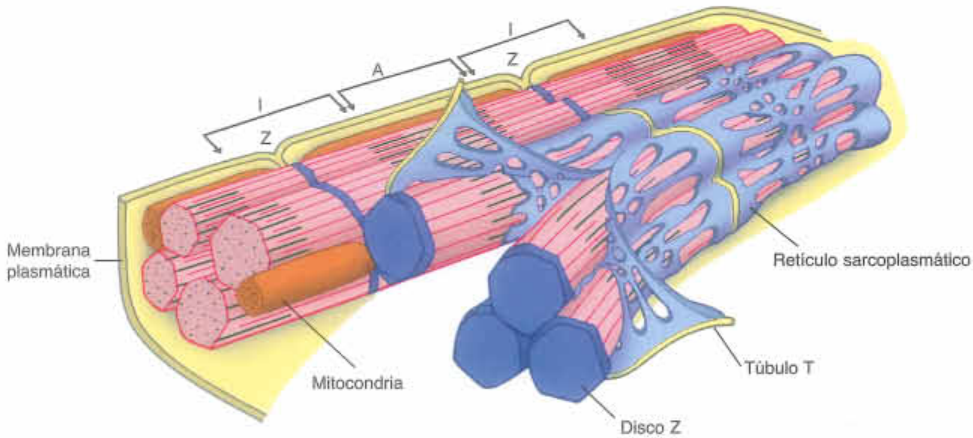


Fig. 5-39. Fibras del músculo estriado en las que se ilustran las miofibrillas con sus sarcómeros (obsérvense las bandas A e I y los discos Z), el retículo sarcoplasmático y la membrana plasmática. Los túbulos T son invaginaciones de la membrana plasmática que se vinculan con el retículo sarcoplasmático, organizadas para conducir impulsos desde la superficie de la célula al interior de ésta, a fin de que todas las miofibrillas se contraigan sincrónicamente.

La miofibrilla está compuesta por una sucesión lineal de unidades contráctiles denominadas **sarcómeros** (figs. 5-40 y 5-41), de 2,2 μm de longitud y un ancho equivalente al de la miofibrilla, de 1 a 2 μm. Con el microscopio electrónico se observa que entre los sarcómeros existe una estructura electrodensa, el ***disco Z***, localizada en medio de una región poco densa, la ***banda I*** (por *isotrópica*) (fig. 5-41). A lo largo de las miofibrillas las bandas I se alternan con otras más densas, las ***bandas A*** (por *anisotrópica*), y en la parte media de éstas se distingue una zona de menor densidad —la ***banda H***— dividida a su vez por la ***línea M***, más densa que la H.

Las distintas bandas resultan de la variación periódica en la superposición de las proteínas citoesqueléticas a lo largo de las miofibrillas. Como cada banda se encuentra a la misma altura en todas las miofibrillas, en conjunto generan una alternancia de zonas de diferente densidad, que es la que le confiere la designación de estriado a esta clase de músculo.

En la figura 5-40 se muestra la estructura básica de un sarcómero, en el que se observa a los filamentos de actina naciendo de los discos Z y a fibras gruesas bipolares —de **miosina II**— entre dichos filamentos. El extremo de los filamentos de actina que se une al disco Z es el [+]. En los cortes trans-

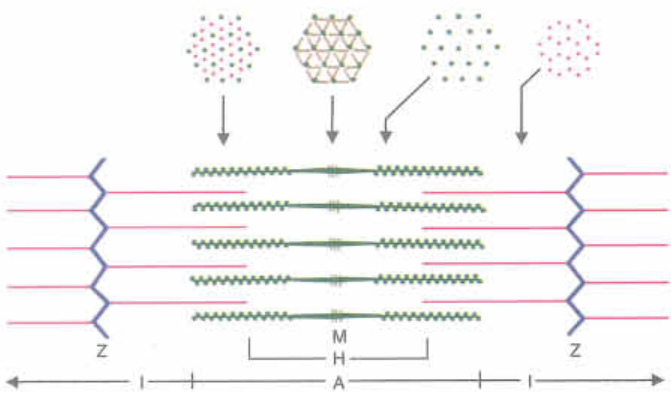


Fig. 5-40. Arriba. Representación de un corte longitudinal del sarcómero. **Abajo.** Cortes transversales en las distintas regiones del sarcómero. Obsérvese que las bandas I tienen sólo filamentos de actina, las bandas H, sólo miosina II, y las bandas A, filamentos de actina y miosina II.

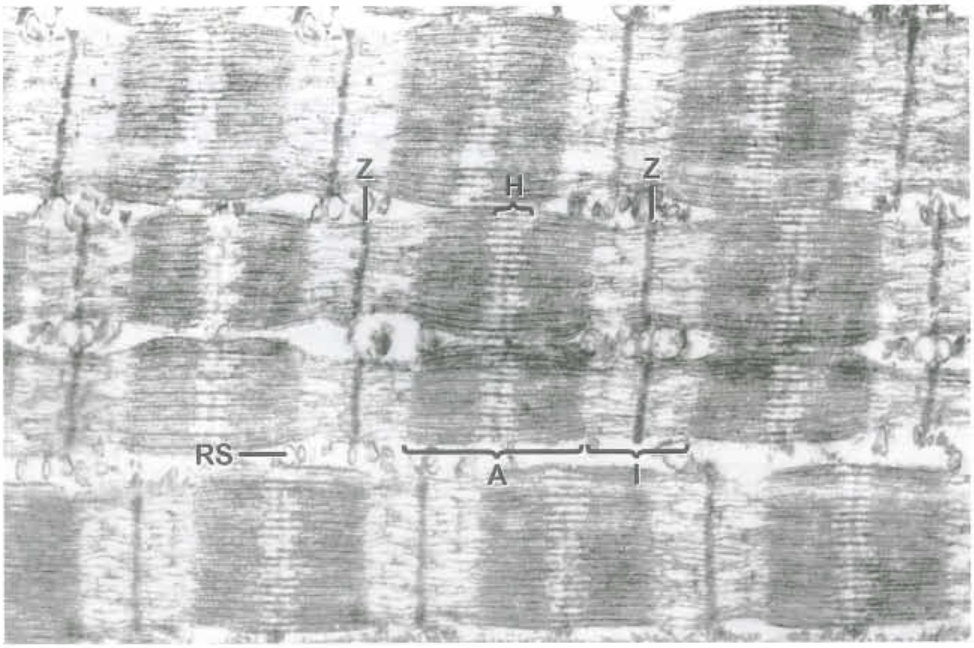


Fig. 5-41. Micrografía electrónica de cuatro miofibrillas en las que se observan los sarcómeros, con los discos Z y las bandas H, A e I. Se aprecia también el retículo sarcoplasmático (*RS*) entre las miofibrillas. 60.000×. (Cortesía de H. Huxley.)

versales se comprueba que la banda I contiene únicamente filamentos de actina, la banda H sólo fibras de miosina II, y la banda A ambos componentes. En la banda A cada fibra gruesa de miosina aparece rodeada por seis filamentos de actina, y cada uno de éstos por tres fibras de miosina; por consiguiente, el número de filamentos de actina duplica al de fibras de miosina. Por otro lado, los cortes transversales a nivel de la línea M revelan la existencia de puentes proteicos entre las fibras de miosina.

Es necesario describir cómo se asocian los monómeros de miosina II para formar las fibras gruesas interpuestas entre los filamentos de actina. Cada una de estas fibras se halla integrada por numerosas moléculas de miosina II, cuya combinación da lugar a una estructura bipolar con forma de vara (fig. 5-42). Esta exhibe una zona "lisa" en medio de dos regiones "rugosas", que se ven así por la presencia de las cabezas de las miosinas II, las cuales se proyectan desde la fibra como si fueran brazos (la figura 5-43 muestra que la zona "lisa" corresponde a la banda H del músculo contraído). En la figura 5-42 puede observarse que las cabezas de las miosinas II están opuestamente orientadas en las dos regiones rugosas, lo que le da a la fibra gruesa su condición bipolar.

Las cabezas de las miosinas II surgen del eje fibroso a intervalos regulares de 7 nm y con una diferencia angular entre ellas de 60°, por lo que en conjunto describen, a lo largo de dicho eje, una trayectoria helicoidal (fig. 5-42). Debido a esta disposición, cada fibra de miosina II interactúa simultáneamente con los seis filamentos de actina que la rodean (fig. 5-40).

Los cambios que ocurren en el sarcómero durante la contracción de la célula muscular pueden observarse con los microscopios de fase y de interferencia (caps. 23-7 y 23-8). La banda A no se modifica, pero las hemibandas I se acortan en forma proporcional al grado de contracción. El acortamiento de las hemibandas I se debe a que los discos Z se acercan mutuamente. Al ha-

cerlo empujan a los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero, de manera que las áreas de superposición de los filamentos de actina con las fibras de miosina II se amplían (fig. 5-43). Si la contracción se acentúa, los extremos libres de los filamentos de actina pueden llegar hasta la línea M (fig. 5-43). Todos estos fenómenos se revierten durante la relajación.

Los desplazamientos observados durante la contracción se deben a que las cabezas de las fibras de miosina se deslizan activamente sobre los filamentos de actina. Para ello, cada cabeza se flexiona en relación al tallo fibroso, como si entre ella y el tallo hubiera una bisagra (fig. 5-44).

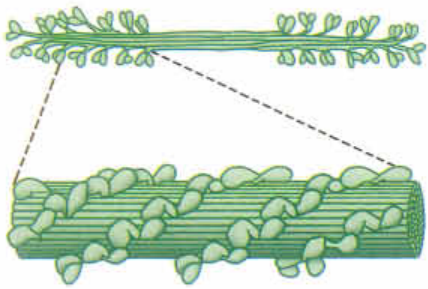


Fig. 5-42. Estructura bipolar con forma de vara, integrada por numerosas moléculas de miosina II. Se ilustran también las cabezas de las miosinas surgiendo del eje de la vara a intervalos regulares.

En el músculo en reposo, las cabezas de las miosinas están separadas de los filamentos de actina (fig. 5-44A). Ante la llegada de un estímulo apropiado, la contracción muscular se produce a consecuencia de los siguientes cambios moleculares en las cabezas de las miosinas: 1) se adhieren a los filamentos de actina (fig. 5-44B); 2) se flexionan y avanzan un pequeño tramo hacia los extremos fijos de los filamentos, lo cual arrastra a los discos Z de ambos lados del sarcómero hacia la parte central del mismo (fig. 5-44C); 3) se desconectan de los filamentos de actina y se enderezan (fig. 5-44D); 4) vuelven a unirse a los respectivos filamentos, pero ahora a los monómeros de actina contiguos y más cercanos al disco Z (fig. 5-44E); 5) vuelven a flexionarse, por lo que los filamentos de actina y los discos Z se corren un poco más hacia la parte central del sarcómero (fig. 5-44F); 6) vuelven a separarse, y así repetidamente.

Debido a que cada miosina II posee muchas cabezas, a que hay muchas fibras gruesas, a que éstas son bipolares y a que los episodios relatados en el párrafo anterior se repiten muchas veces, los filamentos de actina de ambas mitades del sarcómero —con sus respectivos discos Z— se acercan mutuamente y el sarcómero se acorta (fig. 5-43).

La contracción de una célula muscular es el resultado de la suma de los acortamientos de todos los sarcómeros de todas las miofibrillas. A su vez, la contracción global del músculo es consecuencia de la suma de las contracciones individuales de todas sus células.

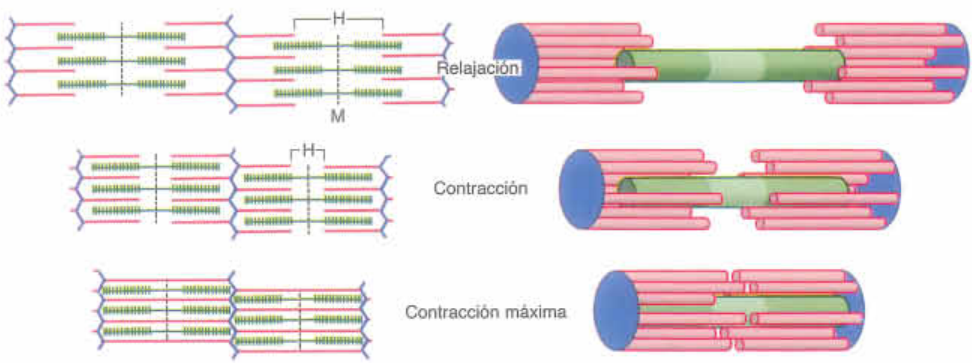


Fig. 5-43. Izquierda. Esquemas que muestran, en un conjunto de seis sarcómeros, el mecanismo de relajación-contracción del músculo estriado. Durante la relajación la bandas H se amplían. Durante la contracción los filamentos de actina se deslizan hacia las líneas M y el ancho de las bandas H se reduce. Con la contracción máxima los extremos libres de los filamentos de actina pueden llegar hasta las líneas M. **Derecha.** Esquemas tridimensionales de un sarcómero del músculo estriado en estados de relajación, contracción y contracción máxima.

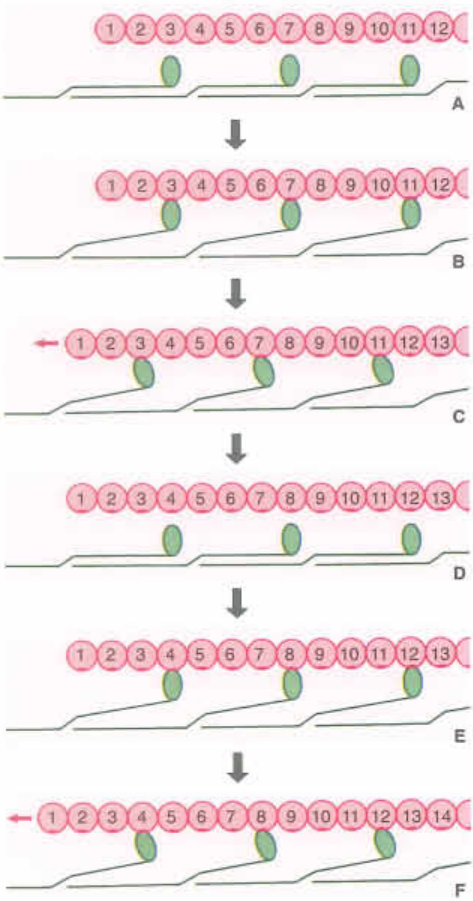


Fig. 5-44. Interpretación esquemática del deslizamiento de las cabezas de las miosinas II sobre el filamento de actina. **A.** Durante la relajación muscular las cabezas no están unidas al filamento. **B.** Al comienzo de la contracción las cabezas toman contacto con el filamento. **C.** Un cambio de forma en las cabezas hace que el filamento de actina se corra hacia el centro del sarcómero. **D.** Al final de este movimiento, las cabezas se separan y se enderezan. **E.** Toman nuevamente contacto con el filamento de actina, pero ahora con los monómeros contiguos y más cercanos al disco Z. **F.** Vuelven a flexionarse, desplazando un poco más a los filamentos de actina y a los discos Z hacia la parte central del sarcómero.

La energía requerida para la actividad mecánica de las cabezas de la miosina II es proporcionada por el ATP, que es hidrolizado por una ATPasa presente en dichas cabezas. Se calcula que la energía aportada por un ATP es suficiente para desplazar a los filamentos de actina entre 5 y 10 nm.

La flexión de las cabezas de la miosina II es desencadenada por el Ca^{2+}, cuya concentración aumenta en el citosol cuando la célula muscular es inducida a contraerse (cap. 7-26). Dicha flexión es controlada por las proteínas reguladoras **tropomiosina**, **troponina I**, **troponina C** y **troponina T**, las cuales se hallan junto a los filamentos de actina (fig. 5-45). Las tres troponinas forman un complejo que se mantiene unido gracias a la troponina T.

En el músculo en reposo la tropomiosina se encuentra sobre los filamen-

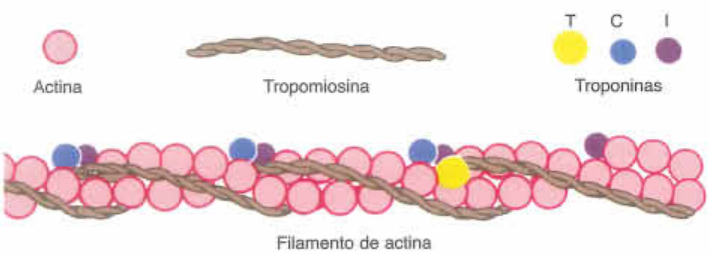


Fig. 5-45. Esquema que muestra la estructura molecular del filamento de actina del sarcómero, junto a algunas proteínas reguladoras de la contracción muscular.

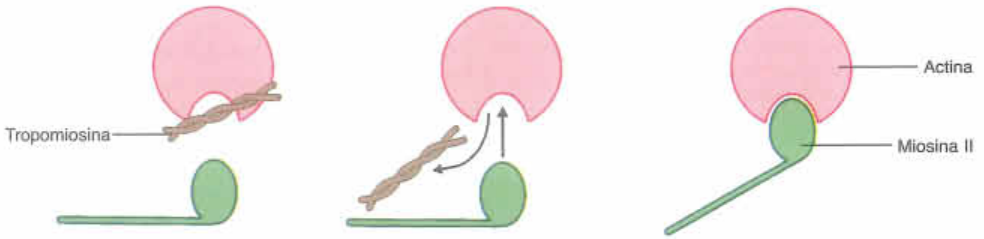


Fig. 5-46. Desplazamiento de la tropomiosina antes de la unión de la cabeza de la miosina II con el filamento de actina (véase fig. 5-44B).

tos de actina en una posición tal que impide la unión de las cabezas de la miosina II con dichos filamentos (fig. 5-46). Esa posición es controlada por la troponina I, así llamada porque inhibe el corrimiento de la tropomiosina.

El aumento de Ca^{2+} en el citosol hace que el ion se una a la troponina C (ésta es semejante a la proteína **calmodulina**, que analizaremos en el capítulo 11-18). El complejo Ca^{2+}-troponina C bloquea la acción de la troponina I, lo que permite que la tropomiosina cambie de posición con respecto a los filamentos de actina y las cabezas de la miosina II puedan unirse a ellos. La figura 5-46 muestra esa reacción; obsérvese a la molécula de tropomiosina en sus dos posiciones, correspondientes a los estados de relajación y de contracción del músculo.

En los discos Z se encuentra la proteína ligadora **α-actinina**. En ella se anclan no sólo los filamentos de actina sino también los de **titina**, una proteína ligadora que se extiende hasta el centro del sarcómero, es decir, hasta la línea M (fig. 5-47). La titina desempeña dos funciones: mantiene a la fibra de miosina II en su posición y, debido a que tiene un segmento que se comporta como un resorte, restablece la longitud de reposo de la célula durante la relajación muscular. La titina es la proteína más grande detectada en el organismo humano; pesa nada menos que 3.000 kDa y está compuesta por una cadena lineal de casi 27.000 aminoácidos.

Cada filamento de actina se halla asociado a otra proteína gigante llamada **nebulina**, que tiene por función determinar el largo del filamento durante la miogénesis y conferirle rigidez (fig. 5-47).

Las miofibrillas se hallan unidas por sus lados mediante filamentos intermedios de **desmina** (sección 5-3). Gracias a ellos se evita la pérdida del alineamiento de los sarcómeros en el interior de las células musculares ante las fuertes tensiones mecánicas a que están sometidas.

Finalmente, por debajo de la membrana plasmática la célula muscular posee la proteína ligadora **distrofina**. Es semejante a la espectrina (sección 5-32) y conecta a los filamentos de actina localizados en la periferia de la cé-

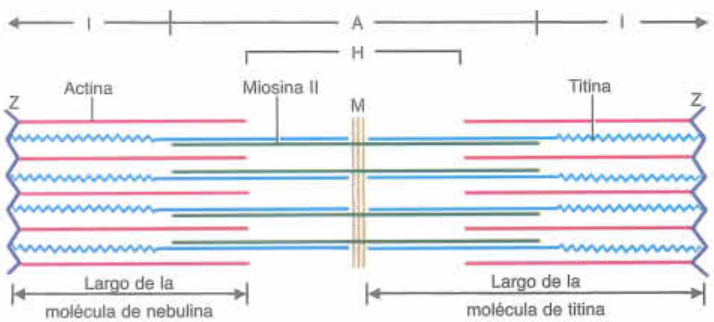


Fig. 5-47. Representación esquemática parcial del sarcómero, que incluye las moléculas de titina. Se señala el largo relativo de las moléculas de nebulina.

lula con un complejo de proteínas membranosas llamadas ***distroglicanos*** y ***sarcoglicanos***. A su vez, este complejo se une a la **laminina** de la lámina basal que rodea a la célula (cap. 6-1). Diversas anomalías en la distrofina o en alguna de las proteínas asociadas —a consecuencia de alteraciones genéticas— dan lugar a enfermedades conocidas como ***distrofias musculares***. Se caracterizan por la degeneración progresiva de los músculos, lo cual puede hacer claudicar las funciones cardíaca y pulmonar, y llevar a la muerte.

5-34. En la contractilidad de las células musculares cardíacas participan estructuras similares a las del músculo estriado

Una de las diferencias más notables entre las células musculares esqueléticas y las células musculares cardíacas es la presencia en éstas de los **discos intercalares**, encargados de unir a las células cardíacas por sus extremos. Estos discos se comportan como si fueran discos Z, pues de ellos nacen los filamentos de actina y de titina.

Los discos intercalares contienen **desmosomas** (cap. 6-13); éstos se asocian a filamentos intermedios de **desmina** que derivan de los que unen a las miofibrillas entre sí, mencionados en la sección anterior. Además poseen **uniones comunicantes** (cap. 6-14), necesarias para sincronizar las contracciones de las células miocárdicas.

5-35. En las células musculares lisas el aparato contráctil es relativamente sencillo

El aparato contráctil de las células musculares lisas se asemeja al conjunto de **fibras tensoras** transcelulares presentes en las células conectivas (sección 5-24), con la diferencia de que en las musculares los haces de filamentos de actina son mucho más gruesos y más numerosos. Además, las partes intermedias de los filamentos de actina son reemplazadas por filamentos intermedios de **desmina** (fig. 5-48), cuya presencia impide que se comprima la zona central de la célula, donde se halla el núcleo y se refugian los componentes citoplasmáticos más delicados para protegerse de la contracción.

5-36. El citoesqueleto del eritrocito posee características singulares

La composición del citoesqueleto del eritrocito presenta diferencias en comparación con el citoesqueleto de las otras células.

Como muestra la figura 5-49, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del eritrocito existe una malla fibrilar integrada principalmente por filamentos de **espectrina**, que es una proteína similar a la fodrina (sección 5-20). Se trata de un heterodímero compuesto por dos polipéptidos largos entrelazados, llamados α y β (o banda 1 y banda 2, respectivamente). Dado que los dímeros se conectan por sus puntas, se forman tetrámeros, cuyos extremos se unen a **filamentos de actina cortos** (o banda 5).

La figura 5-49 permite ver que cada filamento de actina se conecta con va-

Fig. 5-48. Citoesqueleto de la célula muscular lisa. Los filamentos intermedios de desmina, situados entre los filamentos de actina, protegen al núcleo y a los componentes citoplasmáticos durante la contracción.

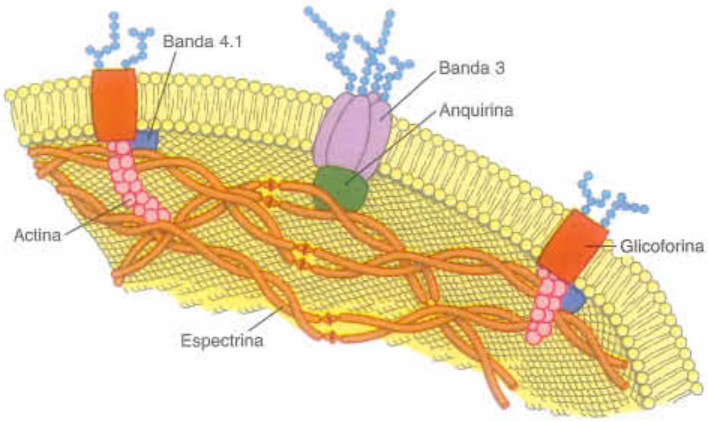


Fig. 5-49. Ilustración de los componentes principales del citoesqueleto y de la membrana plasmática del eritrocito.

rias espectrinas tetraméricas; tales conexiones son mediadas por la proteína ligadora **aducina**. Muestra también que los filamentos de actina se unen a una glicoproteína transmembranosa llamada **glicoforina** mediante la proteína ligadora **banda 4.1**.

Además, el filamento de actina se halla asociado a otras dos proteínas: la **tropomodulina**, que determinaría su longitud, y la **tropomiosina**, cuya función se desconoce.

Cerca de su parte media cada tetrámero de espectrina se conecta con la proteína transmembranosa **banda 3**, que es el contratransportador de Cl^- y HCO_3^- descrito en el capítulo 3-17. En esta unión interviene la proteína ligadora **anquirina**.

Es preciso señalar que el conjunto de este sistema de proteínas citoesqueléticas y membranosas le confiere al eritrocito su forma bicóncava y la flexibilidad necesaria para poder circular por los capilares sanguíneos de diámetros menores que el suyo.

BIBLIOGRAFIA

Adams D.S. (1992) Mechanisms of cell shape change: the cytomechanics of cellular response to chemical environment and mechanical loading. J. Cell Biol. 117:83.

Aldaz H., Rice L.M., Stearns T. and Agard D.A. (2005) Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of hurnan gamma-tubulin. Nature 435:523.

Allan V. (1996) Motor protein: a dynamic duo. Curr. Biol. 6:630.

Avila J. (1991) Microtubule functions. Life Sci. 50:327.

Belmont L. and Mitchison T. (1996) Catastrophic revelations about Op18 stathmin. TIBS 21:197.

Bennett V. (1992) Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and cytoplasm. J. Biol. Chem. 267:8703.

Burton K. (1992) Myosin step size: estimates from motility assays and shortening muscle. J. Muscle Res. Cell Mot. 13:590.

Carlier M.F. (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. J. Biol. Chem. 266:1.

Fuchs E. and Cleveland D.W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 279:514.

Geisler N., Kaufmann E. and Weber K. (1985) Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments. J. Mol. Biol. 182: 173.

Hib J. (2009) Histología de Di Fiore. Texto y atlas. 2ª Ed. Editorial Promed, Buenos Aires.

Hirokawa N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 279:519.

Isenberg G. and Goldmann W.H. (1992) Actin-membrane coupling: a role for talin. J. Muscle Res. Cell Mot. 13:587.

Kashina A.S. et al. (1996) A bipolar kinesin. Nature 379:270.

Kumar J., Yu H. and Sheetz M.P. (1995) Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. Science 267:1834.

Labeit S. and Kolmerer B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. Science 270:293.

Luna E.J. and Hitt A.L. (1992) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. Science 258:955.

MacRae T.H. (1992) Towards an understanding of microtubule function and cell organization: an overview. Biochem. Cell Biol. 70:835.
MacRae T.H. (1992) Microtubule organization by cross-linking and bundling proteins. Biochem. Biophys. Acta 1160:145.
Murphy S.M. and Stearns T. (1996) Cytoskeleton: microtubule nucleation takes shape. Curr. Biol. 6:642.
Nayal A.,Webb D.J. and Horwitz A.F. (2004) Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. 16:94.
Palecek S.P. et al. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. Nature 385:537.
Pantaloni D., Le Clainche Ch. and Carlier M.F. (2001) Mechanism of actin-based motility. Science 292:1502.
Rodinov V.I. and Borisy G.G. (1997) Microtubule treadmilling in vivo. Science 275:215.
Roush W. (1995) Protein studies try to puzzle out Alzheimer's tangles. Science 267:793.
Schwarzbauer J.E. (1997) Cell migration: May the force be with you. Curr. Biol. 7:R292.
Shpetner H.S. and Vallee R.B. (1992) Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. Nature 355:733.
Smith L.G. and Oppenheimer D.G. (2005) Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21:271.
Terada S. et al. (1996) Visualization of slow axonal transport in vivo. Science 273:784.
Tessier-Lavigne M. and Goodman C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. Science 274:1123.
Trinick J. (1994) Titin and nebulin: protein rulers in muscle? TIBS 19:405.
Vale R.D. (1992) Microtubule motors: many new models of the assembly line. TIBS 17:300.
Wang E. et al. [eds.] (1985) Intermediate filaments. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 455.
Wang F. et al. (1996) Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones. Science 273:660.
Waters J.C. and Salmon E.D. (1996) Cytoskeleton: a catastrophic kinesin. Curr. Biol. 6:361.
Weeds A. and Yeoh S. (2001) Action at the Y-branch. Science 294:1660.
Wiese C. and Zheng Y. (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. J. Cell Sci. 119:4143.
Yildiz A. and Selvin P.R. (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? Trends Cell. Biol. 15:112.
Zheng Ch., Heintz N. and Hatten M.E. (1996) CNS gene encoding astrotactin, which support neuronal migration along glial fibers. Science 272:417.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Unión de las células entre sí y con la matriz extracelular

6

6-1. Las células se unen entre sí y con elementos de la matriz extracelular

Los organismos multicelulares están compuestos no sólo por células sino también por elementos intercelulares. Estos últimos se agrupan bajo el nombre de **matriz extracelular**. Los tejidos —y, por extensión, los órganos y los sistemas— son el resultado de asociaciones de distintos tipos de células y matrices extracelulares, de ahí que para poder reconocer a un tejido deban tenerse en cuenta tanto sus células como la calidad y la cantidad de sus componentes intercelulares.

En los tejidos conectivos las células se encuentran dispersas en medio de abundante matriz extracelular. En cambio, en los epitelios las células suelen estar adosadas sin que las separe prácticamente ningún elemento extracelular. No obstante, en los epitelios de revestimiento existe una delgada matriz extracelular llamada **lámina basal**, interpuesta entre las células y el tejido conectivo sobre el que se apoyan. Láminas basales similares se encuentran en otros tejidos, por ejemplo, en torno de las células musculares.

En este capítulo se analizarán los componentes de la matriz extracelular, cómo se vinculan las células con ellos y las distintas clases de uniones que existen entre las células.

MATRIZ EXTRACELULAR

6-2. La matriz extracelular contiene elementos fluidos y fibrosos

Las funciones más importantes de la matriz extracelular son: 1) rellenar los espacios no ocupados por las células; 2) conferir a los tejidos resistencia a la compresión y al estiramiento; 3) constituir el medio por donde llegan los nutrientes y se eliminan los desechos celulares; 4) proveer a diversas clases de células de puntos fijos donde aferrarse; 5) ser un vehículo por donde migran las células cuando se desplazan de un punto a otro del organismo; 6) ser un medio por el que arriban a las células las sustancias inductoras (señales) provenientes de otras células (cap. 11-2).

Los componentes de la matriz extracelular pueden clasificarse en fluidos y fibrosos. Los fluidos corresponden principalmente a glicosaminoglicanos y proteoglicanos (cap. 2-6), mientras que los fibrosos se dividen en proteínas estructurales (colágeno) y proteínas adhesivas (fibronectina, laminina).

6-3. Los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos son componentes fluidos de la matriz extracelular

La fase líquida de la matriz extracelular contiene una clase especial de polisacáridos llamados **glicosaminoglicanos**, los cuales suelen hallarse asociados entre sí y con proteínas, con las que componen grandes complejos glicoproteicos denominados **proteoglicanos** (cap. 2-6) (figs. 2-10 y 2-11). Pueden asociarse más de 100 cadenas de glicosaminoglicanos a una sola proteína, y en ocasiones varios de estos proteoglicanos se unen a una molécula de ácido hialurónico —que es el glicosaminoglicano de mayor tamaño—, lo cual origina agregados moleculares de enormes proporciones (fig. 6-1).

Los glicosaminoglicanos son hidratos de carbono compuestos por una sucesión de unidades disacáridas repetidas y alternadas, en las que uno de los monosacáridos posee un grupo amino, puesto que es una N-acetilglucosamina o una N-acetilgalactosamina, y el segundo es un ácido glucurónico, un ácido idurónico o una galactosa (cap. 2-6).

En la tabla 6-1 se mencionan los principales glicosaminoglicanos y sus unidades repetitivas. Como puede apreciarse, a excepción del ácido hialurónico, están sulfatados. Debido a la presencia de los sulfatos y a que poseen numerosos grupos carboxilo, los glicosaminoglicanos son moléculas muy ácidas, con numerosas cargas negativas que atraen grandes cantidades de Na^+ —y, por lo tanto, de H_2O—, lo cual aumenta la turgencia de la matriz extracelular.

6-4. Las proteínas estructurales más abundantes de la matriz extracelular son las fibras colágenas

En la matriz extracelular, las proteínas estructurales más importantes corresponden a las **fibras colágenas**, las cuales están compuestas por **fibrillas** que presentan una estriación característica, con una periodicidad de 67 nm (fig. 6-2).

La unidad molecular básica de la fibrilla es el **tropocolágeno**, que es una molécula proteica fibrosa de alrededor de 300 nm de longitud y 1,5 nm de espesor (fig. 6-2). El tropocolágeno está integrado por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño trenzadas en forma helicoidal. La periodicidad de 67 nm en las estriaciones de las fibrillas colágenas se debe a que los tropocolágenos se agregan en paralelo y se superponen en unas tres cuartas partes de su longitud (fig. 6-2).

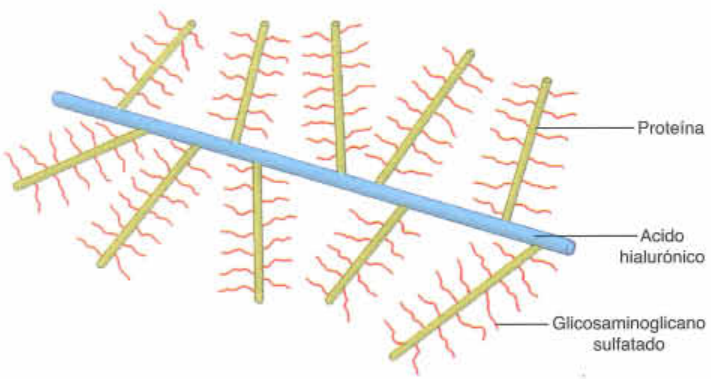


Fig. 6-1. Esquema de un agregado molecular compuesto por numerosos proteoglicanos unidos a un ácido hialurónico.

Tabla 6-1. Principales glicosaminoglicanos y sus unidades disacáridas repetitivas

Glicosaminoglicano	*Unidad disacárida*
Acido hialurónico	Acido glucurónico; N-acetilglucosamina
Condroitinsulfato	Acido glucurónico; N-acetilgalactosamina sulfato
Dermatansulfato	Acido idurónico; N-acetilgalactosamina sulfato
Heparansulfato	Acido idurónico, N-acetilglucosamina sulfato
Queratansulfato	Galactosa; N-acetilglucosamina sulfato

Existen alrededor de 25 clases de cadenas polipeptídicas. En todas, un tercio de los aminoácidos son glicinas, otro tercio suelen ser prolinas e hidroxiprolinas y el tercio restante son aminoácidos de distintos tipos.

Estas cadenas polipeptídicas se combinan de diversas maneras, lo que da lugar a unos 15 tipos de colágenos. Estos se identifican con números romanos, y los principales corresponden a los colágenos de tipo I, II, III, IV, VII, IX y XI.

El colágeno de tipo I se encuentra en la dermis, la cápsula de los órganos, el tendón, el hueso, la córnea y la dentina; los de tipo II, IX y XI, en el cartílago; el de tipo III, en la dermis fetal, el tejido conectivo laxo, la pared de los vasos sanguíneos, el útero, el riñón y los tejidos hemopoyético y linfático; los de tipo IV y VII, en la lámina basal y en el tejido conectivo subyacente.

En el capítulo 5-27 vimos que las fibras de colágeno desempeñan un papel crucial en la migración de las células, dado que proveen los puntos fijos de sostén para el anclaje temporario de los filopodios.

6-5. La fibronectina y la laminina son proteínas adhesivas de la matriz extracelular

La **fibronectina** es una glicoproteína fibrosa de 440 kDa, compuesta por dos subunidades polipeptídicas ligadas entre sí por un puente disulfuro cercano a sus extremos carboxilo. Cada subunidad posee dos dominios; como se verá en la próxima sección, uno se conecta con una proteína de la membrana plasmática de la célula y el otro con la fibra colágena (fig. 5-31).

En el capítulo 5-27 se señaló que las moléculas de fibronectina establecen los itinerarios seguidos por las células migratorias y median la conexión temporaria de los filopodios con las fibras colágenas.

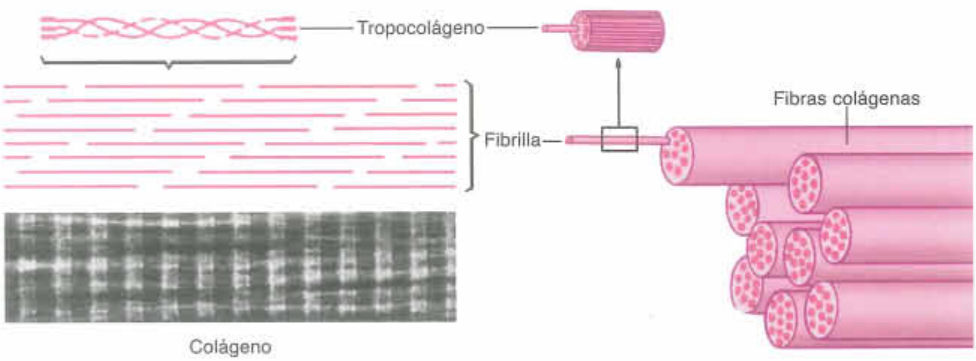


Fig. 6-2. Fibras colágenas. Se componen de fibrillas, y éstas de tropocolágeno. La micrografía electrónica permite ver su estriación característica, derivada de la disposición escalonada de las moléculas de tropocolágeno en las fibrillas.

La **laminina** es una glicoproteína fibrosa de unos 900 kDa, integrada por tres subunidades polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Tiene forma de cruz, con tres brazos cortos y uno largo. Abunda en las láminas basales, donde se halla asociada al colágeno IV (fig. 6-3) y a un proteoglicano rico en heparansulfato. Además, es la primera proteína adhesiva que aparece en la matriz extracelular del embrión, ya que se la ha detectado en las postrimerías de la segmentación de la célula huevo, apenas se forma la mórula (cap. 21-7).

UNIONES DE LAS CELULAS CON LA MATRIZ EXTRACELULAR

6-6. Los contactos focales unen a las células de algunos tejidos conectivos con componentes de la matriz extracelular

Las células de algunos tejidos conectivos, aunque pueden movilizarse, suelen permanecer en sus sitios debido a que establecen uniones más o menos duraderas con componentes fijos de la matriz extracelular. En esas uniones intervienen, del lado de las células, los **contactos focales** (cap. 5-24), mientras que los componentes fijos de la matriz extracelular corresponden a las **fibras colágenas**.

Debe recordarse que cada contacto focal consta de una proteína transmembranosa llamada integrina, cuyo dominio interno está unido —mediante varias proteínas ligadoras— a haces de filamentos de actina denominados fibras tensoras (cap. 5-24). Es precisamente la integrina —a través de su dominio externo— el componente del contacto focal que se conecta con la fibra colágena de la matriz extracelular. Como muestra la figura 5-31, lo hace con la ayuda de la proteína adhesiva ***fibronectina***.

En el capítulo 5-27 se vio que uniones similares a éstas —pero fugaces— se establecen durante la migración celular, cuando los contactos focales de los filopodios se adhieren a fibras colágenas presentes en la ruta de la célula que se desplaza por la matriz extracelular.

6-7. Los hemidesmosomas anclan a las células epiteliales en la lámina basal

En los epitelios, las células basales se vinculan con una parte especializada de la matriz extracelular conocida como **lámina basal** (sección 6-1). La conexión entre las células y la lámina es bastante firme, ya que se produce mediante unas estructuras llamadas **hemidesmosomas** (figs. 6-3 y 6-7).

Como los contactos focales, los hemidesmosomas poseen **integrinas**, pero éstas se hallan agrupadas, sus dominios citosólicos se unen a filamentos

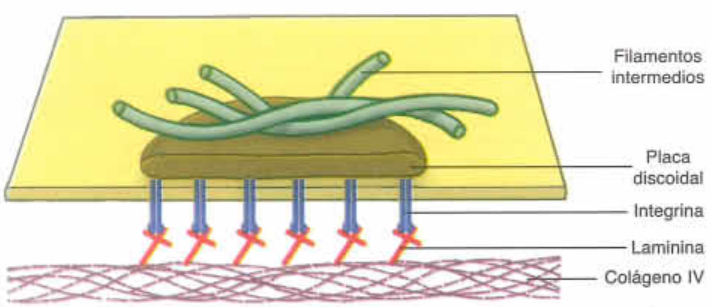


Fig. 6-3. Representación esquemática de un hemidesmosoma.

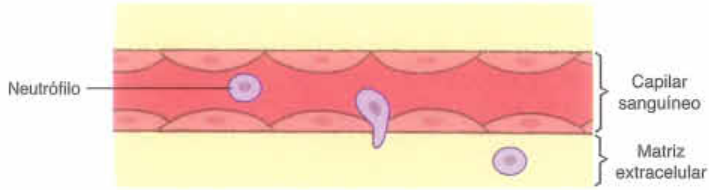


Fig. 6-4. Pasaje de una célula sanguínea entre dos células endoteliales de un capilar, y su salida a la matriz extracelular.

intermedios de **queratina** (no a fibras tensoras de actina) y sus dominios externos se conectan a una red de **colágeno de tipo IV**, que existe sólo en la lámina basal. Esta última conexión se realiza por medio de la ***laminina*** (fig. 6-3). Además, entre las integrinas y los filamentos de queratina se interpone una **placa discoidal** de 12 a 15 nm de espesor que contiene una proteína ligadora similar a las desmoplaquinas del desmosoma (sección 6-13).

UNIONES TRANSITORIAS ENTRE LAS CELULAS

6-8. En varios procesos biológicos se producen uniones transitorias entre tipos celulares diferentes

Durante las respuestas inmunitarias, la reparación de las heridas y la detención de las hemorragias es necesario que algunos tipos celulares establezcan uniones transitorias con otras clases de células. Las uniones se producen gracias a los fenómenos biológicos llamados **reconocimiento** y **adhesión celular**.

Ambos tienen lugar cuando determinadas células de la sangre (neutrófilos, monocitos, linfocitos, plaquetas) se conectan fugazmente con las células endoteliales de los capilares sanguíneos, lo cual es un prerrequisito para poder salir de la sangre y pasar a los tejidos (fig. 6-4). La adhesión se produce porque en la membrana plasmática de las células sanguíneas existen glicolípidos y glicoproteínas que interactúan específicamente con glicoproteínas complementarias —llamadas **selectinas**— presentes en la membrana plasmática de las células endoteliales. Inversamente, en otras ocasiones los glicolípidos y las glicoproteínas se localizan en las células endoteliales y las selectinas en las células sanguíneas.

Estas interacciones son necesarias para que las células sanguíneas se detengan en el lugar apropiado y pasen entre dos células endoteliales contiguas, lo cual les permite alcanzar el tejido donde —según el caso— participarán en la respuesta inmunitaria, en la cicatrización de la herida o en la detención de la hemorragia.

La especificidad de la unión es provista de un lado por los oligosacáridos de los glicolípidos y de las glicoproteínas y del otro por los oligosacáridos de las selectinas. Los oligosacáridos interactuantes son diferentes entre sí, de modo que se establecen conexiones entre moléculas de distinta composición (***uniones heterofílicas***) (fig. 6-5). Las selectinas deben su nombre a las adhesiones selectivas que median y a que son lectinas, es decir, moléculas que tienen una gran avidez por hidratos de carbono.

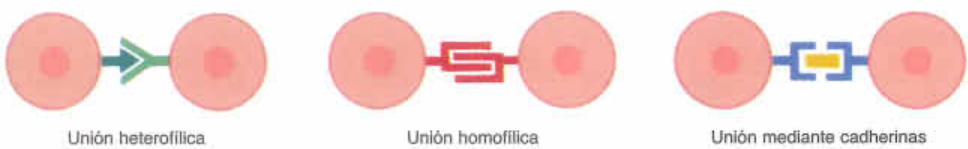


Fig. 6-5. Uniones moleculares heterofílicas y homofílicas. En las uniones homofílicas mediadas por las cadherinas interviene el Ca^{2+}, ilustrado como un rectángulo de color amarillo.

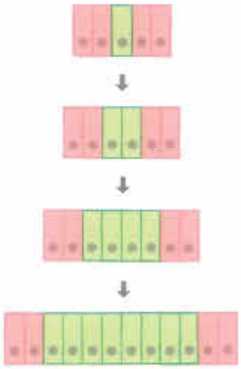


Fig. 6-6. Formación de un tejido epitelial derivado de una sola célula.

Otras adhesiones celulares heterofílicas transitorias tienen lugar entre las células mieloides (durante su proliferación), entre los linfocitos B y T (durante la activación de los primeros) y entre los oligodendrocitos o las células de Schwann y las neuronas (durante la mielinización). En todos estos casos, oligosacáridos de una de las dos células interactuantes reconocen específicamente a glicoproteínas llamadas **sialoadhesinas**, presentes en la membrana plasmática de la célula opuesta.

En el curso del desarrollo embrionario se producen adhesiones heterofílicas similares a las descritas, aunque son más comunes las adhesiones homofílicas que se analizan en la próxima sección. Finalmente, otro ejemplo de adhesión heterofílica se da durante la fecundación del ovocito por el espermatozoide (cap. 19-19).

6-9. Durante el desarrollo embrionario, antes de formar uniones estables, las células se reconocen y se adhieren

Durante el desarrollo embrionario algunos epitelios se forman a partir de células que al cabo de varias divisiones generan numerosas células descendientes que permanecen juntas (fig. 6-6), conectadas entre sí mediante uniones estables (estas uniones se analizan en las próximas secciones).

En cambio, otros tejidos se forman por la asociación de dos o más clases de células diferentes, las cuales deben migrar hasta encontrarse en un lugar del organismo. En él se reconocen, se adhieren y se conectan por medio de uniones estables.

El **reconocimiento** y la **adhesión celular** son mediados por glicoproteínas transmembranosas especiales llamadas **CAM** (por *cell-adhesion molecules*), que se encuentran en la superficie de las células destinadas a unirse y tienen la particularidad de interactuar sólo cuando son idénticas entre sí (***uniones homofílicas***) (fig. 6-5). Mediante dichas CAM, la célula migratoria, mientras se desplaza en busca de su lugar de destino —donde tomará contacto con las células que serán sus compañeras en el nuevo tejido—, "tantea" las propiedades químicas de las CAM situadas en las membranas plasmáticas de las células que encuentra a su paso. Si reconoce a una célula con una CAM idéntica a la suya, se adhiere a ella; si no, continúa desplazándose hasta encontrar a la célula con la CAM correcta.

Se han identificado varias CAM, denominadas —en consideración a las células donde se las encontró por primera vez— ***Ng-CAM*** (neuronas, células gliales), ***N-CAM*** (neuronas), ***L-CAM*** o ***cadherina E*** (hepatocitos, células epiteliales), ***cadherina P*** (placenta), ***cadherina N*** (neuronas), etc. Las cadherinas son glicoproteínas que llevan esa denominación a causa de que necesitan Ca^{2+} para poder ligarse entre sí (fig. 6-5).

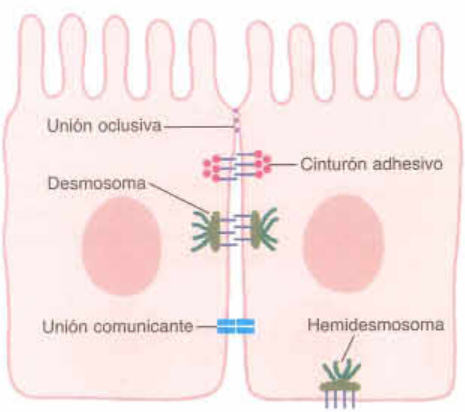


Fig. 6-7. Representación esquemática de las estructuras que mantienen a las células epiteliales unidas entre sí y con la lámina basal.

Surge de lo expuesto que antes de unirse en forma estable las células deben reconocerse y adherirse. Hoy se acepta que estos tres procesos corresponden a etapas sucesivas de un mismo fenómeno. En las próximas secciones se verá que algunas uniones estables contienen cadherinas, es decir, moléculas con propiedades idénticas a las CAM dependientes de Ca^{2+} que actúan durante el reconocimiento y la adhesión celular.

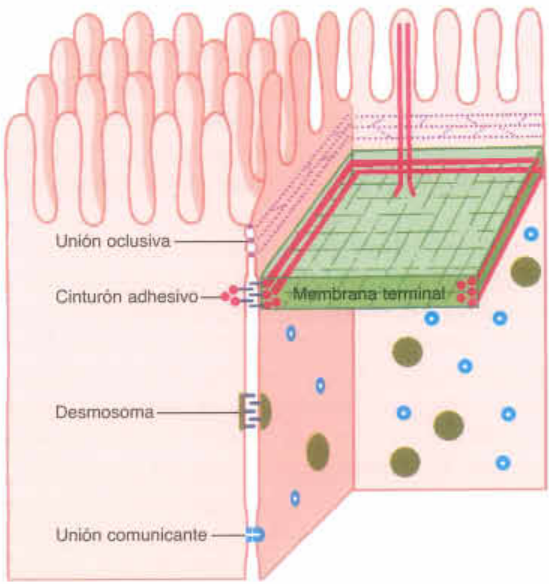


Fig. 6-8. Esquema tridimensional que ilustra las estructuras que mantienen unidas a las células epiteliales entre sí. Se muestra también la membrana terminal (a la altura del cinturón adhesivo) y su vínculo con las raíces de las microvellosidades (fig. 5-38).

UNIONES ESTABLES ENTRE LAS CELULAS

6-10. Las células epiteliales se unen entre sí por medio de cuatro clases de estructuras

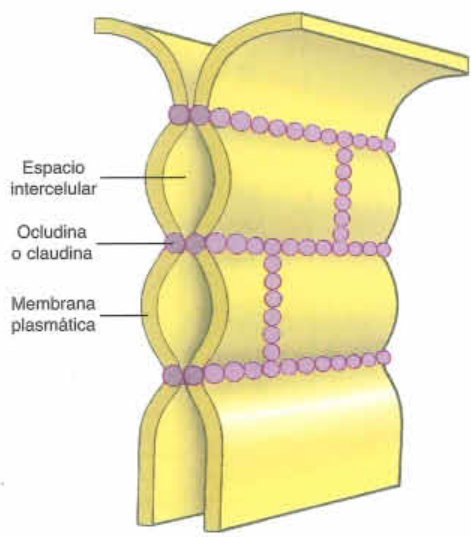
Las células de los epitelios se ligan entre sí de manera estable por medio de cuatro tipos de uniones. Estas se denominan: 1) unión oclusiva; 2) cinturón adhesivo; 3) desmosoma, y 4) unión comunicante (fig. 6-7).

6-11. La unión oclusiva impide el pasaje de sustancias por el espacio intercelular

La **unión oclusiva** (llamada también *unión estrecha* o *zonula occludens*) adhiere firmemente las membranas plasmáticas de las células epiteliales contiguas por medio de una franja de conexión no muy ancha, situada inmediatamente por debajo de la superficie libre del epitelio (fig. 6-7). Dado que en los epitelios cada célula se halla rodeada por otras, en una célula individual la unión oclusiva compone un anillo que circunda sus paredes laterales (fig. 6-8).

A nivel de la unión oclusiva las membranas plasmáticas de las células enfrentadas contienen, entre otras, dos clases de proteínas integrales, llamadas **ocludinas** y **claudinas**. Como muestra la figura 6-9, se disponen de modo tal que forman tres o más hileras paralelas a la superficie del epitelio. En cada hilera las ocludinas y las claudinas están unidas entre sí como las cuentas de un collar, y cada proteína se adhiere firmemente a otra similar de la membrana opuesta, lo cual ocluye el espacio intercelular. En la figura 6-9 puede verse que las hileras de ocludinas y claudinas parecen "costuras" y que éstas se hallan interconectadas por puentes de igual composición.

Fig. 6-9. Unión oclusiva en la que se ven tres hileras proteicas paralelas entre sí y los puentes que las conectan. Las hileras y los puentes se componen de ocludinas y claudinas.



Cuando se coloca sobre la superficie libre de un epitelio un marcador como la ferritina, sus moléculas no pueden atravesar el tejido epitelial por los espacios intercelulares debido a que son detenidas por las uniones oclusivas. Lo mismo ocurre con casi todas las sustancias, de ahí que para atravesar los epitelios deban cruzar por el interior de sus células. Las figuras 3-27, 3-28, 7-25, 7-26, 7-27 y 7-28 muestran transportes transcelulares de este tipo.

Lo expuesto en el párrafo anterior tiene excepciones. Por ejemplo, el Mg^{2+} puede pasar por los espacios intercelulares del epitelio del túbulo recto distal de la nefrona porque entre las claudinas de las uniones oclusivas de ese epitelio existen unos canales diminutos que permiten el paso del ion. Debe señalarse que el Mg^{2+} se dirige desde el interior de la nefrona hasta el intersticio renal y que su transferencia se realiza sin la compañía de agua.

Además de unir a las células y de impedir el pasaje de sustancias a través de los epitelios, las uniones oclusivas determinan que las composiciones moleculares de las regiones apical y basolateral de las membranas plasmáticas de las células epiteliales sean diferentes entre sí. Esta asimetría se debe a que las uniones oclusivas forman barreras que impiden la difusión lateral de las proteínas y los lípidos membranosos (caps. 3-3 y 3-5), parte de los cuales quedan confinados de un lado de las uniones y parte del otro. El transporte transcelular de solutos ilustrado en las figuras 3-27 y 3-28 es posible gracias a la segregación —a ambos lados de las uniones oclusivas— de proteínas membranosas que funcionan como canales iónicos y permeasas.

6-12. El cinturón adhesivo contiene glicoproteínas llamadas cadherinas

El **cinturón adhesivo** (llamado también *desmosoma en cinturón*, *desmosoma en banda*, *banda de adhesión*, *barra terminal* o *zonula adherens*) es otro tipo de unión que desarrollan las células epiteliales para mantenerse ligadas entre sí.

Se localiza por debajo de la unión oclusiva (fig. 6-7) y en su composición intervienen glicoproteínas transmembranosas de la familia de las **cadherinas** (sección 6-9) y la franja de **filamentos de actina** corticales estudiada en el capítulo 5-21. Allí se adelantó que las cadherinas se conectan con los filamentos de actina mediante las proteínas ligadoras **placoglobina**, **catenina**, **α-actinina** y **vinculina**.

Como muestran las figuras 6-8 y 6-10, las cadherinas dan lugar a una franja proteica que circunda las paredes laterales de la célula, del mismo ancho que la franja de filamentos de actina con la que se hallan conectadas. Las figuras 6-8 y 6-10 muestran también que la unión intercelular se produce en virtud de que las cadherinas se conectan a través de sus dominios externos. Según se vio en la sección 6-9, se trata de uniones homofílicas, pues las moléculas que interactúan son iguales entre sí (fig. 6-5).

El nombre de cinturón adhesivo hace referencia a las dos características más notorias de este tipo de unión: la disposición circular de las cadherinas y los filamentos de actina y la propiedad de las primeras de adherirse mutuamente.

El conjunto de cinturones adhesivos forma un enrejado transepitelial, del cual deriva parte de la resistencia lateral de los epitelios.

6-13. El desmosoma es comparado con un remache y en su formación también intervienen cadherinas

Los **desmosomas** (del griego *desmós*, vínculo, y *sôma*, cuerpo) (llamados también *desmosomas puntiformes* o *maculae adherens*), a diferencia de la unión oclusiva y del cinturón adhesivo, constituyen uniones puntiformes entre las células epiteliales contiguas, por lo que han sido comparados con remaches (figs. 6-8 y 6-11). Se hallan por debajo del cinturón adhesivo, distribuidos irregularmente en las paredes laterales de las células. Cada desmosoma ocupa un área circular de aproximadamente 0,5 μm de diámetro y a su nivel las membranas plasmáticas se encuentran separadas por una distancia de 30 a 50 nm.

El desmosoma incluye un grupo de glicoproteínas transmembranosas de la familia de las **cadherinas**, denominadas **desmogleína I**, **desmocolina I** y **desmocolina II**.

Igual que en el cinturón adhesivo, las cadherinas de las membranas adyacentes se unen entre sí por sus dominios externos (fig. 6-11). En cambio, sus dominios citosólicos se asocian con filamentos intermedios de **queratina** (no con filamentos de actina). Esta última asociación es mediada por una **placa discoidal** que incluye las proteínas ligadoras **desmoplaquina I**, **desmoplaquina II** y **placoglobina**. Una cara de la placa se relaciona con las cadherinas y la otra con los filamentos de queratina, los cuales —como horquillas— ingresan en el disco, se curvan y vuelven al citosol (fig. 6-11).

Además de unir fuertemente a las células epiteliales entre sí, los desmosomas y los filamentos de queratina componen una red transcelular extendida por todo el epitelio, al que le confieren una gran resistencia mecánica. Es por ello que en los distintos tejidos el número de desmosomas es proporcional al grado de tensión o de estiramiento a que son sometidos. Por ejemplo, en el epitelio de la mucosa de la vejiga urinaria los desmosomas son muy abundantes.

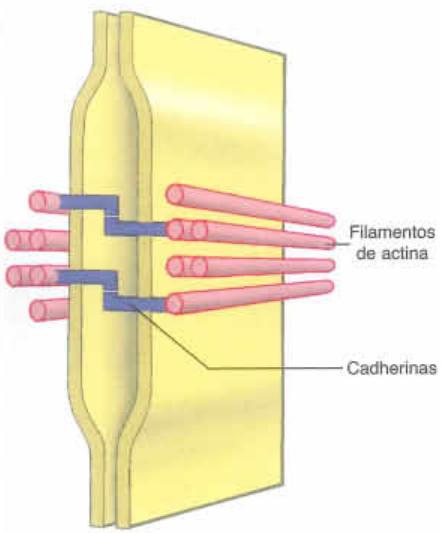


Fig. 6-10. Cinturón adhesivo.

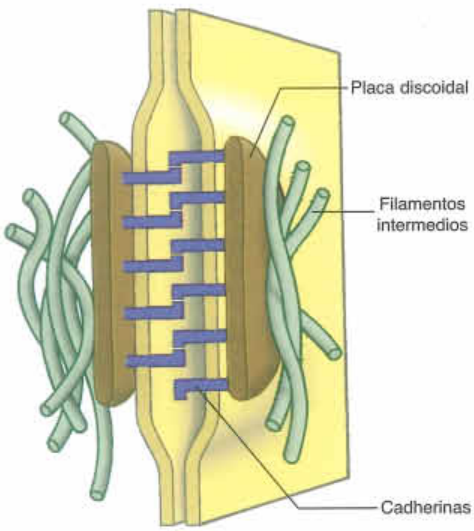


Fig. 6-11. Desmosoma.

En el capítulo 5-34 se vio que los discos intercalares que ligan a las células musculares cardíacas contienen desmosomas asociados con filamentos de desmina.

6-14. La unión comunicante está formada por la asociación de conexones aportados por las células epiteliales contiguas

Las **uniones comunicantes** (llamadas también *uniones en hendidura*, *uniones "gap"* o *nexus*) son canales que comunican los citoplasmas de las células epiteliales adyacentes.

Cada canal está compuesto por un par de **conexones**, que son estructuras cilíndricas huecas que atraviesan las membranas plasmáticas de las células enfrentadas (figs. 6-7 y 6-12).

La pared del conexón resulta de la asociación de seis proteínas transmembranosas idénticas que delimitan un conducto central (fig. 6-12). Estas proteínas se llaman **conexinas** y se unen con sus similares del conexón de la membrana plasmática opuesta, lo que da lugar a un canal que comunica a las dos células. Debido a que las conexinas sobresalen en el espacio intercelular entre 1 y 2 nm, las membranas plasmáticas de dichas células quedan separadas por una distancia de 2 a 4 nm. Por este motivo a la unión comunicante se la llama también unión en hendidura (fig. 6-12).

En las células epiteliales los conexones se encuentran entre los desmosomas. No están uniformemente distribuidos sino agrupados en conjuntos aislados, cada uno compuesto por unos pocos o por cientos de conexones.

La figura 6-13 corresponde a una imagen ultramicroscópica con coloración negativa de numerosos conexones en la membrana plasmática de un hepatocito. Los conexones aparecen como anillos que forman un enrejado hexagonal con una periodicidad de 8,5 nm. En el recuadro se observa una representación lograda mediante el procesamiento densitométrico computarizado de las imágenes electrónicas.

El conducto central del conexón tiene un diámetro de alrededor de 1,5 nm. Por él pasan libremente algunos solutos (iones, monosacáridos, nucleótidos,

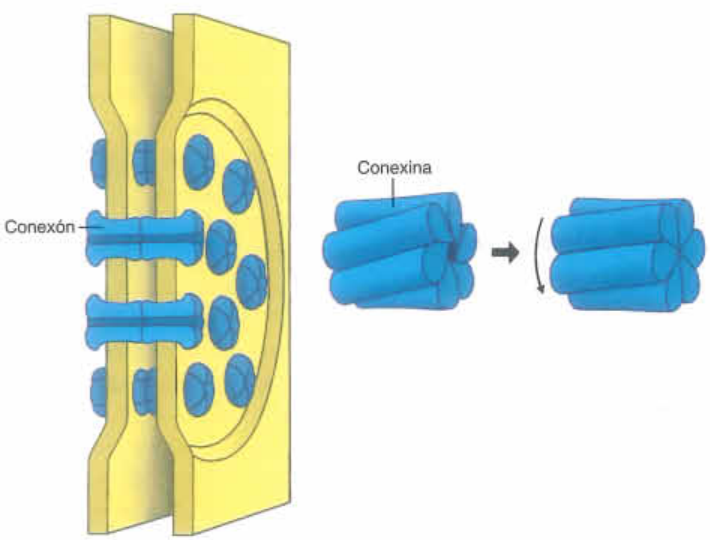


Fig. 6-12. Unión comunicante. A la derecha se ilustra el mecanismo de cierre del conexón.

aminoácidos, etc.) del citoplasma de una célula al citoplasma de la célula vecina, pero no las macromoléculas. Tales pasajes indican que existen acoplamientos metabólicos y eléctricos entre las células contiguas.

La estructura de los conexones es comparable a la de los canales iónicos descriptos en el capítulo 3-14. Debe recordarse que los canales dependientes de voltaje y de ligando están compuestos, respectivamente, por cuatro y cinco proteínas transmembranosas, en lugar de las seis de los conexones. Estos, como los canales iónicos, no son estructuras estáticas, ya que tienen la capacidad de abrirse y de cerrarse. Comúnmente se hallan abiertos, y se cierran cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} en el citosol. La figura 6-12 muestra que el cierre obedece a un cambio de inclinación de las conexinas.

Las conexinas contienen cuatro dominios transmembranosos y sus extremos amino y carboxilo se hallan orientados hacia el citosol. El dominio contiguo al extremo carboxilo tiene una función importante debido a que su fosforilación modifica la posición de la conexina y lleva al cierre del conexón.

Dado que en una unión comunicante la clausura de un conexón se produce independientemente del otro, el cierre del canal puede ser consecuencia de la clausura de uno de los conexones solamente.

El cierre de las uniones comunicantes adquiere gran importancia en las muertes celulares, no sólo en las programadas sino también en las accidentales (cap. 22-4). Así, en las células moribundas se produce un aumento en la concentración del Ca^{2+} citosólico, que provoca el cierre de los conexones para que no pasen a las células vecinas elementos que puedan dañarlas.

A través de las uniones comunicantes circulan: 1) nutrientes; 2) desechos metabólicos; 3) sustancias que actúan como señales, por ejemplo, los morfógenos durante la diferenciación celular (cap. 21-12) o las moléculas que sincronizan el movimiento de los cilios en los epitelios (cap. 5-12); 4) potenciales eléctricos de acción, como los que se transmiten por los discos intercalares del músculo cardíaco para sincronizar las contracciones de sus células (cap. 5-34), o entre las células musculares lisas de algunos órganos tubulares (intestino, epidídimo) a fin de que sincronicen sus contracciones peristálticas.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE BIBLIOTECA FILIAL CIUDAD DEL ESTE

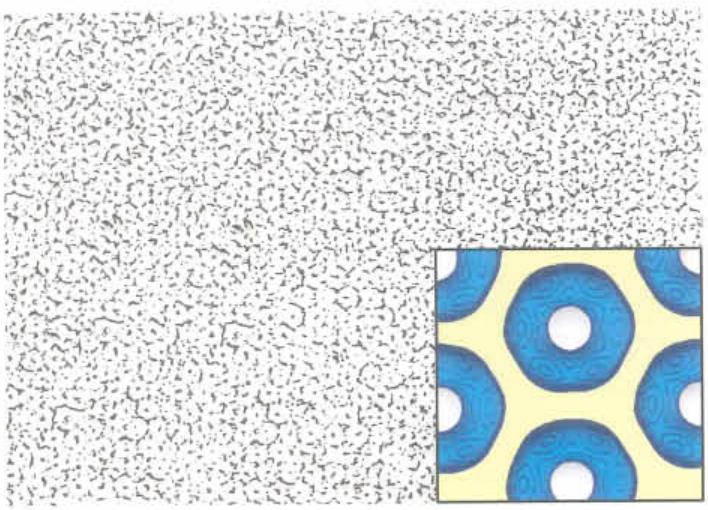


Fig. 6-13. Vista superficial ultramicroscópica, con coloración negativa, de numerosos conexones en la membrana plasmática de la célula hepática. 425.000×. En el recuadro se observa que cada unidad tiene la forma de un anillo hexagonal cuyos lados corresponden a las seis conexinas. (Cortesía de G. Zampighi.)

LAS CONEXIONES ENTRE LAS CELULAS VEGETALES

6-15. Los plasmodesmos son puentes de comunicación entre células vegetales

Una característica de la mayoría de las células vegetales es la presencia de puentes entre sus citoplasmas, lo que las hace continuas. Estos puentes —denominados **plasmodesmos**— atraviesan la pared celular pectocelulósica descrita en el capítulo 3-30 (fig. 1-7).

La presencia de plasmodesmos permite la libre circulación de líquidos y solutos, tan importantes para mantener la tonicidad de la célula vegetal. Es posible que dejen pasar también algunas macromoléculas. Como vemos, las paredes pectocelulósicas no constituyen tabiques intercelulares completos, de modo que las células componen un vasto sincicio sostenido por el esqueleto que forman sus propias paredes.

El desarrollo de los plasmodesmos está relacionado con la formación de la placa celular (caps. 3-30 y 18-21). Esta es atravesada por componentes del retículo endoplasmático, los cuales son finalmente responsables de la formación y de la localización de los plasmodesmos (cap. 7-44).

Se ha sugerido que los plasmodesmos desempeñan un papel en la diferenciación celular. Así, en las células vegetales que se alargan, el número de plasmodesmos se reduce a lo largo de sus ejes mayores y aumenta en los tabiques transversales.

BIBLIOGRAFIA

Anderson H. (1990) Adhesion molecules and animal development. Experientia 46:2.

Bulow H.E. and Hobert O. (2006) The molecular diversity of gycosaminoglycans shapes animal development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:375.

Citi S. (1993) The molecular organization of tight junctions. J. Cell Biol. 121:485.

Crocker P.R. and Feizi T. (1996) Carbohydrate recognition system: functional triads in cell-cell interactions. Curr. Opin. Struc. Biol. 6:679.

Culotta E. (1995) Neuronal adhesion molecules signal through FGF receptor. Science 267:1263.

Green K.J. and Jones J.C.R. (1996) Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. FASEB J. 10:871.

Gumbiner B.M. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:622.

Hib J. (2009) Histología de Di Fiore. Texto y atlas. 2ª Ed. Editorial Promed, Buenos Aires.

Horwitz A.F. (1997) Integrins and health. Sci. Am. 276 (5):46.

Kintner C. (1992) Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. Cell 69:225.

Larsen M., Artym W., Green J.A. and Yamada K.M. (2006) The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 18:463.

Luna E.J. and Hitt A.L. (1992) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. Science 258:955.

Marchisio P.C. (1991) Integrins and tissue organization. Adv. Neuroimm. 1:214.

Pennisi E. (1997) Genes, junctions, and disease at cell biology meeting. Science 274:2008.

Rosen S.D. and Bertozzi C.R. (1996) Leukocyte adhesion: two selectins converge on sulphate. Curr. Biol. 6:261.

Sasaki I., Fassler R. and Hohenester E. (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembIIy. J. Cell Biol. 164:959

Segretain D. and Falk M.M. (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. Biochim. Biophys. Acta 1662:3.

Sharon N. and Lis H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. Sci. Am. 268 (1):82.

Shin K., Fogg V.C. and Margolis B. (2006) Tight junctions and cell polarity. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:207.

Snyder S.H. (1985) The molecular basis of communication between cells. Sci. Am. 253 (4):114.

Weber K. and Osborn M. (1985) The molecules of the cell matrix. Sci. Am. 253 (4):92.

Wong V. and Goodenough D.A. (1999) Paracellular channels. Science 285:62.

Yanagishita M. and Hascall V.C. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem. 267:9451.

Yeager M. and Nicholson B.J. (1996) Structure of gap junction intercellular channels. Curr. Opin. Struc. Biol. 6:183.

Sistema de endomembranas

Digestión y secreción

7

7-1. Los componentes del sistema de endomembranas se comunican mediante vesículas

En el capítulo 4-1 describimos los compartimientos en que se divide la célula, de los cuales el sistema de endomembranas es uno de los más voluminosos. Se distribuye por todo el citoplasma y está compuesto por varios subcompartimientos —cisternas, sacos, túbulos— comunicados entre sí (fig. 7-1). En algunos lugares la comunicación es directa y en otros es mediada por **vesículas transportadoras**. Estas nacen de un compartimiento y se transfieren a otro en virtud de procesos que comprenden pérdida y ganancia de membranas.

Las vesículas transportadoras operan del siguiente modo (fig. 7-2): 1) brotan de la membrana de un compartimiento, llamado donante; 2) viajan por el citosol en busca de otro compartimiento, llamado receptor, con cuya membrana se fusionan. Por consecuencia, una parte de la membrana y una parte del contenido del compartimiento donante se transfieren, respectivamente, a la membrana y al interior del compartimiento receptor.

La figura 7-1 permite ver que el compartimiento donante recupera la membrana perdida merced a **vesículas recicladoras**.

7-2. El sistema de endomembranas está integrado por varios organoides

El sistema de endomembranas está integrado por los siguientes organoides (fig. 7-1): 1) el **retículo endoplasmático**, que comprende dos sectores,

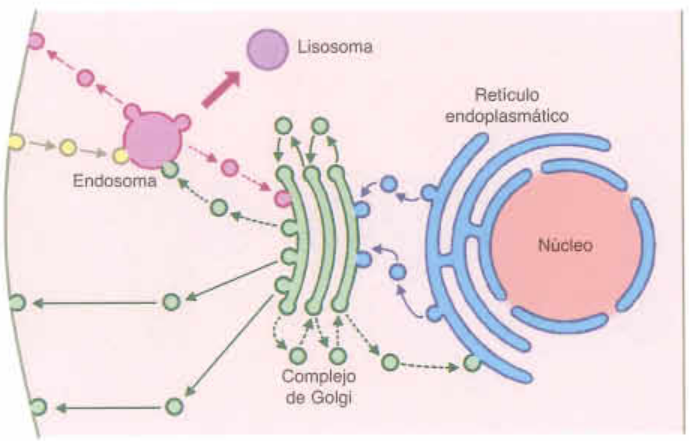


Fig. 7-1. Organoides que componen el sistema de endomembranas. Se ilustran también las distintas vesículas transportadoras (*flechas llenas*) y recicladoras (*flechas punteadas*) que lo integran.

denominados liso y rugoso (debe agregarse además la envoltura nuclear, que será analizada en el capítulo 12-2); 2) el **complejo de Golgi**; 3) los **endosomas**, y 4) los **lisosomas**.

Las membranas de estos organoides y las de las vesículas transportadoras están constituidas por una bicapa lipídica similar a la de la membrana plasmática. Como es obvio, una de las caras de estas membranas se relaciona con el citosol y la otra con la cavidad de los organoides. Se denominan, respectivamente, ***cara citosólica*** y ***cara luminal***.

Las membranas poseen glicolípidos y glicoproteínas intrínsecas y periféricas que representan más del 80% de su peso (fig. 3-14). Los hidratos de carbono se orientan siempre hacia la cavidad de los organoides.

El tamaño del sistema de endomembranas varía en las distintas clases de células. Es muy pequeño en los ovocitos, en las células poco diferenciadas y en las que producen proteínas para el citosol exclusivamente, como los reticulocitos.

RETICULO ENDOPLASMATICO

7-3. Generalidades

El **retículo endoplasmático** (**RE**) fue descubierto cuando se introdujo la microscopia electrónica en el estudio de las células. Las primeras microfotografías mostraron un componente reticular que no llegaba a la membrana plasmática —de ahí los términos "retículo" y "endoplasmático"—, hasta que se conoció su verdadera forma tridimensional. Finalmente, con el uso de la radioautografía y de técnicas de análisis citoquímico se identificaron casi todos sus componentes.

El retículo endoplasmático se distribuye por todo el citoplasma, desde el núcleo hasta la membrana plasmática. Está compuesto por una red tridimensional de túbulos y sacos aplanados totalmente interconectados (fig. 7-3). A pesar de su extensión y de su intrincada morfología, constituye un organoide indiviso, ya que posee una membrana continua y una sola cavidad. El citoesqueleto se encarga de mantener a sus componentes en posiciones más o menos fijas dentro del citoplasma (cap. 5-9).

Este organoide se divide en dos sectores, que se diferencian por la ausencia o la presencia de ribosomas sobre su cara citosólica. Se denominan, respectivamente, **retículo endoplasmático liso** (**REL**) y **retículo endoplasmático rugoso** (**RER**) (figs. 1-6, 1-10, 7-3, 7-4 y 7-6). Entre ellos hay un sector de transición, en parte liso y en parte rugoso.

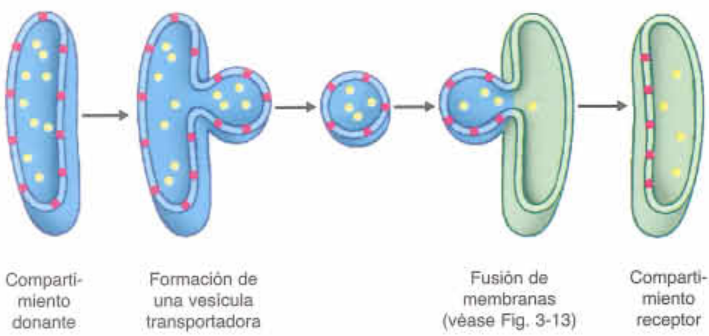


Fig. 7-2. Esquemas secuenciales que ilustran la formación de una vesícula en la membrana de un compartimiento donante y la fusión de la membrana vesicular con la membrana del compartimiento receptor.

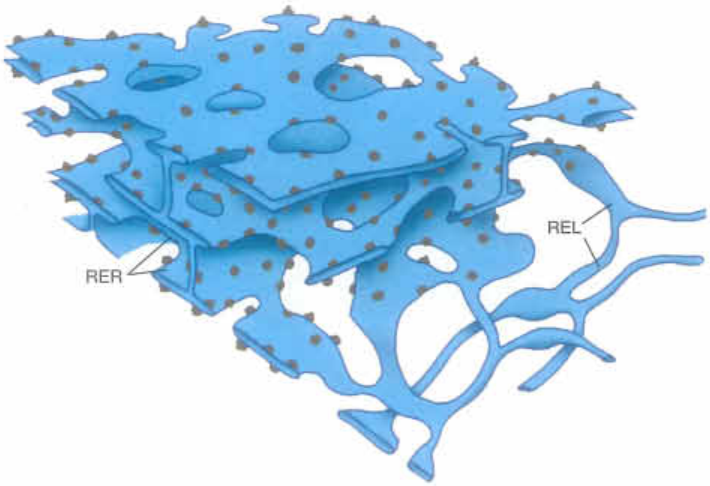


Fig. 7-3. Esquema tridimensional que muestra los sectores liso (*REL*) y rugoso (*RER*) del retículo endoplasmático.

7-4. El REL se halla libre de ribosomas

Como acaba de señalarse, el **REL** carece de ribosomas. Suele comprender una red de túbulos interconectados, cuyo volumen y distribución espacial difieren en las distintas clases de células. Esta diversidad depende de sus variadas funciones. Por ejemplo, la célula muscular estriada contiene un REL absolutamente singular —el ***retículo sarcoplasmático***—, adaptado para desencadenar la contractilidad del citoesqueleto (sección 7-26).

7-5. El RER está asociado con ribosomas

El **RER** está muy desarrollado en las células que realizan una activa síntesis proteica. En su composición predominan los sacos aplanados, que cuando son abundantes se encuentran separados por un angosto espacio citosólico repleto de ribosomas (fig. 7-4).

Estos ribosomas se hallan adheridos a la cara citosólica de la membrana del RE (fig. 7-6). Por lo general componen complejos llamados **polisomas** o **polirribosomas**, consistentes en grupos de ribosomas enlazados por una mo-

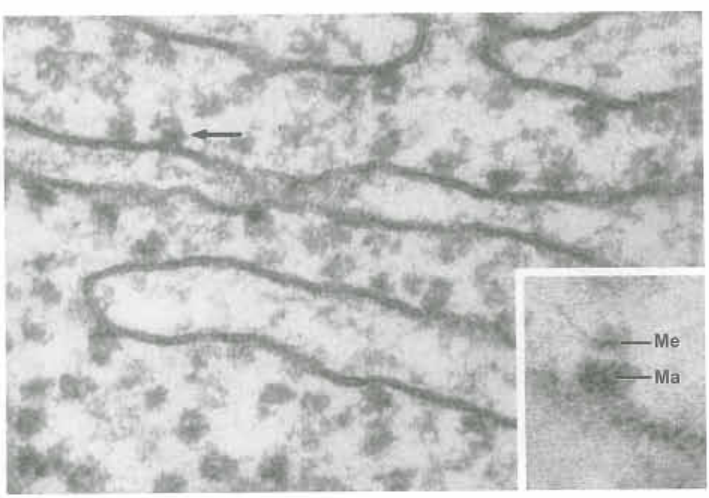


Fig. 7-4. Micrografía electrónica del retículo endoplasmático rugoso. Obsérvense los ribosomas unidos a la membrana del organoide (uno aparece marcado con una flecha). 208.000×. (Cortesía de G. E. Palade.) En el recuadro se distinguen las subunidades menor (*Me*) y mayor (*Ma*) del ribosoma. 410.000×. (Cortesía de N. T. Florendo.)

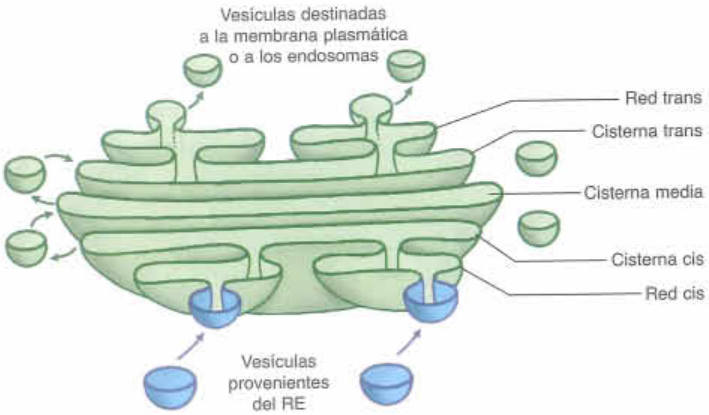


Fig. 7-5. Representación tridimensional de los elementos que componen el complejo de Golgi.

lécula de ARNm (figs. 7-3 y 16-8) (cap. 16-11). La afinidad del RER por los ribosomas se debe a que en su membrana existen receptores específicos (sección 7-12), de los cuales carece el REL.

COMPLEJO DE GOLGI

7-6. Generalidades

En 1898, utilizando un método de coloración argéntica, Camilo Golgi descubrió una estructura reticular en las células nerviosas, que posteriormente llevó su nombre. Medio siglo después, con el advenimiento de la microscopia electrónica, el fraccionamiento celular y las técnicas de análisis citoquímico, pudo revelarse su estructura y su composición molecular.

En una célula idealizada el **complejo de Golgi** se halla entre el RE y la

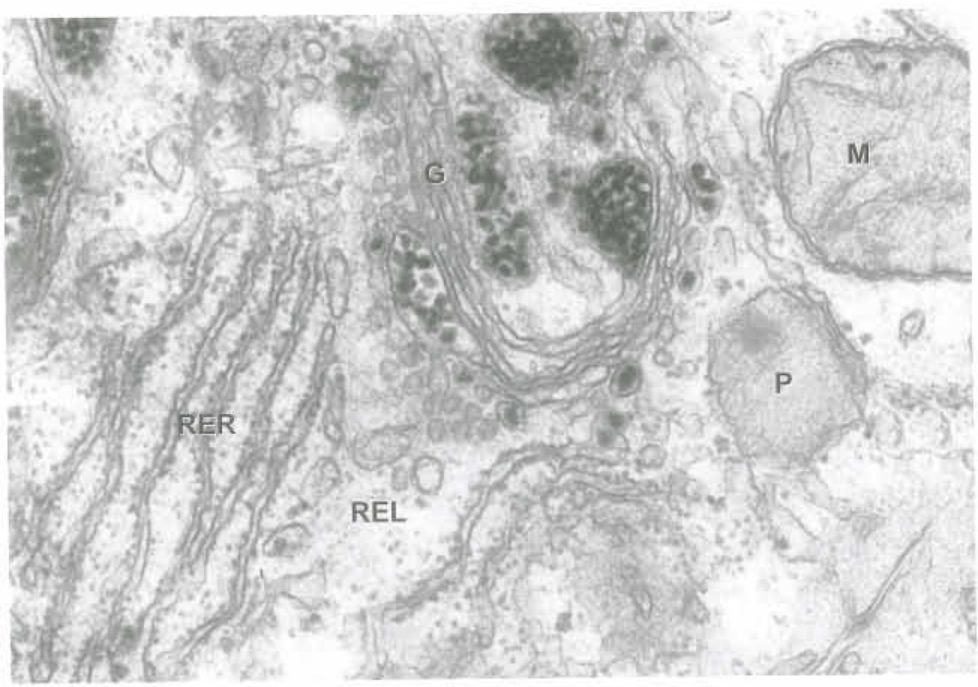


Fig. 7-6. Micrografía electrónica de la célula hepática de un animal expuesto a una dieta rica en grasas. Se observan vesículas que transportan lipoproteínas, el retículo endoplasmático rugoso (*RER*), el retículo endoplasmático liso (*REL*), el complejo de Golgi (*G*), una mitocondria (*M*) y un peroxisoma (*P*). 56.000×. (Cortesía de A. Claude.)

membrana plasmática, con los endosomas y los lisosomas situados entre ésta y el complejo (fig. 1-6). Estas relaciones espaciales son el reflejo de otras de índole funcional, ya que, por medio de vesículas transportadoras, las moléculas provenientes del RE alcanzan el complejo de Golgi, lo recorren, se desprenden de él y arriban a la membrana plasmática o a los endosomas (fig. 7-1). Estos flujos comprenden tanto moléculas membranosas como moléculas luminales. Así, según la vía seguida, se transfieren fragmentos de membrana del RE a la membrana plasmática o a la membrana de los endosomas, mientras que las moléculas provenientes de la cavidad del retículo se vuelcan en el medio extracelular —esto se denomina secreción— o ingresan en la cavidad de los endosomas.

Como se verá, en ambos casos el complejo de Golgi desempeña un papel fundamental, dado que las moléculas que lo recorren experimentan modificaciones necesarias para sus actividades biológicas. Por otro lado, algunas moléculas son sintetizadas directamente en el complejo de Golgi, sin la intervención del retículo endoplasmático.

7-7. El complejo de Golgi muestra una polarización que se corresponde con su funcionamiento

El complejo de Golgi está integrado por una o por varias unidades funcionales llamadas **dictiosomas** (del griego *díktyon*, red, y *sôma*, cuerpo). En la célula secretoria polarizada el organoide posee un solo dictiosoma grande que ocupa una posición intermedia entre el núcleo y la superficie celular, donde se libera la secreción (fig. 1-6). Complejos de Golgi con estas características se observan, por ejemplo, en células de la mucosa intestinal, de la tiroides y del páncreas exocrino.

En cambio, otras células, como las plasmáticas, los hepatocitos y las neuronas, poseen varios dictiosomas pequeños distribuidos por todo el citoplasma (fig. 1-10). En el hepatocito existen unos 50 dictiosomas, que representan el 2% del volumen citoplasmático.

Aunque su localización y su número varían en las distintas clases de células, los dictiosomas presentan características morfológicas constantes. Suelen adoptar una forma curvada, con la cara convexa mirando al núcleo y la cóncava orientada hacia la membrana plasmática. La primera se denomina **cara de entrada** o **cis**, y la segunda, **cara de salida** o **trans** (figs. 7-5, 7-6 y 7-7).

Cada dictiosoma está integrado por:

1) Una **red cis**, formada por numerosos sacos y túbulos interconectados.

2) Una **cisterna cis**, conectada con la red cis.

3) Una o más **cisternas medias** independientes, lo cual significa que no están conectadas entre sí ni con los restantes componentes del dictiosoma.

4) Una **cisterna trans**, conectada con la red trans.

5) Una **red trans**, similar a la red cis.

La cara de entrada del dictiosoma —representada por la red cis y la cisterna cis— sólo recibe vesículas transportadoras provenientes del RE (fig. 7-1).

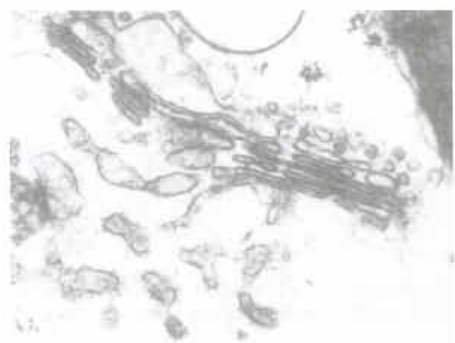


Fig. 7-7. Micrografía del complejo de Golgi que permite observar las cisternas cis, media y trans apiladas. 35.000×. (Cortesía de D. J. Morré.)

Dado que la red cis y la cisterna cis forman un solo compartimiento, las moléculas incorporadas a la membrana y a la cavidad del organoide circulan de la red a la cisterna por simple continuidad. En cambio, para pasar de la cisterna cis a las cisternas medias y de éstas a la cisterna trans, las moléculas se valen de vesículas transportadoras.

Como se aprecia en las figuras 7-1 y 7-5, las vesículas nacen en el borde de la cisterna cis y luego de un corto tránsito por el citosol se incorporan al borde de la cisterna media contigua. Lo mismo ocurre entre las sucesivas cisternas medias y entre la última de ellas y la cisterna trans. El recorrido se completa cuando las moléculas llegadas a la cisterna trans pasan a la red trans por simple continuidad.

A continuación, las moléculas que arriban a la red trans son transferidas —también mediante vesículas transportadoras— hacia la membrana plasmática o hacia los endosomas (fig. 7-1).

En el primer caso, las moléculas contenidas en el interior de la vesícula se vuelcan fuera de la célula —es decir, son secretadas— y las membranosas se integran a la membrana plasmática. El proceso de secreción lleva el nombre de exocitosis y se analizará en la sección 7-22.

En el segundo caso, la vesícula vuelca su contenido —consistente en enzimas hidrolíticas— en la luz de un endosoma. En la sección 7-31 se verá que ello conduce a la transformación del endosoma en lisosoma.

En las siguientes secciones se describen las funciones del RE y del complejo de Golgi, algunas de las cuales dependen de la acción complementaria de ambos organoides.

FUNCIONES DEL RETICULO ENDOPLASMATICO Y DEL COMPLEJO DE GOLGI

7-8. En el RE tienen lugar las reacciones centrales de la síntesis de los triacilgliceroles

Los **triacilgliceroles** (***triglicéridos***) están compuestos por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol (cap. 2-7).

Su síntesis comienza en el citosol, donde —mediante una tioquinasa— los ácidos grasos se unen a moléculas de coenzima A (CoA) y se forman acil CoA (fig. 7-8A).

$$\text{Acido graso} + \text{CoA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Tioquinasa}} \text{Acil CoA} + \text{ADP} + \text{P}$$

A continuación, sendas acil CoA transfieren sus ácidos grasos al C1′ y al C2′ del glicerol 3-fosfato, lo cual produce ácido fosfatídico (cap. 2-7) (figs. 2-13 y 7-8A). La reacción es catalizada por una aciltransferasa.

$$\text{Glicerol 3-fosfato} + 2\ \text{Acil CoA} \xrightarrow{\text{Aciltransferasa}} \text{Acido fosfatídico} + 2\ \text{CoA}$$

El ácido fosfatídico se inserta en la monocapa citosólica de la membrana del RE, donde se completa la síntesis del triacilglicerol (fig. 7-8A). Para ello, primero el ácido fosfatídico pierde el fosfato por acción de una fosfatasa y se convierte en 1,2-diacilglicerol (fig. 2-13).

$$\text{Acido fosfatídico} \xrightarrow{\text{Fosfatasa}} \text{1,2-diacilglicerol} + \text{P}$$

A continuación, mediante la diacilglicerol aciltransferasa, una nueva acil CoA transfiere su ácido graso al C3′ del 1,2-diacilglicerol (fig. 7-8A), lo cual completa la síntesis del triacilglicerol, que abandona la membrana del RE y se instala en el citosol (cap. 4-3).

1,2-diacilglicerol + Acil CoA $\xrightarrow{\text{Diacilglicerol aciltransferasa}}$ Triacilglicerol + CoA

En las células de la mucosa intestinal la mayoría de los triacilgliceroles se sintetizan eludiendo las etapas iniciales, ya que lo hacen a partir de monoacilgliceroles y diacilgliceroles, que son las formas como se absorben las grasas tras su digestión.

7-9. El RE es responsable de la biogénesis de las membranas celulares

La célula produce **membranas nuevas** de modo permanente. Lo hace con el fin de cubrir demandas de índole funcional, reemplazar a las desaparecidas por envejecimiento o para duplicarlas antes de la mitosis. En ocasiones, las produce para posibilitar el desarrollo de partes del cuerpo celular (por ejemplo, el axón en las neuronas).

La biogénesis de las membranas celulares comprende la síntesis de sus lípidos, de sus proteínas y de sus hidratos de carbono. Estos tres tipos de moléculas no se sintetizan separadamente y luego se integran para formar una membrana nueva, sino que se incorporan a una membrana preexistente, la membrana del RE. Luego, a medida que ésta crece, algunas de sus partes se desprenden como vesículas y se transfieren a los demás organoides del sistema de endomembranas o a la membrana plasmática.

En los capítulos 8-24 y 10-5 veremos que el RE también provee los fosfolípidos de las membranas de las mitocondrias y de los peroxisomas.

En las próximas secciones estudiaremos los mecanismos de incorporación de los lípidos y de las proteínas a la membrana del RE y los procesos de glicosilación de ambas moléculas.

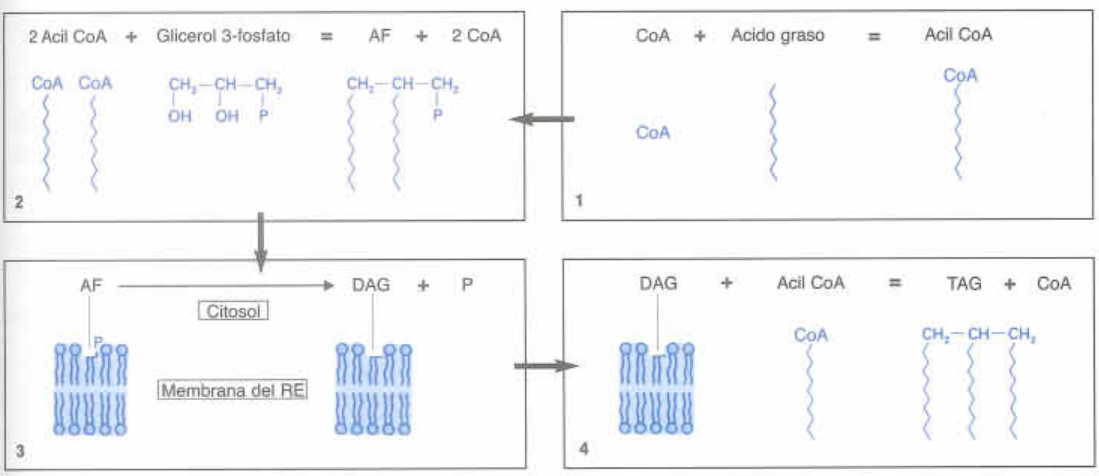


Fig. 7-8A. Síntesis de triacilgliceroles (*TAG*). El ácido fosfatídico (*AF*) se genera en el citosol. En cambio, las transformaciones del AF en diacilglicerol (*DAG*) y la de éste en triacilglicerol ocurren en la monocapa citosólica de la membrana del RE. Apenas se sintetizan, los TAG abandonan la membrana y se transfieren al citosol.

7-10. Los lípidos de las membranas celulares se sintetizan en la membrana del RE

Fosfatidilcolina. Debe recordarse que los **glicerofosfolípidos** están integrados por una molécula de glicerol, dos ácidos grasos, un fosfato y un segundo alcohol (caps. 2-7 y 3-3) (figs. 2-14 y 2-20).

La fosfatidilcolina se forma en la monocapa citosólica del RE por la unión de la citidina difosfato-colina (CDP-colina) con el 1,2-diacilglicerol (la formación de este último se describió en la sección 7-8). La reacción es catalizada por una fosfotransferasa específica (fig. 7-8B).

$$\text{1,2-diacilglicerol + CDP-colina} \xrightarrow{\text{Fosfotransferasa}} \text{Fosfatidilcolina + CMP}$$

Previamente, la CDP-colina se sintetiza en dos pasos. En el primero la colina es fosforilada con un fosfato tomado de la adenosina trifosfato, y en el segundo la fosforilcolina se combina con la citidina trifosfato.

Fosfatidiletanolamina. Las reacciones que llevan a la formación de la fosfatidiletanolamina son similares a las de la fosfatidilcolina, excepto porque se emplea CDP-etanolamina en lugar de CDP-colina (fig. 7-8B).

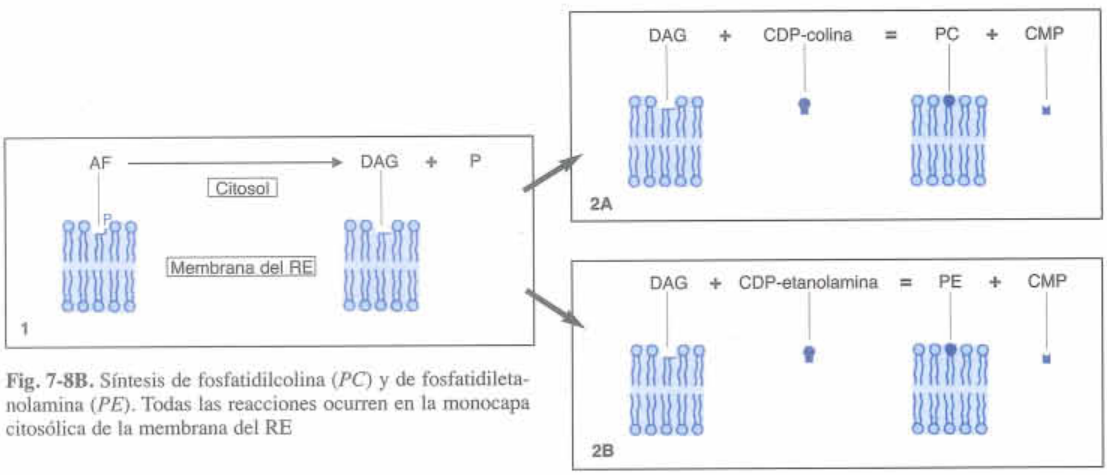


Fig. 7-8B. Síntesis de fosfatidilcolina (*PC*) y de fosfatidiletanolamina (*PE*). Todas las reacciones ocurren en la monocapa citosólica de la membrana del RE

Fosfatidilserina. En la formación de la fosfatidilserina, el ácido fosfatídico (sección 7-8) no pierde su fosfato y se combina —mediante una transferasa específica— con la CTP, lo cual genera CDP-1,2-diacilglicerol (fig. 7-8C).

$$\text{Acido fosfatídico + CTP} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{CDP-1,2-diacilglicerol + 2 P}$$

El fosfolípido se forma al combinarse —mediante otra transferasa— el aminoácido serina con el CDP-1,2-diacilglicerol.

$$\text{Serina + CDP-1,2-diacilglicerol} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{Fosfatidilserina + CMP}$$

Fosfatidilinositol. Las reacciones responsables de la síntesis del fosfatidilinositol (*PI*) son similares a las de la fosfatidilserina, excepto porque se emplea el polialcohol cíclico inositol en lugar de la serina (fig. 7-8C).

Este fosfolípido se convierte en ***fosfatidilinositol fosfato*** (***PIP***), en ***fosfatidilinositol difosfato*** (***PIP_2***) y en ***fosfatidilinositol trifosfato*** (***PIP_3***) por el agregado sucesivo de fosfatos (fig. 2-16). Las fosforilaciones son catalizadas por quinasas, con fosfatos tomados de moléculas de ATP.

$$PI + ATP \xrightarrow{\text{Quinasa}} PIP + ADP$$

$$PIP + ATP \xrightarrow{\text{Quinasa}} PIP_2 + ADP$$

$$PIP_2 + ATP \xrightarrow{\text{Quinasa}} PIP_3 + ADP$$

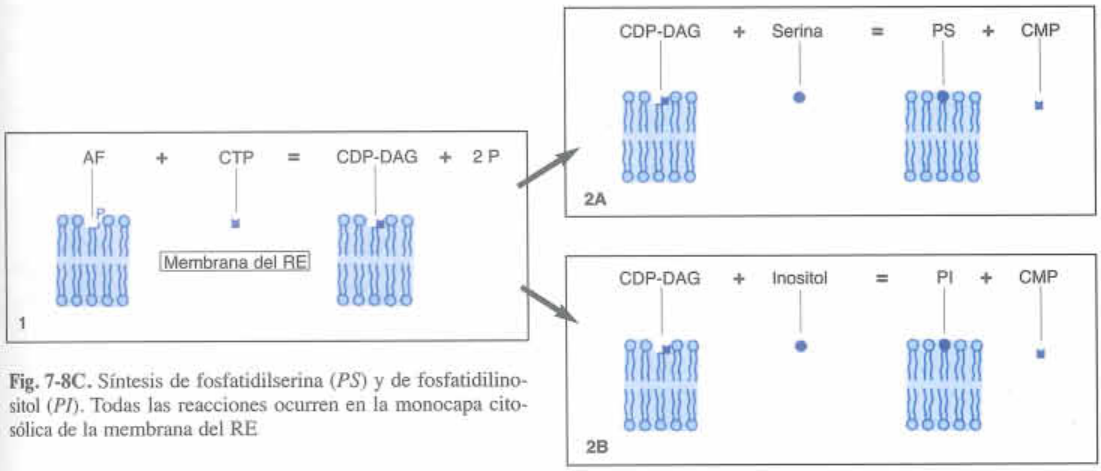


Fig. 7-8C. Síntesis de fosfatidilserina (*PS*) y de fosfatidilinositol (*PI*). Todas las reacciones ocurren en la monocapa citosólica de la membrana del RE

Una vez formadas, la mayoría de las fosfatidilcolinas pasan por "flip-flop" (cap. 3-3) de la monocapa citosólica a la monocapa luminal de la membrana del RE. La translocación es impulsada por una enzima denominada **flipasa**, que hace posible el paso de la cabeza polar del fosfolípido por la región hidrofóbica de la bicapa.

Dado que esta enzima actúa menos eficientemente sobre la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, la mayoría de estos fosfolípidos quedan retenidos en la monocapa citosólica (cap. 3-3).

Así, el proceso de translocación tiene doble consecuencia: hace que se empareje la cantidad de fosfolípidos en ambas monocapas y que se distribuyan asimétricamente.

Esfingomielina. La esfingomielina es un **esfingofosfolípido** compuesto por la ceramida unida a la fosforilcolina (fig. 2-18). En el capítulo 2-7 se vio que la ceramida se forma por el agregado de un ácido graso a la esfingosina, que es un aminoalcohol que posee una cadena hidrocarbonada larga (fig. 2-19).

La ceramida se forma en la monocapa citosólica de la membrana del RE con el concurso de una transferasa (fig. 7-8D).

$$\text{Esfingosina} + \text{Acil CoA} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{Ceramida} + \text{CoA}$$

La síntesis de la esfingomielina se completa en la monocapa luminal del complejo de Golgi, de modo que la ceramida debe translocarse —merced a

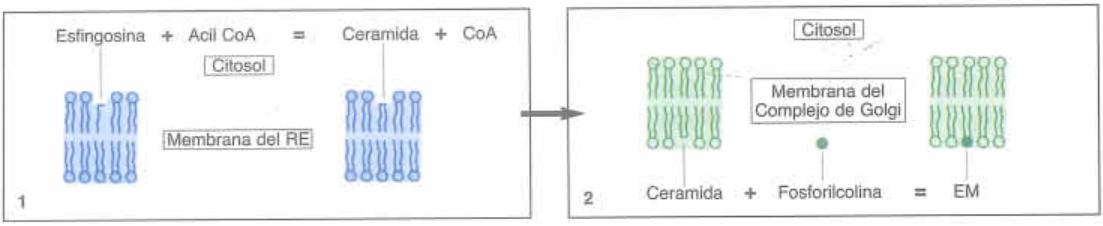


Fig. 7-8D. Síntesis de esfingomielina (*EM*). La primera reacción ocurre en la monocapa citosólica de la membrana del RE. La segunda, en la monocapa luminal de la membrana del complejo de Golgi.

la flipasa—, abandonar la membrana del RE y transferirse a la membrana del complejo. Como se sabe, esta transferencia se realiza mediante vesículas transportadoras.

En su nueva localización la ceramida se combina con la fosforilcolina merced a otra transferasa, lo que la convierte en esfingomielina (fig. 7-8D).

$$\text{Ceramida} + \text{Fosforilcolina} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{Esfingomielina}$$

Colesterol. La membrana del RE incorpora moléculas de colesterol ingresadas en la célula por endocitosis (sección 7-42) y también las sintetiza. Igual que los fosfolípidos, el colesterol se transfiere a las restantes membranas de la célula —especialmente a la membrana plasmática— mediante vesículas transportadoras.

7-11. Los lípidos de las membranas celulares se glicosidan en el complejo de Golgi

La síntesis de los **glicolípidos** tiene lugar exclusivamente en el complejo de Golgi.

En la formación de los ***galactocerebrósidos*** (fig. 2-21) interviene una transferasa, que transfiere la galactosa de la uridina difosfato-galactosa al primer hidroxilo de la ceramida.

$$\text{Ceramida} + \text{UDP-galactosa} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{Galactocerebrósido} + \text{UDP}$$

La síntesis de los ***glucocerebrósidos*** (fig. 2-21) es similar, salvo por el hecho de que se transfiere la glucosa de la UDP-glucosa mediante otra transferasa.

$$\text{Ceramida} + \text{UDP-glucosa} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{Glucocerebrósido} + \text{UDP}$$

Los ***gangliósidos*** (fig. 2-22) se forman cuando a la ceramida se unen —de a uno por vez— los monómeros de las cadenas oligosacáridas. El primer monómero que se agrega es la glucosa; luego lo hacen —en diferentes cantidades y ordenamientos según el tipo de ganglióside— la galactosa, la N-acetilglucosamina, la N-acetilgalactosamina, el ácido siálico o N-acetilneuramínico y la fucosa (cap. 2-7).

Al igual que la galactosa y la glucosa de los cerebrósidos, los monosacáridos que participan en la síntesis de los gangliósidos se presentan uni-

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
CIUDAD DEL ESTE

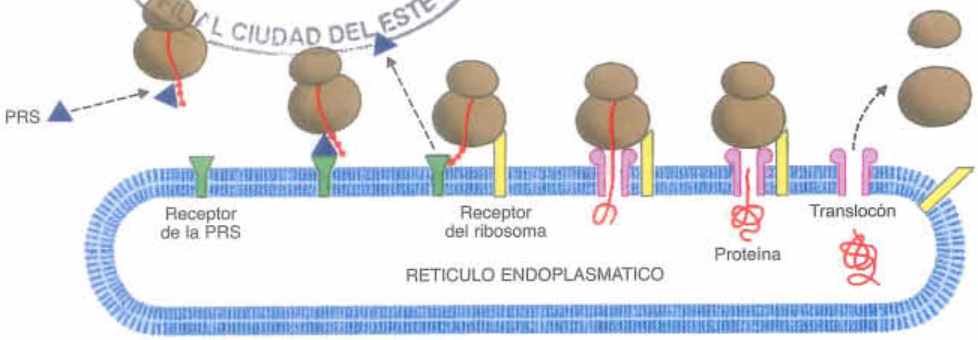


Fig. 7-9. Unión del ribosoma con la membrana del RER. Obsérvense el receptor de la PRS, el receptor del ribosoma y el paso de la proteína a través del translocón.

dos a nucleótidos (por ejemplo, UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, CMP-ácido siálico y GDP-glucosa).

7-12. Las proteínas destinadas al RE se insertan en la membrana o se liberan en la cavidad del organoide

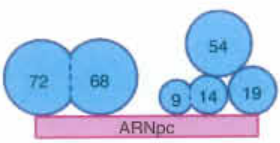
Las **proteínas**, excepto unas pocas pertenecientes a las mitocondrias, se sintetizan en los **ribosomas** del citosol (cap. 16-9). Si bien todos los ribosomas citosólicos son iguales, algunos están dispersos en el citosol y otros se hallan adosados a la membrana del **RER** (fig. 16-8). A continuación veremos por qué y cómo.

Los primeros pasos en la síntesis de una proteína destinada al RE se producen en el ribosoma cuando éste aún se encuentra libre en el citosol. La unión del ribosoma a la membrana del RE tiene lugar si la proteína que surge del ribosoma posee un segmento peptídico con la información apropiada, es decir, un **péptido señal** específico para dicha membrana (cap. 4-4). En las proteínas destinadas al RER, el péptido señal suele consistir en una secuencia de alrededor de 30 aminoácidos —5 a 10 altamente hidrofóbicos— situada en el extremo amino o cerca de él (tabla 4-1).

Las proteínas que se liberan en la cavidad del RER poseen sólo esa señal, localizada en el extremo amino de la molécula. En cambio, las que se insertan en la membrana del organoide contienen, salvo excepciones, un péptido señal cercano al extremo amino y otras señales, cuyo número depende de la cantidad de veces que la proteína cruza la bicapa lipídica (fig. 3-10). Por ejemplo, si la proteína transmembranosa atraviesa la bicapa una sola vez (monopaso), necesita una sola señal adicional, llamada **señal de anclaje** por motivos que se verán más adelante. Cuando se trata de una proteína multipaso, ésta contiene tantas señales como veces cruza la bicapa, consistentes en péptidos señal que se alternan con señales de anclaje. Las señales de anclaje contienen secuencias de aminoácidos de largo semejante al de los péptidos señal (tabla 4-1).

Cualesquiera que sean el número y la localización de las señales, apenas el primer péptido señal sale del ribosoma es reconocido por la **partícula de reconocimiento de la señal** (o **PRS**) (fig. 7-9), que es un complejo ribonucleoproteico compuesto por seis proteínas diferentes y una molécula de ARN denominada **ARNpc** (por *pequeño citosólico*; en inglés ***scRNA***, por

Fig. 7-10. Composición de la partícula de reconocimiento de la señal (PRS). Los círculos corresponden a las seis proteínas que acompañan al ARNpc.



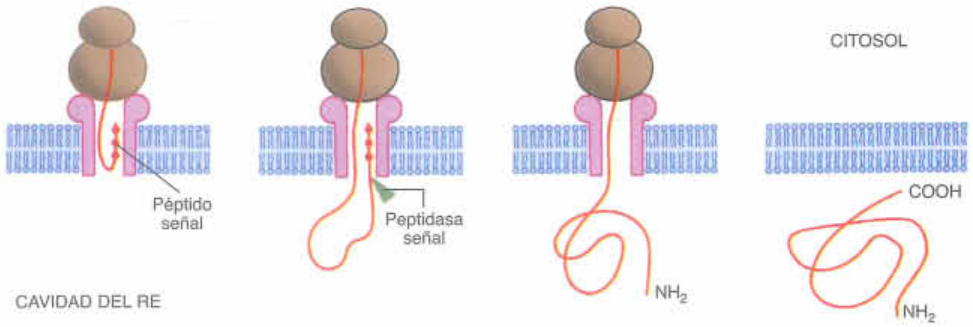


Fig. 7-11. Esquema que ilustra el ingreso de las proteínas en la cavidad del RER.

small cytosolic) (fig. 7-10). Las características y el procesamiento de este ARN se analizan en los capítulos 13-2, 14-18 y 15-12.

En la figura 7-9 puede observarse cómo, ligada al péptido señal, la PRS se dirige hacia el RER y se une a su membrana mediante un receptor específico. Esta unión insume energía, la cual es cedida por un GTP hidrolizado por una GTPasa presente en el receptor.

La misma figura permite ver cómo la PRS arrastra al ribosoma hacia el RER (en la sección 7-5 se dijo que la membrana de este organoide posee receptores para los ribosomas) y cumple otra importante función: detiene la síntesis de la proteína para que ésta no salga del ribosoma, ya que fuera de él se plegaría y no podría ingresar en el RER.

Muestra además que cuando el ribosoma se une a su receptor, la PRS se separa del suyo. Dado que la PRS se separa también del péptido señal, se reanuda la síntesis de la proteína, cuyo extremo sale del ribosoma e ingresa en un túnel proteico que cruza la membrana del RER (fig. 7-9). En el capítulo 3-9 se dijo que los túneles de esta clase —utilizados por las proteínas para atravesar las membranas de los organoides— se denominan **translocones**. El translocón del RER se diferencia de los translocones de los otros organoides porque se asocia al receptor del ribosoma, con el que forma un complejo unificado (fig. 7-9).

Volviendo a la PRS, cuando se separa de su receptor (y del péptido señal) puede ser usada nuevamente. Algo similar ocurre con el ribosoma al cabo de la síntesis de la proteína (fig. 7-9).

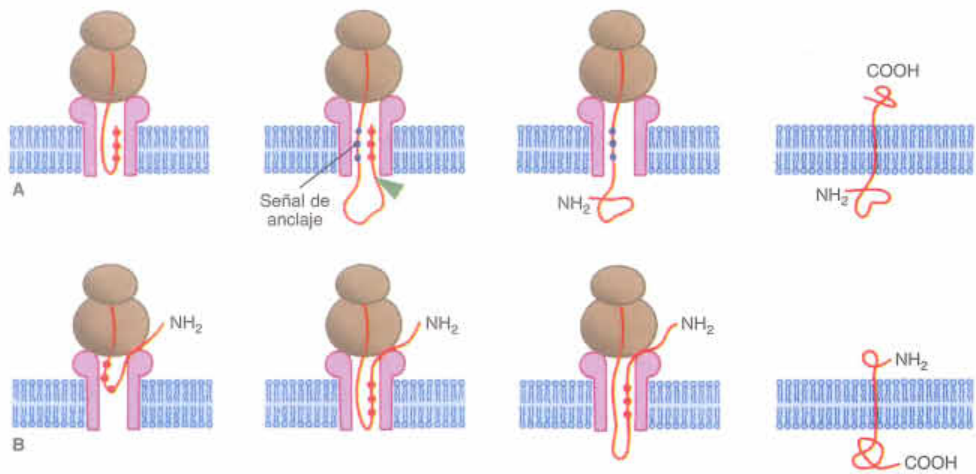


Fig. 7-12. Esquemas que muestran cómo se incorporan las proteínas a la membrana del RER. El extremo amino de la proteína puede quedar en la cavidad del organoide (**A**) o en el citosol (**B**).

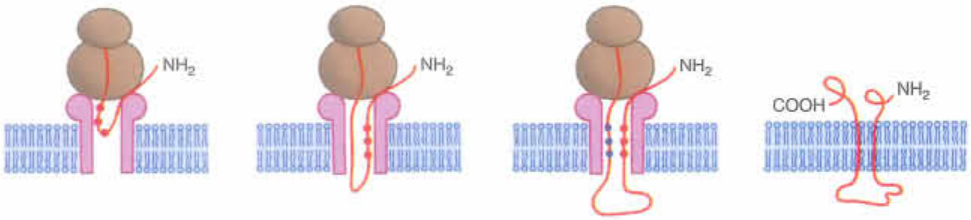


Fig. 7-13. Mecanismo de inserción de las proteínas bipaso en la membrana del RER.

7-13. Las proteínas destinadas al RE contienen una o más señales según tengan que liberarse en la cavidad del organoide o insertarse en su membrana

Como se dijo en la sección anterior, las proteínas destinadas a la **cavidad del RER** poseen un solo péptido señal, localizado en el extremo amino. Por lo tanto, el tramo de la molécula que primero ingresa en el translocón incluye al péptido señal inevitablemente, según se ve en la figura 7-11.

Debido a que el péptido señal permanece en el translocón, cuando los tramos proteicos que le siguen ingresan en la cavidad, se doblan como una horquilla. Luego, en virtud de que el péptido señal es escindido por una proteasa conocida como **peptidasa señal**, el péptido se pierde y se genera en la proteína un nuevo extremo amino, que pasa a la cavidad (fig. 7-11). Finalmente, ésta recibe a los restantes tramos de la proteína, cuya síntesis continúa en el ribosoma por el incesante agregado de aminoácidos en su extremo carboxilo (cap. 16-13).

Al término de la síntesis, la proteína se libera en la cavidad del RER (figs. 7-9 y 7-11). Según de qué proteína se trate, permanecerá en el RE o se dirigirá, mediante vesículas transportadoras, al complejo de Golgi, donde residirá en forma permanente o se transferirá, también por medio de vesículas transportadoras, a un endosoma o a la membrana plasmática, en el último caso para su secreción.

En la sección anterior también se dijo que, salvo excepciones, las proteínas destinadas a la **membrana del RER** poseen un péptido señal en el extremo amino y una o más señales adicionales. Tales proteínas se insertan en la membrana del RER por alguno de los siguientes mecanismos (figs. 7-12, 7-13 y 7-14).

Si la proteína posee una sola señal adicional, ésta se ancla en la bicapa lipídica —de ahí el nombre de señal de anclaje— y el péptido señal es escindido por la peptidasa señal. Como consecuencia, se forma una proteína transmembranosa ***monopaso*** (cruza la bicapa una sola vez), con el extremo amino dirigido hacia la cavidad del RE y el extremo carboxilo en el lado citosólico (fig. 7-12A).

Algunas proteínas transmembranosas monopaso están orientadas al revés, es decir, con el extremo amino hacia el lado citosólico. Esta clase de proteínas posee el péptido señal solamente, y no en el extremo amino sino cerca de él. La figura 7-12B muestra la conversión del péptido señal en señal de anclaje y los pasos que debe seguir para insertarse en la bicapa lipídica. El pép-

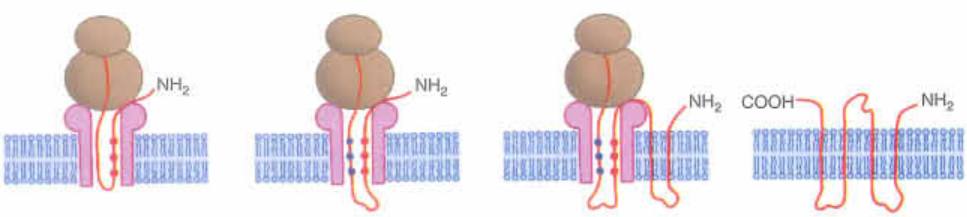


Fig. 7-14. Mecanismo de inserción de las proteínas multipaso en la membrana del RER.

tido señal no es escindido por la peptidasa señal debido a su posición interna en la cadena proteica.

La formación de una proteína transmembranosa ***bipaso*** requiere de un péptido señal situado en las cercanías del extremo amino y de una señal adicional (fig. 7-13). Dada su posición interna en la cadena proteica, el péptido señal tampoco es afectado por la peptidasa señal, por lo que se comporta como una señal de anclaje y queda retenido en la bicapa lipídica.

Además del péptido señal, la instalación de una proteína ***multipaso*** necesita de un número variable de señales adicionales, tantas (menos una) como sean las veces que la proteína debe atravesar la membrana. Al igual que en las proteínas bipaso, se trata de señales de anclaje, la mitad de las cuales —alternadamente— actúan como lo hacen los péptidos señal que quedan retenidos en la bicapa lipídica (fig. 7-14).

Todas las señales adicionales —tanto las de anclaje como las que actúan como péptidos señal— abordan la membrana por el mismo translocón. Más aún, a medida que las nuevas señales ingresan en el translocón, las precedentes lo abandonan por un costado y se ubican entre los fosfolípidos de la bicapa lipídica (fig. 7-14). La salida lateral de las señales es posible porque la pared del translocón es incompleta.

En el capítulo 3-4 se mencionó que los tramos de las proteínas que atraviesan la bicapa lipídica poseen generalmente una estructura en hélice α. Ahora puede agregarse que en su momento actuaron como péptidos señal o como señales de anclaje.

De acuerdo con la naturaleza de la proteína, ésta permanecerá en la membrana del RE, o pasará a la membrana de otro organoide del sistema de endomembranas, o a la membrana plasmática. Según la figura 7-2, cualquiera que sea su destino, la proteína tendrá la misma orientación que poseía cuando se hallaba en la membrana del RE. Algunas proteínas pueden quedar retenidas en la membrana plasmática o ser secretadas. Por ejemplo, la inmunoglobulina producida por el linfocito B primero actúa como un receptor membranoso y luego se secreta (es decir, se convierte en un anticuerpo). En ambos pasos la molécula es prácticamente idéntica, salvo por el hecho de que en el primero posee un segmento adicional que la mantiene anclada en la membrana. Este segmento corresponde a una señal de anclaje cercana al extremo carboxilo de la proteína, inexistente en la inmunoglobulina que se secreta (cap. 15-7).

7-14. Polipéptidos fabricados por ribosomas libres en el citosol se incorporan al RE

Como excepción a la regla, existen polipéptidos —generalmente de tamaño muy pequeño— que ingresan en el RE a pesar de ser fabricados por ribosomas libres en el citosol. Se incorporan al RE a través de túneles constituidos por proteínas transportadoras de la familia **ABC** (cap. 3-26), presentes normalmente en la membrana de ese organoide.

7-15. Chaperonas hsp70 aseguran el plegamiento normal de las proteínas en la cavidad del RE

En el capítulo 4-5 se analizaron las funciones de las chaperonas hsp70 citosólicas. La cavidad del RER posee chaperonas hsp70 similares, pues evitan

el plegamiento prematuro o incorrecto de las proteínas ingresadas en el organoide. Por añadidura, reconocen en ellas tramos incorrectamente plegados y los asisten para que se plieguen bien.

Si las chaperonas no logran su cometido, las proteínas mal plegadas pasan del RER al citosol después de atravesar el translocón que usaron para ingresar en el organoide. Este fenómeno recibe el nombre de **retrotranslocación**. En el citosol las proteínas se conjugan con ubiquitinas y son degradadas por proteasomas (cap. 4-6).

7-16. La síntesis y el procesamiento de los oligosacáridos ligados a proteínas mediante enlaces N comienzan en el RER y terminan en el complejo de Golgi

La mayoría de las proteínas que ingresan en el sistema de endomembranas incorporan **oligosacáridos** a sus moléculas, de modo que se convierten en **glicoproteínas**.

Como se vio en el capítulo 2-6, los oligosacáridos se unen a las proteínas mediante enlaces N-glicosídicos y O-glicosídicos (figs. 2-7 y 2-8).

La síntesis de los oligosacáridos que se unen por **enlaces N-glicosídicos** comienza en el RER y concluye en el complejo de Golgi. En ella participan enzimas llamadas glicosiltransferasas, que toman monosacáridos de moléculas donantes y los transfieren a la cadena oligosacárida en crecimiento. Como en los glicolípidos, las moléculas donantes son nucleósidos: UDP (para la glucosa, la galactosa, la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina), GDP (para la manosa y la fucosa) y CMP (para el ácido siálico) (sección 7-10).

Además interviene el **dolicol fosfato** (cap. 2-7), un lípido especial de la membrana del RER que la atraviesa unas tres veces (figs. 2-24 y 7-15). El primer monómero del futuro oligosacárido es la N-acetilglucosamina y se liga al fosfato del dolicol. A continuación, de a uno por vez, se agregan otros seis monosacáridos, primero una nueva N-acetilglucosamina y luego cinco manosas. Como muestra la figura 7-15, la unión del dolicol fosfato con la primera N-acetilglucosamina se realiza por medio de otro fosfato —cedido por la UDP que dona la hexosa—, por lo que se forma un puente pirofosfato.

Mientras tanto, otros dos dolicoles fosfato aceptan, respectivamente, cuatro manosas y tres glucosas, las cuales también se incorporan de a una por vez.

A continuación, en el interior del RER, tras desprenderse de sus respectivos dolicoles, las cadenas de cuatro manosas y de tres glucosas —en ese orden— se suman al heptasacárido del dolicol difosfato, que por lo tanto se convierte en un oligosacárido de 14 unidades, compuesto por dos N-acetilglucosaminas, nueve manosas y tres glucosas (fig. 7-15). Este oligosacárido se desprende del dolicol difosfato y, mediante una oligosacariltransferasa, se liga a una de las asparaginas de una proteína de la membrana del RER (fig. 7-16).

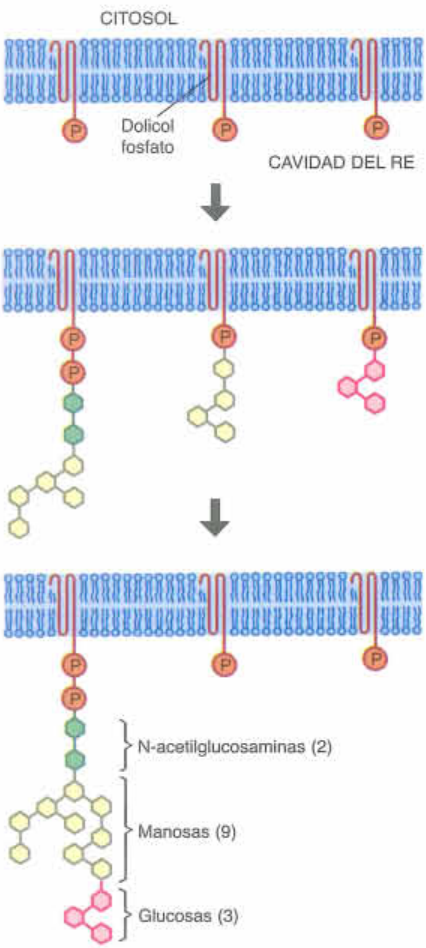


Fig. 7-15. Comienzo de la síntesis de los oligosacáridos que se ligan a proteínas de la membrana del RER mediante enlaces N-glicosídicos. Obsérvese la participación de los tres dolicoles fosfato.

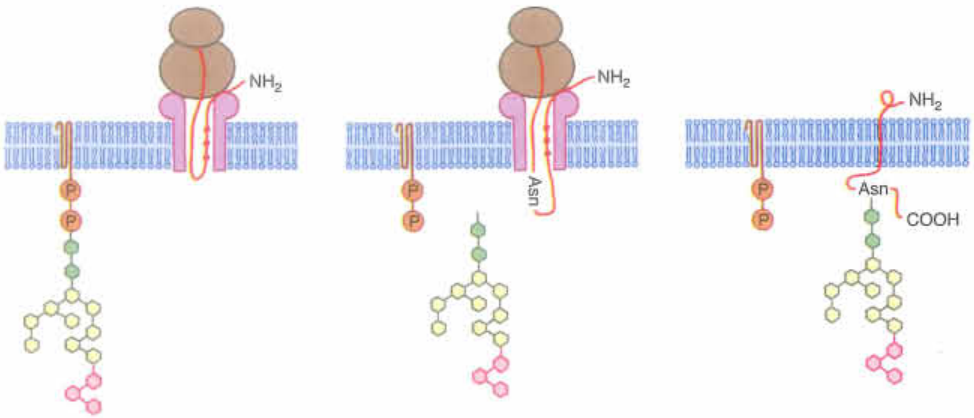


Fig. 7-16. Esquema que ilustra cómo el oligosacárido precursor (de catorce hexosas) se desprende del dolicol y se liga a una proteína de la membrana del RER. *Asn*, asparagina.

Por su parte, los tres dolicoles libres pueden ser utilizados otra vez por el RER para la síntesis de nuevos oligosacáridos.

La cadena oligosacárida ligada a la proteína se procesa, es decir, experimenta una serie de cambios. Estos comienzan con la remoción de las tres glucosas y de una a cuatro de las nueve manosas. La glucosa distal es removida por la α-glucosidasa I, las otras dos por la α-glucosidasa II, y las manosas por la α-manosidasa.

La cadena remanente continúa procesándose en el complejo de Golgi, a cuya membrana llega la glicoproteína mediante una vesícula transportadora. En el complejo de Golgi la cadena oligosacárida experimenta nuevos agregados y remociones de monosacáridos, distintos según el tipo de glicoproteína que se requiere formar. No obstante, en todos los casos la cadena conserva las dos N-acetilglucosaminas y las tres manosas proximales del oligosacárido original, y generalmente agrega ácidos siálicos en los extremos de la molécula ramificada (fig. 7-17) (cap. 2-6).

En el complejo de Golgi las enzimas responsables del procesamiento de los oligosacáridos obran secuencialmente, para lo cual se hallan distribuidas entre la región de entrada y la región de salida del organoide siguiendo el orden en que actúan (fig. 7-18).

No se conocen los mecanismos regulatorios que llevan a las glicoproteínas a experimentar una clase de procesamiento y no otro.

7-17. La síntesis de los oligosacáridos ligados a proteínas por enlaces O tiene lugar en el complejo de Golgi

En el capítulo 2-6 se vio que los oligosacáridos que se hallan unidos a proteínas por **enlaces O-glicosídicos** se ligan a una serina o a una treonina. Su síntesis se cumple en la cavidad del complejo de Golgi por el agregado —mediante glicosiltransferasas específicas— de sucesivos monosacáridos. Prime-

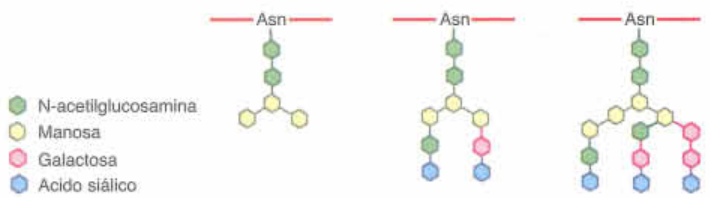


Fig. 7-17. Una vez formado, el oligosacárido precursor (de catorce hexosas) se procesa secuencialmente en el RER y en los sucesivos compartimientos del complejo de Golgi. Esta figura ilustra tres ejemplos de oligosacáridos formados al cabo de ese procesamiento. *Asn*, asparagina.

ro se liga una N-acetilgalactosamina a una proteína de la membrana del organoide y luego —de a uno por vez— se agregan los otros monosacáridos. Por lo general, la cadena oligosacárida incorpora ácidos siálicos en su periferia.

7-18. La síntesis de los glicosaminoglicanos y de los proteoglicanos tiene lugar en el retículo endoplasmático

Los **proteoglicanos** son glicoproteínas formadas por la unión de proteínas con **glicosaminoglicanos** (**GAG**). Como ya se señaló en el capítulo 2-6, los GAG son polisacáridos complejos constituidos por una sucesión de unidades disacáridas (fig. 2-10). Se ligan a la proteína por intermedio de un tetrasacárido compuesto por una xilosa, dos galactosas y un ácido glucurónico (fig. 2-11).

La síntesis de los proteoglicanos tiene lugar en la cavidad del retículo endoplasmático. Allí, mediante un enlace O-glicosídico, la xilosa del tetrasacárido se liga a una serina de una proteína localizada en la membrana del organoide. A continuación, en el extremo del tetrasacárido correspondiente al ácido glucurónico se incorporan, mediante sendas glicosiltransferasas específicas, los sucesivos monosacáridos que se alternan en el GAG, de a uno por vez. Aparentemente los grupos sulfato se agregan a los GAG a medida que éstos se alargan.

Pueden asociarse más de cien GAG a una sola proteína, y en ocasiones varios de estos proteoglicanos se ligan a una molécula de ácido hialurónico —que es el GAG de mayor tamaño—, lo cual origina agregados moleculares de enormes proporciones (cap. 6-3) (fig. 6-1).

Los proteoglicanos pasan a la membrana plasmática, donde forman parte del glicocáliz (cap. 3-8) (fig. 3-14). Desde allí muchos son liberados al medio extracelular, para lo cual sus moléculas deben escindirse, ya que se trata de glicoproteínas integrales (cap. 3-4).

En los tejidos conectivos los proteoglicanos que se liberan pasan a la matriz extracelular (cap. 6-3), mientras que en algunos epitelios de revestimiento forman parte del moco que protege y lubrica su superficie. Llamativamente, a veces retornan a las células y se reintegran al glicocáliz, donde quedan adosados como glicoproteínas periféricas.

7-19. Algunas proteínas son procesadas en el RE y en el complejo de Golgi

Antes de ser secretadas, algunas proteínas experimentan una serie de modificaciones, imprescindibles para su funcionamiento normal. Por ejemplo, en las células β de los islotes del páncreas se sintetiza la preproinsulina, que es la prohormona precursora de la ***insulina*** (fig. 7-19). En el RE, al ser remo-

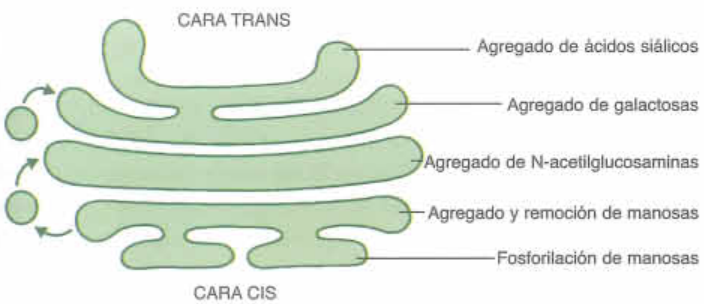


Fig. 7-18. Ejemplos de agregados y remociones de moléculas en un oligosacárido a medida que pasa por los sucesivos compartimientos del complejo de Golgi.

vido de su extremo amino un segmento de 26 aminoácidos —correspondiente al péptido señal—, la preproinsulina se convierte en proinsulina. Esta contiene 81 aminoácidos, 51 de los cuales pertenecen a la insulina activa y 30 a un péptido de conexión llamado péptido C. Por medio de vesículas transportadoras, la proinsulina pasa del RE al complejo de Golgi, donde una enzima hidrolítica específica separa la insulina del péptido C. Luego, mediante otras vesículas transportadoras, ambas moléculas son conducidas hacia la membrana plasmática para su secreción.

En el capítulo 16-24 se describirá el procesamiento experimentado por otra prohormona, la ***proopiomelanocortina (POMC)***.

7-20. En el sistema de endomembranas las proteínas son clasificadas según su naturaleza química y su destino

En la sección 7-13 definimos las distintas vías seguidas por las proteínas luego de su incorporación al RER. Estas moléculas, excepto las que se establecen como residentes permanentes en el RE o en el complejo de Golgi, alcanzan el extremo de salida de este último, donde se clasifican para su ulterior despacho. Según su naturaleza, tendrán como destino incorporarse a un endosoma o dirigirse a la superficie celular (fig. 7-1).

Los itinerarios seguidos por las proteínas dependen de ciertas señales en sus moléculas y de receptores específicos en los lugares por donde pasan.

La primera señal fue descubierta en las enzimas hidrolíticas destinadas a los endosomas. Como se verá en la sección 7-30, luego de arribar a un sector específico de la región de salida del complejo de Golgi, estas proteínas se transfieren —mediante vesículas transportadoras— a endosomas cargados con sustancias endocitadas en la superficie celular.

¿Por qué las vesículas que transportan enzimas hidrolíticas destinadas a los endosomas se fusionan con ellos y no se dirigen a la membrana plasmática? Téngase en cuenta que en el segundo caso podrían ser secretadas hacia el medio extracelular y producir graves consecuencias. La respuesta abarca varios procesos, pero la causa responsable de la conducción de las enzimas hacia el lugar adecuado es la presencia de grupos **manosa 6-fosfato** en sus moléculas.

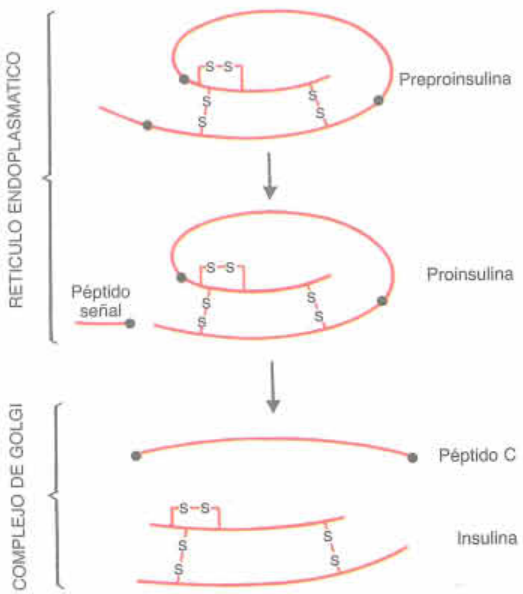


Fig. 7-19. Formación de la insulina como producto final del procesamiento de la preproinsulina en el RE y en el complejo de Golgi de las células β de los islotes del páncreas.

Estos grupos son las señales que conducen a las enzimas hasta la región de salida del complejo de Golgi y las colocan en los sectores reservados para su envío hacia los endosomas (fig. 7-20).

La manosa 6-fosfato se forma apenas la enzima hidrolítica —proveniente del RE— arriba a la región de entrada del complejo de Golgi (fig. 7-18). Es generada por la acción de dos enzimas, la N-acetilglucosamina fosfotransferasa y la N-acetilglucosamina glicosidasa. La primera agrega una N-acetilglucosamina fosfato al C6' de una de las manosas de los oligosacáridos de la enzima hidrolítica (como vemos, ésta es una glicoproteína). La segunda remueve a la N-acetilglucosamina pero no al fosfato, que queda

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

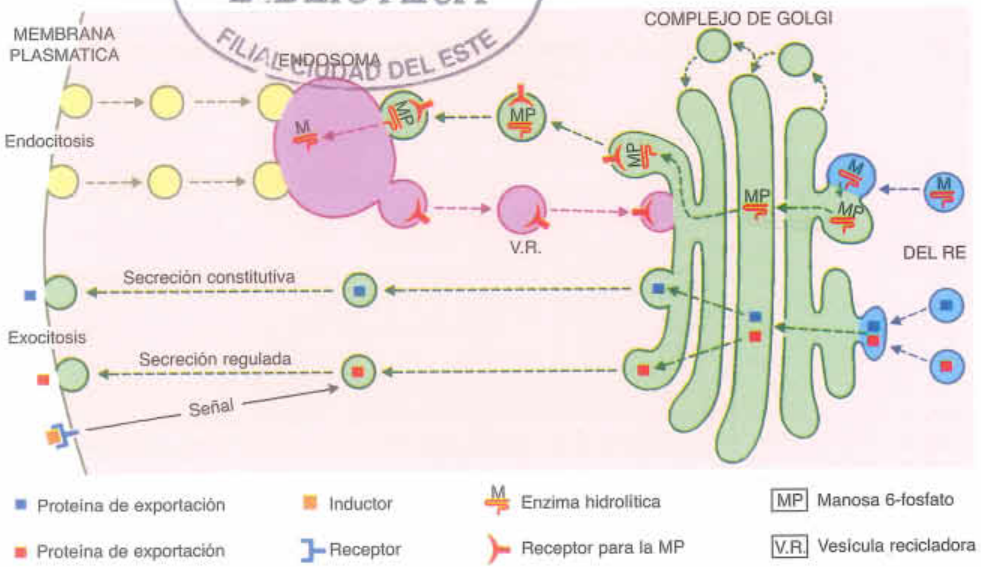


Fig. 7-20. Se observa el traslado de las proteínas provenientes del RE a través de los restantes organoides del sistema de endomembranas, su clasificación en el complejo de Golgi y sus lugares de destino. Junto a la proteína enzimática destinada al endosoma se muestra una manosa 6-fosfato (MP), que es la señal que determina el itinerario apropiado que debe seguir esa proteína. Se observan también imágenes de endocitosis y de exocitosis, ésta última en sus dos modalidades, la secreción constitutiva y la secreción regulada.

retenido en el C6′ de la manosa. Conviene agregar que durante el procesamiento de las enzimas en el complejo de Golgi las manosas fosforiladas nunca son removidas.

Una vez arribada la enzima hidrolítica al lugar correcto de la región de salida del complejo de Golgi, se liga —a través de la manosa 6-fosfato— a un receptor específico presente en la membrana del organoide, que corresponde a ese lugar. Luego la enzima es despachada hacia el endosoma mediante el mecanismo selectivo que se analizará en la sección 7-40.

La importancia del arribo de las enzimas hidrolíticas a los lugares correctos del complejo de Golgi se confirma por la existencia de una rara enfermedad lisosómica que se produce por la falla de dicha función. Así, en la ***enfermedad de células I*** (por *inclusión*), a causa de trastornos genéticos los fibroblastos no poseen N-acetilglucosamina fosfotransferasa, de modo que no se forman manosas 6-fosfato en las enzimas hidrolíticas destinadas a los endosomas. Por consecuencia, las vesículas que transportan a esas enzimas se dirigen hacia la membrana plasmática y se secretan en el medio extracelular. La falta de enzimas en los endosomas impide la digestión de las sustancias endocitadas, las cuales pasan al citosol y pueden acumularse como inclusiones (cap. 4-3).

El hallazgo de la manosa 6-fosfato y de su receptor llevó al descubrimiento de otras señales involucradas en la distribución y la canalización de las proteínas a través del sistema de endomembranas. Se las menciona en la tabla 7-1.

7-21. Vesículas transportadoras surgidas del complejo de Golgi se unen a endosomas

En la sección anterior se señaló que la cara de salida del complejo de Golgi emite vesículas transportadoras destinadas a los endosomas y a la membrana plasmática (fig. 7-1).

Las vesículas que se unen a los endosomas integran, dentro del sistema de

Tabla 7-1. Algunas señales involucradas en el transporte de proteínas por el sistema de endomembranas

Señal	*Transporte*
KDEL KKXX	Del RE al complejo de Golgi y retorno al RE
GPI	Del complejo de Golgi a la membrana plasmática (secreción)
Manosa 6-fosfato Varias L e Y	Del complejo de Golgi a los endosomas (enzimas hidrolíticas)
YQRL NPXY	De la membrana plasmática a los endosomas (endocitosis)

D, ácido aspártico; *E*, ácido glutámico; *K*, lisina; *L*, leucina; *N*, asparagina; *P*, prolina; *Q*, glutamina; *R*, arginina; *Y*, tirosina; *X*, cualquier aminoácido; *GPI*, glicosilfosfatidilinositol.

endomembranas, un subsistema importantísimo para el funcionamiento de la célula, dedicado a la digestión de las sustancias que ingresan por endocitosis. Lo analizaremos a partir de la sección 7-28.

7-22. Las vesículas transportadoras destinadas a la superficie celular descargan su contenido fuera de la célula mediante un proceso llamado exocitosis

Una buena parte de las vesículas transportadoras nacidas en la cara de salida del complejo de Golgi tiene como destino la membrana plasmática.

De acuerdo con lo estudiado en la sección 7-1, se deduce que las membranas de estas vesículas se transfieren a la membrana plasmática y que las moléculas solubles contenidas en sus cavidades salen al exterior (se las llama "moléculas de exportación").

La vesícula transportadora expulsa su contenido fuera de la célula por un proceso denominado **exocitosis**, que consiste en la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática (fig. 7-2) y la descarga del contenido vesicular en el exterior (fig. 7-20).

En ocasiones, la cantidad de membrana transferida a la membrana plasmática alcanza grandes proporciones. Ello se compensa mediante la formación simultánea de vesículas transportadoras que operan en sentido contrario, es decir, que nacen de la membrana plasmática y se transfieren al complejo de Golgi. Estas vesículas de reciclaje se generan por **endocitosis**, un proceso del que nos ocuparemos en la sección 7-29 y que es inverso a la exocitosis. Como veremos, la endocitosis se vale de endosomas, que funcionan como verdaderas estaciones de relevo entre la membrana plasmática y el complejo de Golgi (figs. 7-1 y 7-20).

Un reciclaje similar ocurre en los terminales de los axones de las neuronas, donde vesículas generadas por endocitosis se incorporan a endosomas con el fin de reciclar la membrana cedida a la membrana plasmática del terminal axónico durante la exocitosis de las vesículas sinápticas (fig. 7-21). Debe señalarse que en este caso los endosomas no actúan como intermediarios entre la membrana plasmática y el complejo de Golgi, ya que éste se halla en el cuerpo de la neurona, muy lejos del terminal axónico. Además de re-

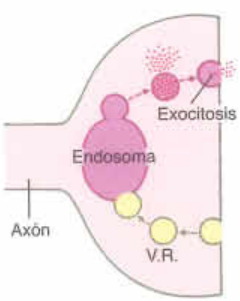


Fig. 7-21. Representación esquemática de la exocitosis y del reciclaje de membranas en el terminal axónico.

cibir a las vesículas recicladoras, los endosomas de las terminaciones nerviosas generan las vesículas sinápticas que se cargan de neurotransmisores, cuya exocitosis completa el ciclo.

7-23. La célula produce dos clases de secreciones, una constitutiva y otra regulada

El proceso que provoca la descarga del contenido de las vesículas transportadoras en el medio extracelular se denomina **secreción**. Esta puede ser constitutiva o regulada (fig. 7-20).

En la **secreción constitutiva** las moléculas se secretan en forma automática, conforme el complejo de Golgi emite las vesículas que las transportan.

En cambio, en la **secreción regulada** las moléculas son retenidas en el citoplasma —dentro de sus respectivas vesículas transportadoras— hasta la llegada de una sustancia inductora u otra señal que ordene su liberación. Esta secreción de moléculas "por encargo" supone que la célula las descarga súbitamente, en el momento en que son demandadas. Las vesículas transportadoras que intervienen en las secreciones reguladas se denominan ***vesículas secretoras*** o ***gránulos de secreción***.

7-24. Algunos polipéptidos se secretan por un mecanismo distinto del anterior

Como excepción a la regla, existen polipéptidos pequeños fabricados en ribosomas libres que son secretados por un mecanismo ajeno a la exocitosis. Cruzan la membrana plasmática a través de túneles formados por proteínas transportadoras de la familia **ABC** (cap. 3-26), presentes normalmente en esta membrana. En la sección 7-14 analizamos un pasaje similar a través de la membrana del RE.

7-25. La membrana de los autofagosomas es provista por el REL

Como se verá en la sección 7-35, los organoides envejecidos se eliminan de la célula mediante unos organoides especiales llamados **autofagosomas**, que generan el fenómeno biológico llamado autofagia.

La figura 7-31 muestra que durante su desarrollo los autofagosomas se envuelven con una membrana que les aporta el REL.

7-26. El REL es el principal depósito de Ca^{2+} de la célula

La concentración de Ca^{2+} en el citosol es muy inferior a la existente en la cavidad del retículo endoplasmático y en el líquido extracelular. Las diferencias se deben a la actividad de sendas bombas de Ca^{2+} localizadas en la membrana del REL y en la membrana plasmática (cap. 3-23). Ambas remueven el Ca^{2+} del citosol, que pasa al REL o al líquido extracelular. El traslado del ion en sentido inverso es pasivo, pues se produce a través de canales iónicos. En las células en general los canales de Ca^{2+} se abren mediante un ligando, el IP_3 (cap. 11-18). En cambio, en las células musculares estriadas los canales de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (una forma especializada de REL) son dependientes de voltaje, ya que se abren cuando se modifica el potencial de membrana.

En el capítulo 5-33 señalamos que el aumento del Ca^{2+} en el citosol de la célula muscular lleva a la unión del ion con la troponina C, lo cual desencadena la contracción.

7-27. En algunas células el REL cumple funciones especiales

Además de las actividades mencionadas hasta aquí —comunes a todas las células—, en algunos tipos celulares el REL cumple funciones adicionales, como las siguientes:

Síntesis de esteroides. En células pertenecientes a las gónadas y a las glándulas suprarrenales, el REL contiene varias enzimas que intervienen en la síntesis de esteroides. Este tema es ampliado en el capítulo 8-22.

Síntesis de lipoproteínas. En la sangre los lípidos circulan unidos a proteínas, es decir, son parte de lipoproteínas. Ambas moléculas se ligan en el REL de los hepatocitos, donde se hallan las enzimas que catalizan esa unión.

Desfosforilación de la glucosa 6-fosfato. La membrana del REL de los hepatocitos posee la enzima glucosa 6-fosfatasa, que extrae el fosfato de la glucosa 6-fosfato y la convierte en glucosa. A diferencia de la glucosa 6-fosfato, la glucosa puede abandonar la célula y pasar a la circulación sanguínea para llegar a los tejidos, donde se la utiliza como fuente de energía. Debe señalarse que la glucosa 6-fosfato se forma a partir de la glucosa 1-fosfato o de la glucosa, y que la primera surge de la degradación del glucógeno depositado en el citosol en forma de inclusiones (caps. 4-3 y 11-15).

Destoxificación. En los hepatocitos el REL contiene grupos de enzimas que intervienen en la neutralización de varias sustancias tóxicas para la célula, algunas derivadas de su metabolismo normal y otras incorporadas desde el exterior. Así, la administración de barbitúricos y de otros tóxicos produce un aumento de las enzimas de una familia de citocromos presentes en el REL —los **citocromos P450**—, los cuales, junto con otras enzimas, convierten a las sustancias tóxicas en moléculas hidrosolubles que salen de la célula con facilidad.

ENDOSOMAS

7-28. El endosoma posee una bomba de H^+ en su membrana

Los **endosomas** (del griego *éndon*, dentro, y *sôma*, cuerpo) son organoides localizados funcionalmente entre el complejo de Golgi y la membrana plasmática (fig. 7-1). Sus formas y dimensiones son variadas, aunque por lo general constituyen vesículas o cisternas relativamente pequeñas.

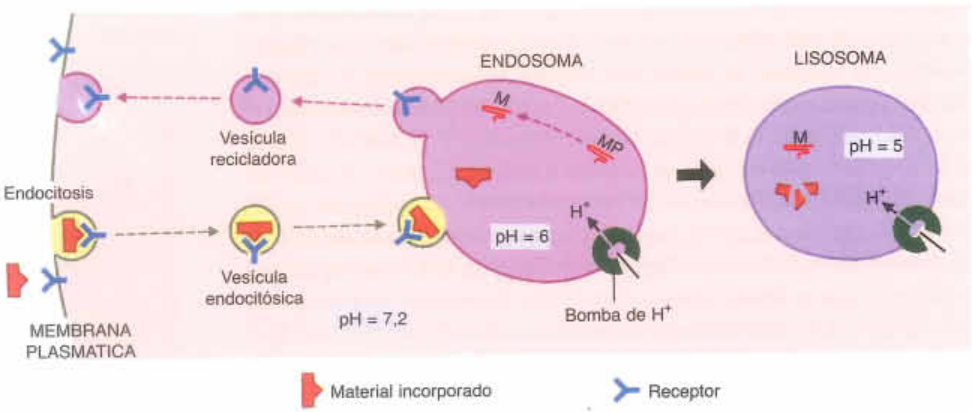


Fig. 7-22. Esquema que ilustra el proceso de endocitosis y la conversión del endosoma en lisosoma.

La membrana del endosoma posee una bomba protónica (cap. 3-24) que cuando se activa transporta H^+ del citosol hacia el interior del organoide, cuyo pH desciende a 6,0 (fig. 7-22). En el capítulo 4-1 se vio que el pH citosólico es de 7,2.

Antes de analizar las funciones de los endosomas conviene describir el proceso de endocitosis.

7-29. Existen dos formas de endocitosis, llamadas pinocitosis y fagocitosis

En el capítulo 3-10 estudiamos la permeabilidad de las membranas celulares y vimos que los solutos atraviesan la membrana plasmática por transporte pasivo o activo e ingresan en la célula. Las macromoléculas y las partículas entran mediante un mecanismo completamente distinto, denominado **endocitosis** (fig. 7-22). De acuerdo con el tamaño y las propiedades físicas del material que se va a incorporar, este mecanismo es llamado pinocitosis o fagocitosis (fig. 7-23).

La **pinocitosis** (del griego *pínein*, beber) comprende el ingreso de líquidos junto con las macromoléculas y los solutos disueltos en ellos. Esto se logra porque porciones circunscritas del líquido que se halla en contacto con la superficie externa de la célula son atrapadas mediante invaginaciones de la membrana plasmática, lo cual da lugar a fositas y finalmente a vesículas que se liberan en el citosol.

El proceso de pinocitosis puede demostrarse experimentalmente mediante el uso de una solución de proteínas marcadas con colorantes fluorescentes; a veces es tan rápido que pareciera que la solución es "bebida" por la célula.

Según la calidad de la sustancia que habrá de incorporarse a la célula, la pinocitosis puede ser inespecífica o regulada (fig. 7-23). En la ***pinocitosis inespecífica*** las sustancias ingresan automáticamente, lo cual ocurre en todos los tipos celulares. En cambio, en la ***pinocitosis regulada*** las sustancias inte-

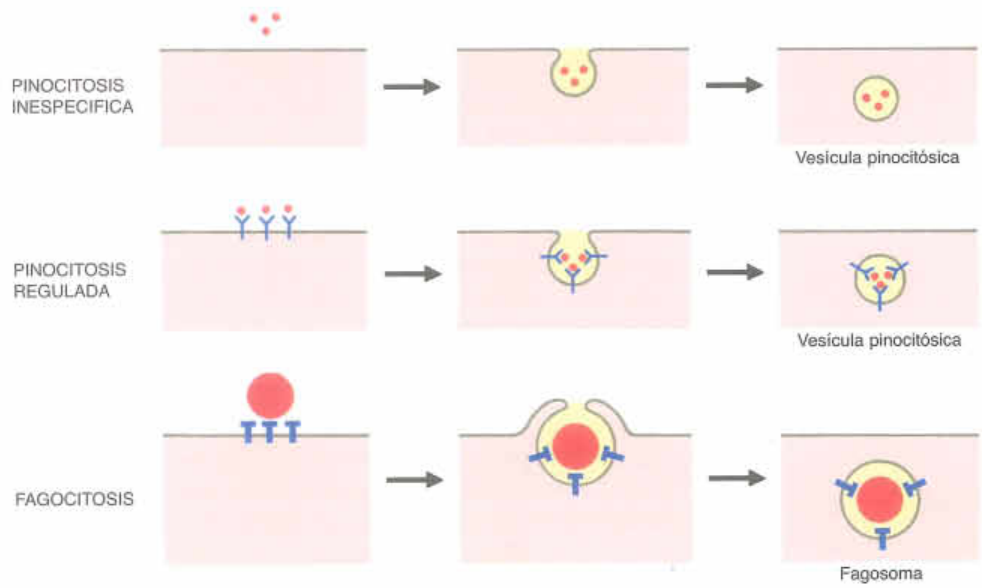


Fig. 7-23. Esquemas que ilustran cómo se incorporan materiales en la célula mediante distintas formas de endocitosis.

ractúan con receptores específicos localizados en la membrana plasmática y ello desencadena la formación de las vesículas pinocitósicas. Debido a la selectividad de este mecanismo, una sustancia puede ingresar en algunas células pero no en otras, de acuerdo con los receptores presentes en sus membranas plasmáticas.

La **fagocitosis** (del griego *phageîn*, comer) tiene lugar en unos pocos tipos celulares, particularmente en los macrófagos y en los leucocitos neutrófilos. Según las circunstancias, constituye un medio de defensa o de limpieza, capaz de eliminar parásitos pequeños, bacterias, células perjudiciales, dañadas o muertas, restos de células y todo tipo de partículas extrañas al organismo. Como vemos, la fagocitosis permite la incorporación de partículas relativamente grandes y estructuradas.

Una vez que el material se fija sobre la superficie externa de la célula, la membrana plasmática emite prolongaciones envolventes que lo rodean hasta dejarlo englobado en el interior del citoplasma, lo cual forma una vesícula mucho más grande que la pinocitósica, llamada **fagosoma** (fig. 7-23).

Para poder ser fagocitado, el material debe contener o adquirir ciertas señales que son reconocidas por receptores localizados en la membrana plasmática de las células fagocitarias. Por ejemplo, algunas bacterias son "marcadas" por anticuerpos llamados ***opsoninas*** (del griego *ópson*, manjar), provistos por el sistema inmunitario.

7-30. Los endosomas son organoides complejos

El endosoma ejerce sus funciones de una manera singular. Tanto recibe el material ingresado por endocitosis —traído por vesículas pinocitósicas o por fagosomas— como incorpora enzimas hidrolíticas traídas por vesículas provenientes del complejo de Golgi (figs. 7-20 y 7-22).

En el primer caso, el endosoma recibe también porciones de membrana plasmática y receptores (los últimos, si la endocitosis es regulada). Ambos son devueltos por vesículas recicladoras, que al arribar a la membrana plasmática se integran a ella mediante un proceso semejante a la exocitosis (fig. 7-22). Una vez en la membrana plasmática, los receptores se pueden volver a utilizar.

Respecto de las enzimas hidrolíticas, debe recordarse que se hallaban unidas a la membrana del complejo de Golgi por medio del receptor de la manosa 6-fosfato. Como muestra la figura 7-20, esa unión se mantiene en las vesículas que transportan las enzimas desde el complejo de Golgi hasta el endosoma, donde también persiste. No obstante, en el endosoma las enzimas se mantienen unidas a la membrana sólo transitoriamente, ya que se desprenden del receptor de la manosa 6-fosfato cuando el pH del organoide baja a 6,0, al activarse su bomba protónica (sección 7-28) (fig. 7-22). Además, la manosa 6-fosfato pierde el fosfato por acción de una fosfatasa.

Aquí también se reciclan las membranas, que junto con los receptores de la manosa 6-fosfato regresan a la región de salida del complejo de Golgi (fig. 7-20). Este reciclaje hace posible la reutilización de los receptores.

En síntesis, el endosoma es el lugar de la célula donde convergen tanto los materiales que van a ser digeridos —ingresados por endocitosis— como las enzimas hidrolíticas encargadas de hacerlo (figs. 7-20 y 7-22).

7-31. Existen dos clases de endosomas, los primarios (o tempranos) y los secundarios (o tardíos)

Es preciso advertir que el análisis morfofuncional realizado hasta aquí sobre los endosomas elude un paso, el cual ha sido premeditadamente omitido para facilitar su descripción. Es que los endosomas atraviesan dos etapas, de ahí que se los clasifique como primarios (o tempranos) y secundarios (o tardíos) (fig. 7-24).

Los **endosomas primarios** se localizan cerca de la membrana plasmática. Además de recibir el material endocitado, devuelven a la membrana plasmática —a través de las vesículas recicladoras analizadas al comienzo de la sección anterior— las porciones de membrana y los receptores traídos por las vesículas pinocitósicas (figs. 7-22 y 7-24A).

Debido a que los receptores se hallan unidos al material endocitado, para poder ser devueltos a la membrana plasmática deben separarse de ese material, lo cual ocurre cuando el pH de los endosomas primarios empieza a descender, es decir, cuando se pone en marcha la bomba protónica de la membrana del organoide (cap. 3-24 y sección 7-28) (fig. 7-22).

Simultáneamente, los endosomas primarios —trasladados por proteínas motoras que se movilizan sobre microtúbulos (fig. 5-11)— se dirigen hasta las cercanías del complejo de Golgi, en donde adquieren el nombre de **endosomas secundarios** cuando se les unen vesículas transportadoras con enzimas hidrolíticas provenientes de dicho complejo. Además, debido a que la bomba

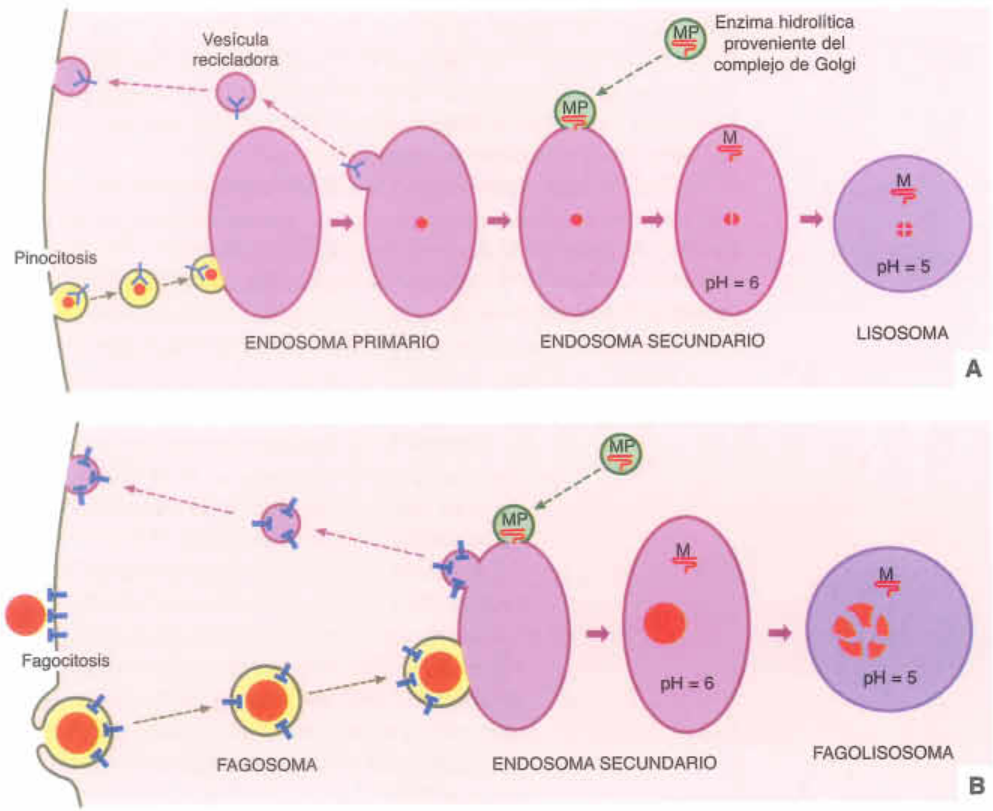


Fig. 7-24. Dinámica morfofuncional de los endosomas primario y secundario durante la pinocitosis (**A**) y la fagocitosis (**B**).

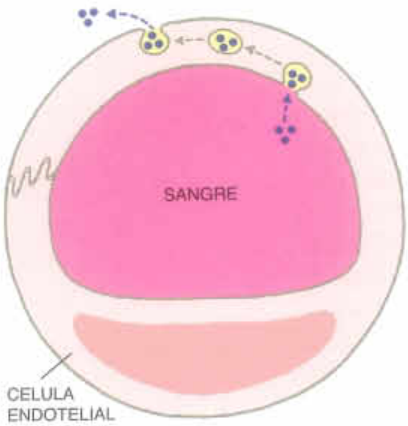


Fig. 7-25. Transcitosis en la célula endotelial del capilar sanguíneo.

protónica heredada de los endosomas primarios continúa funcionando, el pH de los endosomas secundarios desciende a 6,0 (figs. 7-22 y 7-24A), lo cual activa a las enzimas y éstas comienzan a digerir el material endocitado.

La digestión se completa en los **lisosomas**, los cuales se forman a partir de los endosomas secundarios cuando la bomba protónica hace caer el pH a 5,0 (sección 7-33).

Debe señalarse que el dispositivo descripto hasta aquí corresponde a las vesículas pinocitósicas, ya que los fagosomas —en los macrófagos y en los leucocitos neutrófilos— prescinden del endosoma primario y se fusionan directamente con un endosoma secundario (fig. 7-24B). Cuando su pH desciende, el endosoma secundario se convierte en un lisosoma relativamente voluminoso llamado **fagolisosoma**, cuyas enzimas hidrolíticas digieren el material fagocitado (fig. 7-24B).

7-32. En la transcitosis los endosomas cumplen funciones distintas de las descritas

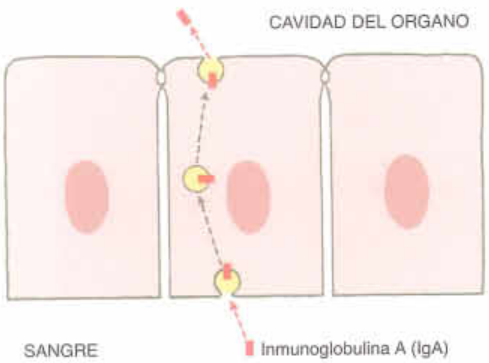
En algunos epitelios se produce un proceso llamado **transcitosis**, mediante el cual materiales ingresados por endocitosis por una cara de la célula atraviesan el citoplasma y salen por exocitosis por la cara opuesta. El cruce a través del citoplasma lo realizan dentro de la vesícula formada durante la endocitosis, aunque en algunos casos emplean un endosoma como estación de relevo (figs. 7-25 a 7-28).

En el capítulo 6-11 se dijo que en los tejidos epiteliales las uniones oclusivas imponen diferencias en la composición de la membrana plasmática en las regiones apical y basolateral de las células. Tales diferencias parecen ser necesarias para el proceso de transcitosis.

El ejemplo más difundido de transcitosis corresponde a las células endoteliales de los capilares sanguíneos, ya que son atravesadas por las macromoléculas que pasan de la sangre a los tejidos (fig. 7-25).

Otros ejemplos de transcitosis se registran en las células secretorias de las glándulas lagrimales y en las mucosas de algunos órganos de los tractos digestivo, respiratorio y urinario (fig. 7-26). A través de ellas, ciertos anticuerpos —las inmunoglobulinas A (IgA)— pasan del tejido conectivo a la luz de los órganos citados, donde ejercen sus funciones defensivas.

Fig. 7-26. Transcitosis de la IgA en una célula epitelial secretoria.



Durante la lactancia se produce un fenómeno semejante en las células secretorias de la glándula mamaria. Aquí las inmunoglobulinas A se transfieren hacia la luz glandular, es decir, a la leche (fig. 7-27).

A diferencia de las restantes proteínas de la leche, cuando estos anticuerpos arriban al intestino del recién nacido no son degradados inmediatamente para su absorción. De este modo el lactante —cuyo sistema inmunológico aún no produce suficientes anticuerpos propios— puede proveerse de ellos para su defensa. Este fenómeno ha sido observado en diversos roedores y rumiantes.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

En la figura 7-28 se muestra el itinerario seguido por los anticuerpos luego de ingresar en la célula intestinal por endocitosis: se incorporan transitoriamente a un endosoma primario y posteriormente abandonan la célula por exocitosis. Como se ve, en estos casos el endosoma primario constituye una estación de relevo para el transporte transcelular, ajena a la degradación de sustancias. Debe señalarse que en la especie humana los anticuerpos que provee la leche materna aparentemente no se absorben en el intestino y por lo tanto no ingresan en el organismo del lactante. Sus funciones defensivas estarían confinadas a la luz intestinal, donde permanecen un tiempo antes de ser degradados por las enzimas hidrolíticas encargadas de digerirlos.

Otro ejemplo de transcitosis se halla en la placenta, cuyas células son atravesadas por anticuerpos de la familia de las inmunoglobulinas G. Al pasar de la sangre materna a la fetal, estos anticuerpos le confieren inmunidad pasiva al feto —y por un tiempo al recién nacido— contra varias enfermedades infecciosas.

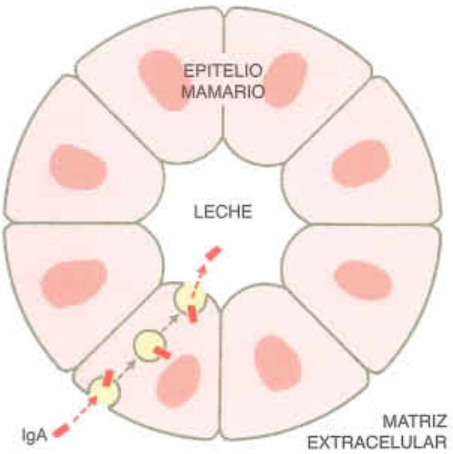


Fig. 7-27. Transcitosis de la IgA en una célula del epitelio mamario.

LISOSOMAS

7-33. Los lisosomas son organoides polimorfos

Todas las células contienen **lisosomas** (del griego *lỳsis*, disolución, y *sôma*, cuerpo), que son los organoides que completan la digestión de los materiales incorporados por endocitosis. Además, digieren elementos de la propia célula, de lo cual nos ocuparemos en las secciones 7-34 y 7-35.

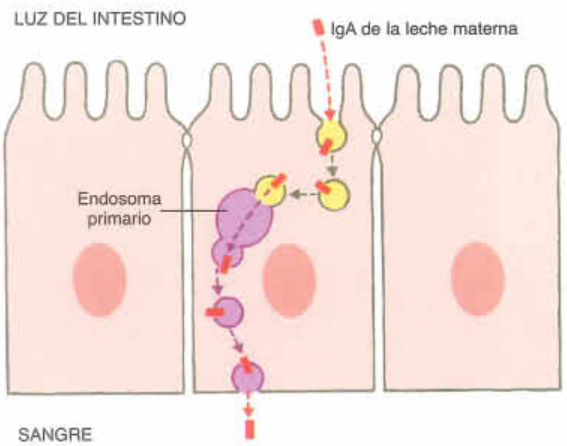
Como se señaló, los lisosomas se forman a partir de los endosomas secundarios y éstos de los endosomas primarios, los cuales recibieron dos clases de vesículas transportadoras, una con material endocitado y otra con enzimas hidrolíticas (figs. 7-20 y 7-22).

La característica más saliente de los lisosomas es su polimorfismo, no sólo porque poseen aspectos y tamaños disímiles, sino también por la irregularidad de sus componentes (figs. 1-11 y 7-29). La causa del polimorfismo es doble; por un lado se debe a la diversidad del material endocitado y por otro al hecho de que cada clase de lisosoma posee una combinación singular de enzimas hidrolíticas, de las que existen alrededor de 50 diferentes.

Las enzimas lisosómicas se activan a pH 5,0. Este grado de acidificación se alcanza gracias a la bomba de H^+ presente en la membrana del lisosoma, heredada de la membrana del endosoma secundario (cap. 3-2 y sección 7-28) (fig. 7-22).

La membrana del lisosoma se halla protegida del efecto destructor de las enzimas hidrolíticas porque su cara luminal contiene una enorme cantidad de glicoproteínas (cap. 3-8). Por otro lado, si la membrana del lisosoma se rompiera,

Fig. 7-28. Transcitosis de la IgA en una célula del epitelio intestinal.



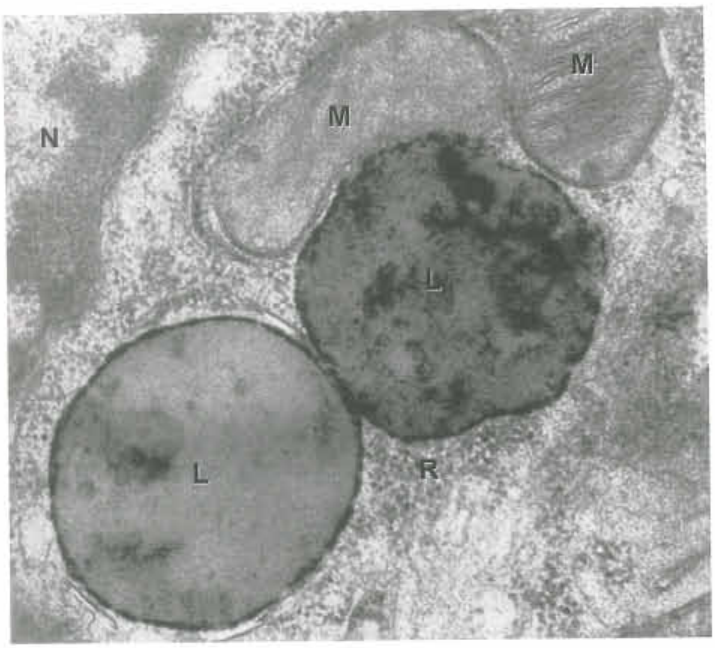


Fig. 7-29. Micrografía electrónica que muestra dos lisosomas (*L*), mitocondrias (*M*), ribosomas (*R*) y parte del núcleo (*N*). 60.000×. (Cortesía de F. Miller.)

las enzimas escapadas no afectarían a los demás componentes celulares debido a que se inactivarían al tomar contacto con el citosol, cuyo pH es de 7,2.

En el interior de los lisosomas las proteínas y los hidratos de carbono endocitados son digeridos a dipéptidos y monosacáridos, respectivamente. Estos y otros productos de degradación atraviesan la membrana lisosómica y pasan al citosol, donde terminan de digerirse o se aprovechan para construir nuevas moléculas. Por su parte, culminadas sus funciones, las enzimas lisosómicas también pasan al citosol, donde son degradadas por proteasomas (cap. 4-6).

Finalmente, libres los lisosomas de las enzimas y del material digerido, no se descarta que se reutilicen sus membranas para construir nuevos endosomas.

Algunas sustancias endocitadas no terminan de digerirse y permanecen en los lisosomas, que por ello adquieren el nombre de **cuerpos residuales**. En ocasiones, las sustancias no digeridas son expulsadas de la célula mediante

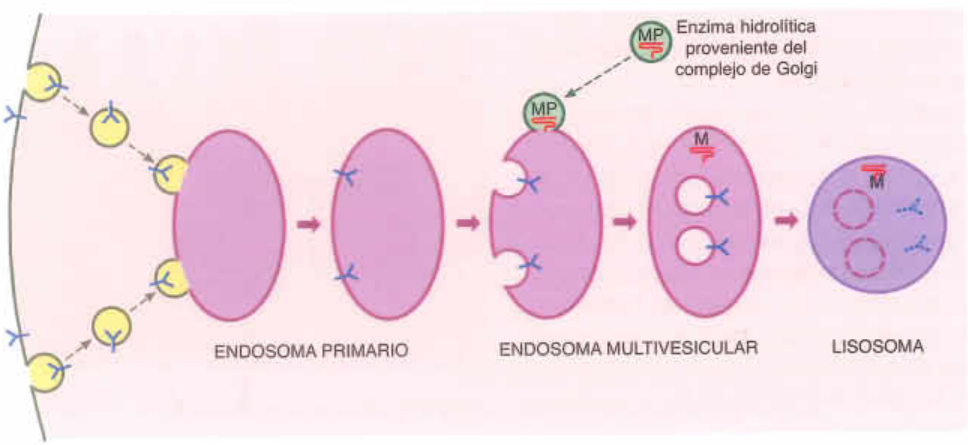


Fig. 7-30. Participación del endosoma multivesicular en la eliminación de proteínas en desuso situadas en la membrana plasmática.

un proceso comparable a la exocitosis. Si esto no ocurre, con el tiempo se convierten en **pigmentos de desgaste** depositados en el citosol (cap. 4-3).

7-34. La célula se vale del sistema de endomembranas para deshacerse de proteínas de la membrana plasmática

Cuando ciertas proteínas de la membrana plasmática dejan de ser necesarias para el funcionamiento celular —por ejemplo, los receptores en desuso—, el sistema de endomembranas se encarga de eliminarlas.

El proceso comienza con la formación de vesículas endocitósicas en los sitios donde se encuentran esas proteínas. De inmediato, las vesículas se fusionan con un endosoma primario y se invaginan en el interior de los mismos, en donde se forman nuevas vesículas fig. 7-30). Ello convierte al endosoma primario en un endosoma secundario especial llamado **cuerpo multivesicular** o **endosoma multivesicular**, situado en las cercanías del complejo de Golgi.

El proceso concluye cuando el endosoma multivesicular se convierte en lisosoma, es decir, cuando se reduce su pH y se activan las enzimas hidrolíticas provenientes del complejo de Golgi, las cuales digieren tanto a la membrana como a las proteínas de las vesículas (fig. 7-30).

Cabe señalar que a lo largo de este proceso las caras de la membrana de las vesículas invierten sus posiciones. Por ejemplo, la cara que da al citosol en las vesículas endositósicas es la misma que da al interior de las vesículas del endosoma multivesicular (fig. 7-30).

7-35. La autofagia es esencial para el funcionamiento de la célula

La célula elimina organoides envejecidos por un mecanismo denominado **autofagia**, que incluye la formación de **autofagosomas**. En la sección 7-25 se mencionó que los autofagosomas se forman con la ayuda del REL, que aporta una porción de membrana para envolver al organoide obsoleto y formar el autofagosoma (fig. 7-31).

A continuación, el autofagosoma sigue el mismo camino que el fagosoma (sección 7-31) (fig. 7-24B), es decir, se fusiona con un endosoma secundario, el cual se convierte en **fagolisosoma** cuando se activan sus enzimas

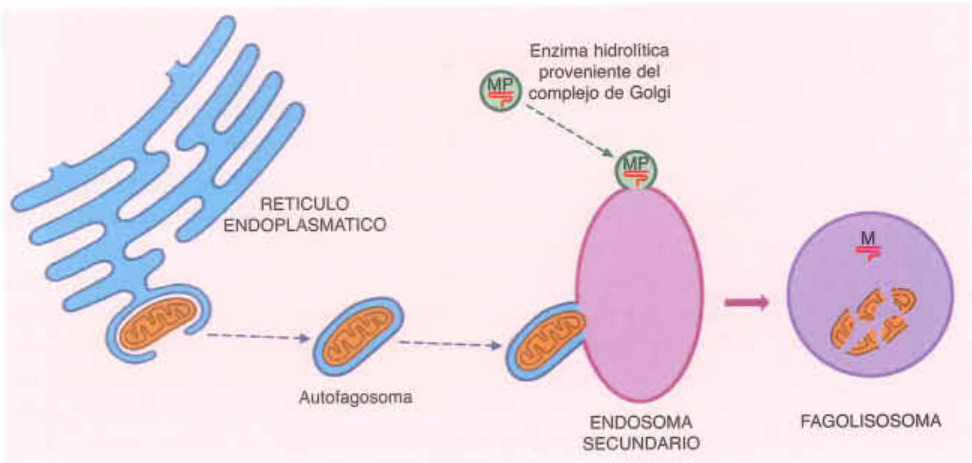


Fig. 7-31. Componentes celulares que participan en la formación del autofagosoma y del fagolisosoma.

hidrolíticas. El proceso culmina con la degradación del organoide por parte de esas enzimas (fig. 7-31).

Cabe añadir que por medio de este mecanismo la célula también elimina del citosol a los agregados proteicos en desuso que no pueden ser digeridos por los proteasomas a causa de su gran tamaño (cap. 4-6).

En las neuronas, en los hepatocitos y en las células musculares cardíacas, los autofagosomas a veces no terminan de digerir algunos componentes de los organoides y éstos se convierten en cuerpos residuales. Con el avance de la edad dichos cuerpos se acumulan en el citosol como pigmentos de desgaste (cap. 4-3).

La autofagia se incrementa en ciertas condiciones. Por ejemplo, ante un ayuno prolongado aparecen numerosos autofagosomas en los hepatocitos. Tienen por objeto convertir a componentes de la célula en alimento para prolongar la supervivencia del organismo.

7-36. Existen enfermedades producidas por alteraciones lisosómicas

Diversas enfermedades congénitas se producen por mutaciones de los genes que codifican a las enzimas lisosómicas. Se caracterizan por la acumulación intracelular de las sustancias que esas enzimas degradan.

Por ejemplo, en la ***enfermedad de Tay-Sachs*** algunas neuronas aparecen repletas de un ganglíosido. El defecto se debe a la ausencia de la enzima hexosaminidasa A, que cataliza la hidrólisis parcial del glicolípido. Por consecuencia, éste se acumula en las neuronas, lo que lleva a graves alteraciones neurológicas.

La ***enfermedad de Gaucher*** se caracteriza por la acumulación de glucocerebrósido en varios tipos celulares debido a la ausencia de la glicosidasa que cataliza la hidrólisis del glicolípido en ceramida y glucosa.

La ***enfermedad de Niemann-Pick*** muestra una acumulación de esfingomielina en varios tipos celulares a consecuencia de la falta de esfingomielinasa, que es la enzima que hidroliza al esfingofosfolípido en ceramida y fosforilcolina.

En la sección 7-20 estudiamos el mecanismo que lleva a la acumulación de moléculas en la ***enfermedad de células I***, producida por un defecto en el receptor de la manosa 6-fosfato, no en una enzima lisosómica.

VESICULAS TRANSPORTADORAS

7-37. Durante su formación, las vesículas transportadoras se envuelven con una cubierta proteica

Con excepción de los fagosomas, que suelen ser mucho más grandes, las **vesículas transportadoras** tienen un diámetro que fluctúa entre los 50 y los 250 nm. La medida mayor corresponde a las vesículas secretorias.

La figura 7-32 muestra que las vesículas transportadoras se originan en la membrana plasmática y en las membranas de los organoides del sistema de endomembranas. Lo hacen con el concurso de una cubierta proteica de la que existen varias clases, aunque de algunas no fueron descubiertas todavía sus proteínas. Las más estudiadas se conocen con los nombres de cubierta de COP y cubierta de clatrina.

La **cubierta de COP** (por *coat protein*) se forma mediante la asociación ordenada de múltiples unidades proteicas. Existen dos clases de cubiertas de COP, las cuales se diferencian no sólo porque se componen de unidades proteicas distintas —denominadas COPI y COPII—, sino también porque generan vesículas en lugares diferentes del sistema de endomembranas. Así, la cubierta de ***COPII*** genera las vesículas que se forman en el RE y se dirigen a la cara de entrada del complejo de Golgi, mientras que la cubierta de ***COPI*** genera tanto las vesículas que se forman en la cara de entrada del complejo de Golgi y retornan al RE como las que interconectan a las cisternas del complejo de Golgi.

Por su parte, la **cubierta de clatrina** (del latín *clathrun* o del griego *kleter*, enrejado de varillas) resulta de la asociación de múltiples unidades proteicas llamadas ***trisqueliones*** (del griego *skelos*, pierna). Genera las vesículas que surgen de la membrana plasmática durante la endocitosis y las que se forman en la cara de salida del complejo de Golgi y se dirigen a los endosomas y a la membrana plasmática durante la secreción regulada.

La primera cubierta de COP en ser revelada fue la de las vesículas que interconectan a las cisternas del complejo de Golgi, compuesta por unidades COPI. Se llamó **cubierta de coatómero** (por *coat protomer*) y, puesto que se creyó que todas las cubiertas que faltaba descubrir eran iguales a ella, se les dio ese nombre a todas las que no eran de clatrina, la cual había sido identificada mucho tiempo antes. A partir del descubrimiento de las unidades COPII, retiene el nombre de cubierta de coatómero sólo la que se compone de unidades COPI.

Las vesículas transportadoras comienzan a formarse cuando las unidades proteicas de la futura cubierta se apoyan sobre el lado citosólico de un área circunscrita de una membrana celular plana, a la que le proveen la fuerza mecánica para que se curve hacia el citosol. Como muestra la figura 7-33, el progreso de la curvatura desarrolla una fosita, que finalmente se desprende de la membrana convertida en vesícula.

En el caso de las vesículas cubiertas de clatrina, el desprendimiento se produce cuando varias unidades de la proteína motora **dinamina** rodean el

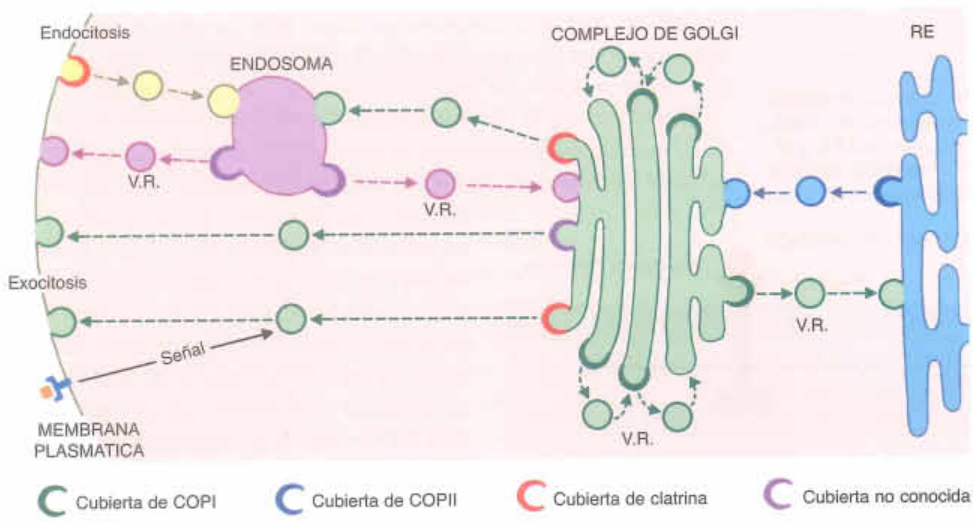


Fig. 7-32. Esquema que ilustra la participación de las cubiertas de COP y de clatrina en la formación de las vesículas surgidas de la membrana plasmática (por endocitosis) y de los organoides del sistema de endomembranas.

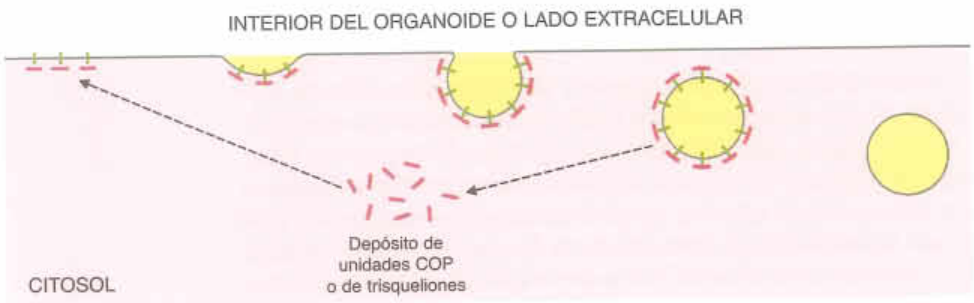


Fig. 7-33. Evolución seguida por la membrana durante la formación de una vesícula. Se ilustra también la dinámica de las unidades COP y de los trisqueliones.

cuello de las fositas y lo estrangulan hasta seccionarlo (cap. 5-8). Estas vesículas tienen forma esférica, a diferencia de las vesículas cubiertas de COP, que en algunos lugares suelen ser poliedros irregulares y en otros poseen una apariencia tubular.

7-38. Las cubiertas de COP se construyen con el concurso de las unidades proteicas COPI o COPII

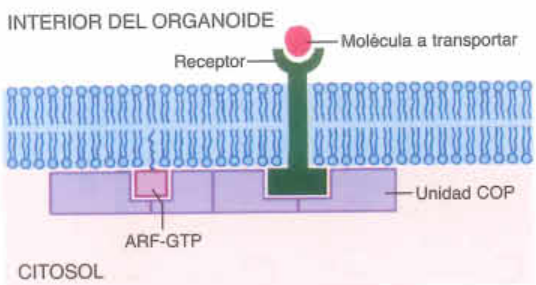
En la sección anterior se dijo que existen dos tipos de **cubiertas de COP** y que se construyen mediante las cubiertas compuestas por las unidades proteicas COPI y COPII. Debe agregarse que cada unidad ***COPI*** se compone de siete subunidades proteicas, identificadas con las letras griegas α, β, β', γ, δ, ε y ζ. En cambio, cada unidad ***COPII*** consta de dos subunidades proteicas heterodiméricas, las cuales se identifican con las siglas Sec13/Sec31 y Sec23/Sec24 (por *seven transmembrane protein complex*). En la figura 7-33 se observa que las unidades COPI y COPII se construyen en el citosol, se adosan a la membrana y la curvan. Cuando se conectan con la membrana, lo hacen a través de una proteína llamada **ARF** (por *adenosine diphosphate ribosylation factor*) y del dominio citosólico del receptor de la molécula que va a ser transportada por la vesícula en formación (fig. 7-34).

Debe agregarse que la COPI y la COPII se ligan a proteínas ARF específicas denominadas **ARF1** y **Sar1** (por *simil ARF*), respectivamente.

Las ARF y las COP desempeñan funciones complementarias, ya que una vez que las ARF determinan en qué lugar debe formarse la vesícula transportadora, reclutan a las unidades COPI o COPII y éstas se asocian y componen la cubierta proteica que provoca la curvatura de la membrana.

El proceso por el cual las unidades COPI o COPII se unen a la membrana de la vesícula en formación es el siguiente: 1) en su estancia libre en el citosol las ARF contienen un GDP y un ácido graso oculto en sus moléculas; 2) una proteína reguladora llamada **GEF** (por *guanine-nucleotide exchange factor*) hace que el GDP de las ARF se intercambie por un GTP; 3) este cambio torna visible al ácido graso de las ARF y lo inserta en la membrana, por lo que las ARF quedan unidas a ella; 4) las ARF reclutan a las COP que se hallan en el citosol y las colocan junto a la membrana; 5) las COP se unen a la membrana por medio de las ARF y del dominio citosólico del receptor citado en el párrafo anterior. Debido a que ese dominio es

Fig. 7-34. Unión de la unidad COP a la membrana. Véase cómo participan la ARF y el receptor del material que va a ser transportado.



siempre el mismo en todos los receptores, las COP se unen a él inespecíficamente, a diferencia del dominio no citosólico, que varía y se une de manera específica a la molécula que va a ser transportada.

Si bien se sabe que en la formación de una vesícula transportadora intervienen múltiples unidades COP, se ignora cómo se ensamblan entre sí para curvar a la membrana.

Después que la vesícula se desprende de la membrana, las ARF y las COP se desligan de ésta y quedan libres en el citosol, donde pueden ser reutilizadas (fig. 7-32). La salida de las ARF se debe a que hidrolizan el GTP contenido en sus moléculas, lo cual hace replegar el ácido graso que las une a la membrana. Las ARF hidrolizan el GTP —a GDP y P— al ser estimuladas por una proteína reguladora llamada **GAP** (por *GTPase activating protein*).

Surge de lo mencionado que las ARF poseen, alternadamente, un GTP o un GDP. Cuando poseen un GTP se activan y ello las une a una membrana. En cambio, cuando poseen un GDP se inactivan, se separan de la membrana y quedan libres en el citosol. Dado que el GDP deriva de la hidrólisis del GTP que se halla en las propias ARF y a que éstas catalizan la reacción, se las clasifica como GTPasas.

Debe advertirse que en la célula existen —además de las ARF— otras **GTPasas** que funcionan asociadas a las proteínas reguladoras GEF y GAP. Recuérdese que la **GEF** intercambia el GDP por un GTP y que la **GAP** estimula la hidrólisis del GTP a GDP y P. Las acciones reguladoras de las proteínas GEF y GAP se ilustran en la figura 11-9.

Las otras GTPasas de esta familia son las proteínas **Rho** (cap. 5-24), **Rac** (cap. 5-26), **Cdc42** (cap. 5-26), **Rab** (sección 7-40), **Ras** (cap. 11-12) y **Ran** (cap. 12-4). Al igual que las ARF, se activan cuando poseen un GTP y se inactivan cuando lo hidrolizan a GDP y P.

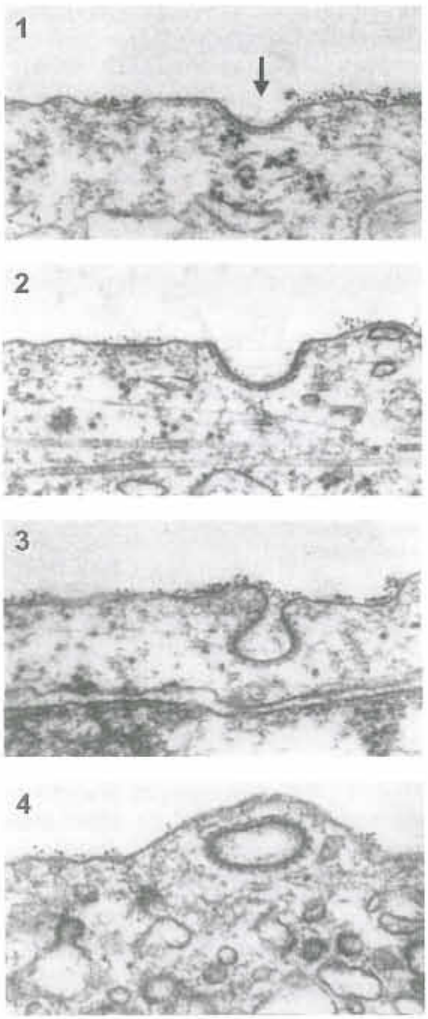


Fig. 7-35. Secuencia de micrografías electrónicas que muestra el proceso de formación de una vesícula de endocitosis en la membrana plasmática (ésta se marcó con ferritina). 130.000×. (Cortesía de M. S. Bretcher.)

7-39. Las cubiertas de clatrina se construyen a partir de trisqueliones

La serie de micrografías electrónicas agrupadas en la figura 7-35 muestran cómo la **cubierta de clatrina** forma una vesícula transportadora. En la sección 7-37 se dijo que la cubierta de clatrina se compone de múltiples unidades proteicas denominadas ***trisqueliones***. Se calcula que una vesícula de 200 nm de diámetro contiene alrededor de 1.000 de esas unidades.

El trisquelión está integrado por tres cadenas polipeptídicas grandes y tres pequeñas, cuyo peso es de 180 kDa y de 35 kDa, respectivamente. Como muestra la figura 7-36, esas cadenas dan lugar a tres brazos flexibles de 44,5 nm de largo, doblados hacia un mismo lado.

Para generar una vesícula, los trisqueliones se colocan sobre un área circunscrita de la cara citosólica de la membrana y se ensamblan entre sí hasta formar un poliedro con aspecto de canasta. La pared del poliedro está compuesta por hexágonos y pentágonos, cuyos vértices corresponden a los pun-

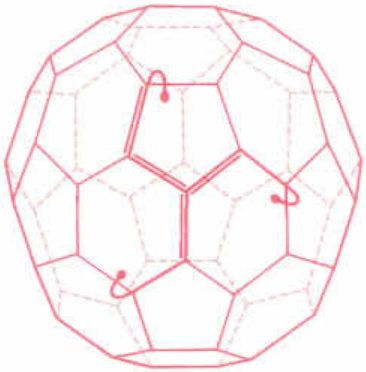


Fig. 7-36. Esquema tridimensional de una vesícula cubierta con clatrina. Se resalta un trisquelión, compuesto por seis polipéptidos (tres grandes y tres pequeños).

tos de convergencia de los brazos de los trisqueliones. En cambio, sus aristas se forman al adosarse dos o más brazos de otros tantos trisqueliones vecinos (figs. 7-36 y 7-37).

La unión de los trisqueliones a la membrana le confiere la fuerza mecánica que provoca su curvatura. Inicialmente forman una fosita, la cual al desprenderse de la membrana se convierte en una vesícula que se libera en el citosol. Al igual que las cubiertas de COP, la cubierta de clatrina se desarma inmediatamente y los trisqueliones libres pueden volver a usarse para generar nuevas vesículas (fig. 7-33).

La forma como se asocian los trisqueliones entre sí permite que las membranas resulten con curvaturas de distintos radios y que se formen vesículas de diferentes tamaños. No obstante, cuando las vesículas son muy grandes —como en los fagosomas—, no se forman cubiertas completas sino áreas aisladas que cubren parcialmente sus superficies.

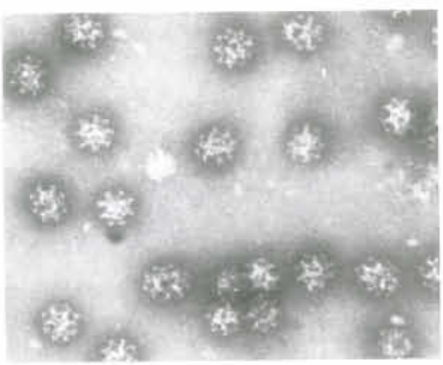
La unión de los trisqueliones a la membrana vesicular se produce a través de una proteína **ARF** semejante a las que se unen a las unidades COPI y COPII (sección 7-38).

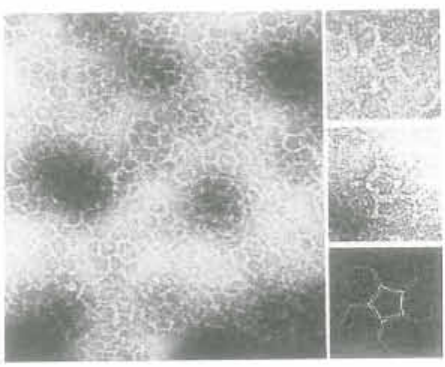
Por añadidura, en la membrana plasmática los trisqueliones se unen también al dominio citosólico de los receptores de las sustancias que ingresan a la célula por endocitosis regulada (fig. 7-38) (véase el ejemplo que se analiza en la sección 7-42). Algo similar ocurre en la membrana de la cara de salida del complejo de Golgi —en las zonas formadoras de las vesículas que se dirigen a los endosomas y a la membrana plasmática durante la secreción regulada—, donde además de unirse a la ARF, los trisqueliones se ligan al dominio citosólico de los receptores de las moléculas que van a ser transportadas (fig. 7-38) (uno de esos receptores es el de la manosa 6-fosfato, visto en la sección 7-20).

Debido a que los dominios citosólicos de los receptores mencionados varían, para unirse a ellos los trisqueliones se valen de unas proteínas intermediarias heterodiméricas llamadas **adaptinas** (fig. 7-38), las cuales poseen un dominio específico que interactúa con cada tipo de receptor y un dominio común que se liga a los trisqueliones.

Apenas la cubierta de clatrina se desconecta de la membrana vesicular, las ARF y las adaptinas —al igual que los trisqueliones— quedan libres en el citosol para que puedan volverse a usar (fig. 7-33).

Fig. 7-37. Izquierda. Micrografía electrónica de numerosas cubiertas de clatrina aisladas y coloreadas negativamente. 67.500×. (Cortesía de B. M. F. Pearse.) **Derecha.** Micrografías electrónicas de fragmentos aislados de clatrina coloreados negativamente. Se observa un campo general y tres de sus partes a mucho mayor aumento. 105.000× y 195.000×, respectivamente. (Cortesía de R. A. Crowther y B. M. F. Pearse.)





UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

7-40. Las proteínas membranosas llamadas SNARE aseguran la llegada de las vesículas transportadoras a sus puntos de destino

Cada compartimiento del sistema de endomembranas posee en su membrana y en su interior moléculas distintas a las de los otros compartimientos. Como se mencionó en las secciones 7-1, 7-2, 7-22 y 7-29, esos compartimientos —junto con la membrana plasmática y la matriz extracelular— intercambian algunas de sus moléculas mediante vesículas transportadoras, las cuales se trasladan por el citosol movidas por el citoesqueleto (caps. 5-8 y 5-23).

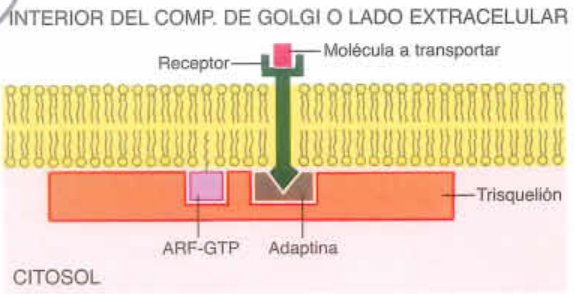


Fig. 7-38. Unión del trisquelión a la membrana. Véase cómo participan la ARF, la adaptina y el receptor del material que va a ser transportado.

Cuando una vesícula transportadora emerge de uno de los compartimientos donantes y se dirige hacia el compartimiento receptor con el que habrá de fusionarse, debe avanzar por el camino adecuado y no extraviarse en medio de las múltiples membranas que atraviesan el citoplasma.

Esto lo logra porque existe un mecanismo diseñado para asegurar la llegada de la vesícula transportadora al compartimiento correcto. Depende de dos tipos de proteínas receptoras mutuamente complementarias, una perteneciente a la membrana del compartimiento donante y otra a la membrana del compartimiento receptor. Se denominan, respectivamente, **v-SNARE** y **t-SNARE** (por *vesicle-* y *target-SNAP receptor*) (fig. 7-39).

Como muestra la figura 7-40, las t-SNARE no abandonan nunca la membrana de los compartimientos receptores. En cambio, las v-SNARE abandonan la membrana de los compartimientos donantes cuando se transfieren a la membrana de las vesículas transportadoras. La figura 7-40 muestra también que las v-SNARE quedan expuestas y en condiciones de actuar una vez que las vesículas se desprenden de las cubiertas proteicas de COP o de clatrina.

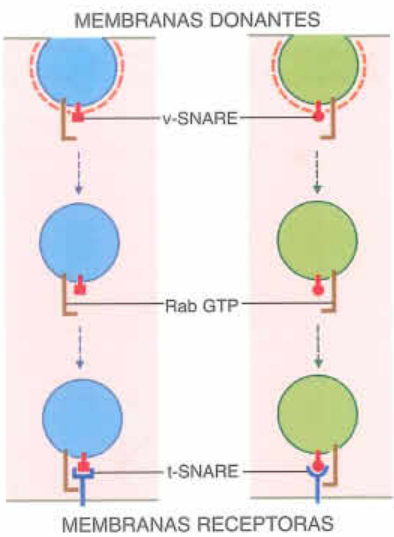
Debido a que este mecanismo requiere especificidad, por cada pareja de compartimientos donante y receptor existe una pareja particular de proteínas v-SNARE y t-SNARE complementarias. Ello hace que durante el traslado de una vesícula transportadora su v-SNARE deba "tantear" múltiples t-SNARE antes de encontrar a su complementaria.

El retorno de una vesícula recicladora al compartimiento donante apropiado y no a otro se debe a que su membrana recupera la v-SNARE original y a que la membrana del compartimiento de origen posee una t-SNARE idéntica a la de la membrana del compartimiento receptor (fig. 7-40). Por consecuencia, durante el reciclaje de las vesículas transportadoras los compartimientos invierten sus comportamientos, pues el donante se conduce como receptor y éste como donante.

La unión entre una v-SNARE y su t-SNARE complementaria depende de una proteína llamada **Rab** (por *Ras protein from brain*), que actúa sobre ambas (fig. 7-39). Se han identificado cerca de 30 Rab diferentes, una para cada pareja de v-SNARE/t-SNARE.

Las proteínas Rab pertenecen a una subfamilia de GTPasas que depende de las proteínas GEF y GAP (sección 7-38). Así, cuando son influidas por la **GEF** reemplazan el GDP de sus moléculas por

Fig. 7-39. Funciones de la Rab, las v-SNARE y las t-SNARE en el reconocimiento de las vesículas por las membranas receptoras correctas.



un GTP (fig. 11-9) y se activan, es decir, se unen a la membrana del compartimiento donante y hacen que la v-SNARE y la t-SNARE se conecten entre sí. En cambio, cuando son influidas por la **GAP** hidrolizan el GTP (a GDP y P) y se inactivan, lo cual las separa de la membrana del compartimiento donante.

7-41. En el proceso de fusión de membranas intervienen cuatro proteínas fusógenas

Al ligarse la v-SNARE con la t-SNARE, las membranas interactuantes se colocan a una distancia que hace posible el proceso de fusión descrito en el capítulo 3-6 e ilustrado en la figura 3-13.

En ese proceso interviene un conjunto de **proteínas fusógenas** que se localizan en el citosol. Se conocen cuatro, tres de las cuales se identifican con la sigla **SNAP** (por *soluble NSF accessory proteins*) y la cuarta con la sigla **NSF** (por *NEM sensitive factor*; NEM, o *N-etilmaleimida*, es el nombre del compuesto usado para revelar al NSF). Así, las tres SNAP y el NSF —que es una ATPasa— son requeridos por el par de membranas para que se concrete la fusión (fig. 7-41).

Cualquiera que sea el par de membranas —y por lo tanto, la pareja de v-SNARE/t-SNARE—, siempre se les unen las mismas cuatro proteínas fusógenas, pues son inespecíficas. Como se ve, la especificidad de la unión depende únicamente de las SNARE.

El proceso de fusión de membranas consume energía, que es provista por un ATP hidrolizado por la ATPasa del NSF. La energía es requerida para desarmar el complejo fusógeno luego de la fusión y separar a las SNAP y al NSF de las membranas.

Las SNAP y el NSF regresan al citosol y pueden ser reutilizados. Por su parte, la v-SNARE se integra a una vesícula recicladora y retorna al compartimiento donante —ahora receptor—, al que identifica porque la membrana de éste posee una t-SNARE complementaria (fig. 7-40).

7-42. El ingreso del colesterol en la célula y su destino ulterior se conocen detalladamente

En virtud de que son moléculas muy hidrofóbicas, el colesterol y sus ésteres circulan por la sangre como lipoproteínas. El ejemplo más conocido corresponde al **colesterol-LDL** (por *low-density lipoprotein*), que es un com-

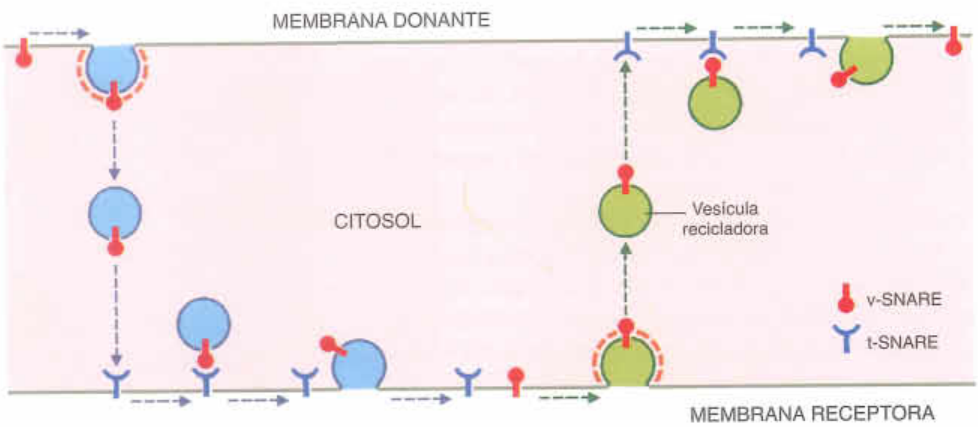


Fig. 7-40. Esquema que ilustra de qué forma la vesícula transportadora es conducida hacia la membrana receptora y cómo la vesícula recicladora es devuelta a la membrana donante.

puesto lipoproteico originado en el REL de los hepatocitos (sección 7-27). El colesterol-LDL ingresa en las células por endocitosis, previa unión con receptores específicos situados en la membrana plasmática. Esta unión atrae a trisqueliones libres en el citosol, los cuales —por intermedio de adaptinas específicas— se conectan con los receptores en el lado citosólico de la membrana y generan una cubierta de clatrina (fig. 7-42).

Como se sabe, la cubierta se desprende de la membrana de la vesícula apenas ésta se forma. En la luz vesicular el colesterol-LDL continúa unido a los receptores heredados de la membrana plasmática. La vesícula se conecta con un endosoma primario, cuyo pH ácido hace que el colesterol-LDL se desprenda de los receptores, los cuales retornan a la membrana plasmática con una vesícula recicladora. El colesterol-LDL del endosoma primario continúa en el interior del endosoma secundario, el cual se convierte en lisosoma cuando el descenso del pH activa a las enzimas hidrolíticas aportadas por el complejo de Golgi (fig. 7-42). Las enzimas actúan sobre el colesterol-LDL y separan a la LDL del colesterol, que pasa al citosol y se utiliza como materia prima para la síntesis de otras moléculas o se incorpora a la membrana del RE (sección 7-10).

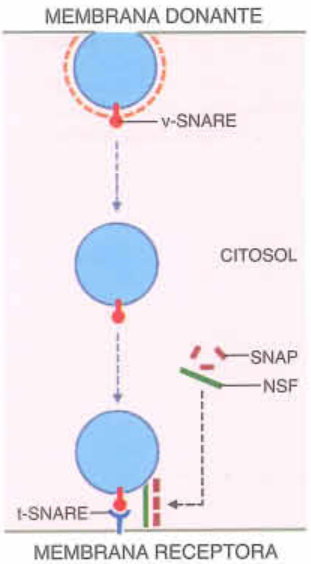


Fig. 7-41. Intervención de las tres SNAP y del NSF en la fusión de la membrana receptora con la membrana de la vesícula.

La ***hipercolesterolemia familiar*** es una enfermedad causada por una mutación del gen que codifica al receptor del colesterol-LDL, que resulta defectuoso o está ausente. Como consecuencia, el colesterol no ingresa en las células y su concentración se eleva en la sangre, lo que lleva a la aparición de cuadros tempranos de ***arteriosclerosis***.

7-43. En las membranas plasmáticas de algunas células existen invaginaciones llamadas caveolas

En la membrana plasmática de muchos tipos de células se desarrollan invaginaciones muy pequeñas llamadas **caveolas** (del latín *caveolae*, cuevas pequeñas) (fig. 7-43), cuya presencia es particularmente abundante en las células endoteliales, musculares lisas y adipocitos.

Las caveolas se forman a partir de áreas circunscritas de membrana plasmática llamadas **balsas lipídicas**, que son ricas en colesterol y esfingofosfolípidos. La fuerza mecánica que invagina a estas áreas para que se formen las caveolas no es generada por una cubierta proteica (como ocurre con las vesí-

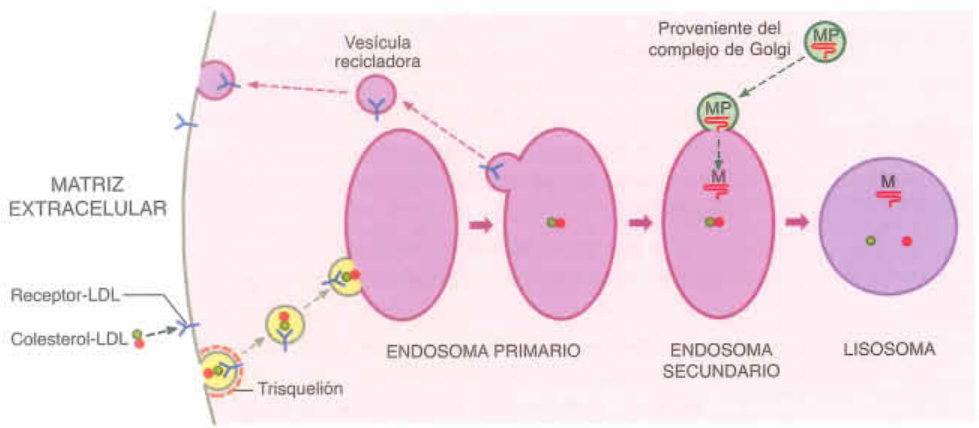


Fig. 7-42. Esquema que ilustra el mecanismo de ingreso del colesterol-LDL en la célula, su paso por los endosomas primario y secundario y su procesamiento en el lisosoma.

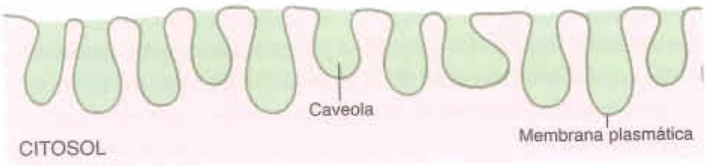


Fig. 7-43. Disposición de las caveolas en la membrana plasmática.

culas de endocitosis) sino por proteínas que se distribuyen entre los fosfolípidos de la propia membrana. Así, en cada área de invaginación, en la monocapa citosólica de la membrana se ubican múltiples unidades de una proteína integral de 21 kDa llamada **caveolina**, que es la que produce la invaginación. La caveolina tiene forma de horquilla y sus dos extremos se orientan hacia el citosol (fig. 7-44).

Debido a que en sus luces se concentran sustancias inductoras y en sus membranas se instalan los receptores de esas sustancias, las caveolas hacen posible que haya inducciones celulares con mínimas demoras. Las sustancias inductoras más comunes detectadas en el interior de las caveolas son la insulina, el EGF y el PDGF (cap. 11-12), mientras que en sus membranas se hallaron varios tipos de receptores membranosos, algunos asociados a proteínas G (cap. 11-14).

Las caveolas sirven también para internar permeasas y canales iónicos hacia el citoplasma y "acorralar" solutos en las cercanías de esos transportadores. Ello hace posible que los solutos —ante estímulos adecuados— ingresen masivamente en la célula. Por ejemplo, en las luces de algunas caveolas se detectó Ca^{2+} y en sus membranas se encontraron canales y permeasas para el ion, lo que ha llevado a compararlas con los túbulos T del músculo estriado (fig. 5-39).

El mecanismo que interna solutos y sus transportadores mediante caveolas y permite que los primeros ingresen masivamente en la célula se denomina **potocitosis** (del griego *potos*, bebida).

EL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS EN LA CELULA VEGETAL

7-44. En la célula vegetal el sistema de endomembranas posee vacuolas

Consideraremos aquí algunas características especiales del sistema de endomembranas de las células vegetales.

En las células indiferenciadas del meristema, las membranas del RE son relativamente escasas y están enmascaradas por los numerosos ribosomas libres que llenan el citosol. En cambio, en las células vegetales diferenciadas el RE es abundante y forma túbulos que ingresan en los plasmodesmos (cap. 6-15). En las células cribosas, sobre estos túbulos se forman depósitos de calosa, que es un polisacárido compuesto por moléculas de glucosa unidas por enlaces 1-3β.

Igual que en las células animales, en las vegetales el complejo de Golgi es esencial para la secreción. En sus cisternas se procesan y concentran los productos secretorios, que finalmente se descargan al exterior. Por ejemplo, en las células que sintetizan mucílago se observan abundantes vesículas secretorias surgiendo del complejo de Golgi.

Además, componentes del complejo de Golgi sirven para el transporte de ciertas proteínas de depósito, como la vinicilina y la legumina en los cotile-

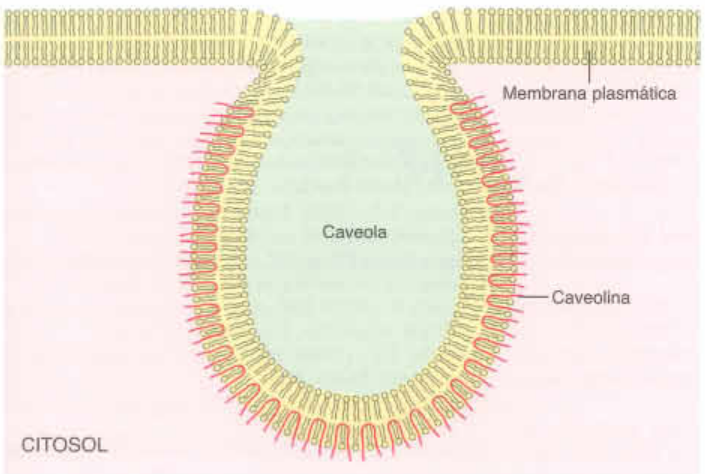


Fig. 7-44. Representación esquemática de una caveola, con las caveolinas distribuidas entre los fosfolípidos de la monocapa citosólica de la membrana plasmática.

dones de algunas leguminosas, y la zeína en el endosperma del maíz. Estas proteínas se localizan en organoides especiales, denominados **cuerpos proteicos** o **granos de aleurona**.

En la mayoría de las células vegetales existe uno o más compartimientos llamados **vacuolas**, limitados por membranas (fig. 1-7). Según el tipo celular, en total representan entre el 10 y el 90% del volumen del citoplasma. Cuando son muy voluminosas, el citosol queda reducido a una fina capa por debajo de la membrana plasmática. Existen dudas sobre su origen; se cree que se forman por la fusión entre sí de vesículas surgidas del complejo de Golgi. Las funciones de las vacuolas son variadas. Algunas se comportan como lisosomas, ya que contienen enzimas hidrolíticas. Otras sirven de depósito para nutrientes y desechos metabólicos. Finalmente, otras guardan líquidos y se usan para regular el volumen y la turgencia de la célula.

En los capítulos 3-30, 3-31 y 18-21 se estudia la participación del complejo de Golgi en la formación de la pared de la célula vegetal.

BIBLIOGRAFIA

Anderson R.G.W. (1993) Caveolae: where incoming and outcoming messengers meet. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10909.

Andrews D.W. and Johnson A.E. (1996) The translocon: more than a hole in the ER membrane? TIBS 21:365.

Balch W.E. (1990) Small GTP-binding proteins in vesicular transport. TIBS 15:473.

Barinaga M. (1993) Secrets of secretion revealed. Science 260:487.

Bennett M.K. and Scheller R.H. (1993) The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2559.

Blanco A. (2000) Química Biológica, 7ª Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

Bretscher M.S. and Munro S. (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. Science 261:1280.

Brodsky J.L. (1996) Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal. TIBS 21:122.

Chernomordik L.V. and Zimmerberg J. (1995) Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:541.

Cleves A.E. and Kelly R.B. (1996) Protein translocation: rehearsing the ABCs. Curr. Biol 6:276.

Cole N.B. et al. (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. Science 273:797.

Corsi A.K. and Schekman R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 271: 30299.

Cuervo A. and Dice J. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science 273:501.

Cukierman E., Huber I., Rotman M. and Cassel D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. Science 270:1999.

Dell'Angelica E.C. et al. (1998) Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. Science 280:431.
D'Souza-Schorey C. et al. (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor mediated endocytosis. Science 267:1175.
Esko J.D. and Zhang L. (1996) Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. Curr. Opin. Struc. Biol. 6:663.
Fischer G. (1994) Rab proteins in regulated exocytosis. TIBS 19:164.
Fukuda M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. J. Biol. Chem. 266: 21327.
Gahmberg C.G. and Tolvanen M. (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. TIBS 21:308.
Grosshans B.L., Ortiz D. and Novick P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 143:11821.
Gruenberg J. and Stenmark H. (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5:317.
Gurkan C., Stagg S.M. and Balch W.E. (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7:727.
Jaffe A.B. and Hall A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21:247.
Jahn R. and Scheller R.H. (2006) SNAREs-engines for membrane fusion. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7:631.
Hiller M.M. et al. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. Science 273:1725.
Hughson F.M. (1995) Molecular mechanisms of protein-mediated membrane fusion. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:507.
Jones S.M. et al. (1998) Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. Science 279:573.
Lamaze C. et al. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. Nature 382:177.
Lee M.C., Milier E.A., Goidberg J. et al. (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20:87.
Lupashin V.V. and Waters M.G. (1997) t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase. Science 276:1255.
Marciniak S.J. and Ron D. (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. Physiol. Rev. 86:1133.
Marsh M. and McMahon H.T. (1999) The structural era of endocytocis. Science 285:215.
Marx J. (2001) Caveolae: A once-elusive structure gets some respect. Science 294:1862.
Parton R.G. and Simons K. (1995) Digging into caveolae. Science 269:1398.
Pelham H.R.B. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. TIBS 15:483.
Powers T. and Walter P. (1996) The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. Curr. Biol. 6:331.
Prakash S. and Matouschek A. (2004) Protein unfolding in the cell. Trends Biochem. Sci. 29:593.
Rapoport T.A. (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. Science 258:931.
Rassow J. and Pfanner N. (1996) Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides. Curr. Biol. 6:115.
Römisch K. (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21:435.
Rothman J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 372:55.
Rothman J.E. and Orci L. (1996) Budding vesicles in living cells. Sci. Am. 274 (3):50.
Rothman J.E. and Wieland F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. Science 272:227.
Sanders S.L. and Schekman R. (1992) Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. J. Biol. Chem. 267:13791.
Schatz G. and Dobberstein B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. Science 271:1519.
Schekman R. (1992) Genetic and biochemical analysis of vesicular traffic in yeast. Curr. Opin. Cell Biol. 4:587.
Schekman R. and Orci L. (1996) Coat protein and vesicle budding. Science 271:1526.
Söllner T. et al. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362:318.
Subramaniam V. et al. (1996) GS28, a 28-kilodalton Golgi SNARE that participates in ER-Golgi transport. Science 272:1161.
Warren G. (1993) Bridging the gap. Nature 362:297.
White J.M. (1992) Membrane fusion. Science 258:917.
White S.H. and von Heijne G. (2004) The machinery of membrane protein assembly. Curr. Opin. Struct. Biol. 14:397.
Wickner W.T. (1994) How ATP drives proteins across membranes. Science 266:1197.
Wileman T., Harding C. and Stahl P. (1985) Receptor-mediated endocytosis. Biochem. J. 232:1.
Wu S.K. et al. (1996) Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. TIBS 21:472.
Zeuschner D., Geerts W.J. and Klumperman J. (2006) Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. Nature Cell Biol. 8:377

Mitocondrias
Energía celular I

8

8-1. La mayor parte de la energía que usa la célula es provista por el ATP

Las células necesitan energía para realizar casi todas sus actividades, algunas de las cuales se ilustran en la figura 8-1. La energía es tomada de moléculas de **ATP**. Estas, a pesar del insignificante espacio que ocupan, permiten tener al alcance una gran cantidad de energía de fácil disponibilidad, de modo que pueda ser utilizada tan pronto y donde se la necesite. La energía se halla depositada en las uniones químicas entre los fosfatos del ATP —uniones de alta energía—, aunque suele utilizarse solamente la que involucra al fosfato terminal (figs. 2-3 y 8-2). Así, cuando el ATP se hidroliza, junto con la liberación de energía se genera ADP y un fosfato (fig. 8-3). Como vemos, el ADP se comporta como una pequeña "batería descargada", que al cargarse por la unión de un fosfato se convierte en ATP, la "batería cargada".

Las usinas generadoras de moléculas de ATP son las mitocondrias, que toman la energía depositada en las uniones covalentes de las moléculas de los alimentos y la transfieren al ADP. Una vez formado, el ATP sale de la mitocondria y se difunde por la célula, de modo que su energía puede ser usada para las distintas actividades celulares. Al removerse la energía del ATP, se reconstituye el ADP, que reingresa en las mitocondrias para recibir una nueva "carga" de energía.

Las células poseen una enorme cantidad de mitocondrias, cada una de las cuales produce innumerables moléculas de ATP. Estas, como las mitocondrias, se localizan cerca de los sitios de consumo.

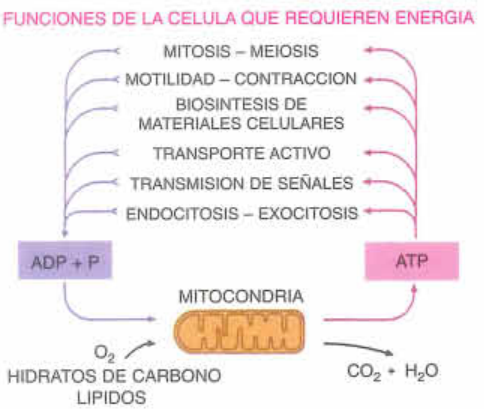


Fig. 8-1. Esquema que muestra a la mitocondria como la planta de producción energética de la célula. El ATP producido se emplea, entre otras, en las funciones indicadas.

8-2. La energía es tomada de los alimentos

Al provenir la energía de los alimentos, en última instancia procede del sol. En las plantas, a partir de CO_2 y H_2O, la luz solar da lugar a una serie de reacciones que —además de generar O_2— convierten la energía lumínica en energía química, la cual queda depositada en las uniones covalentes de las moléculas de los vegetales (cap. 9-4) (tabla 8-1). La energía de los alimentos vegetales es tomada por los animales herbívoros, que a su vez sirven de alimento —y fuente de energía— a los animales carnívoros.

Las sustancias alimenticias se clasifican en hidratos de carbono, grasas, proteínas, minerales y H_2O, a los cuales

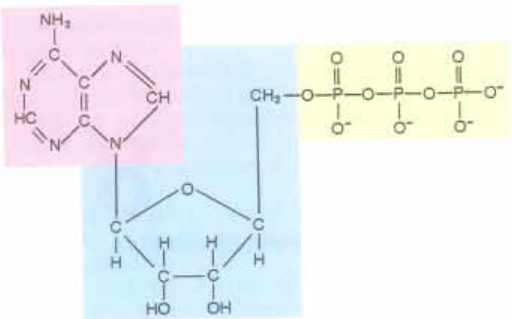


Fig. 8-2. Estructura química de la molécula de adenosina trifosfato (ATP).

debe agregarse el O_2. Los alimentos ingresan en el organismo por el sistema digestivo, salvo el O_2, que lo hace por el sistema respiratorio. Una vez que la energía ha sido extraída de los alimentos, quedan como productos de desecho CO_2 y H_2O (tabla 8-1), a los que deben sumarse algunas sustancias nitrogenadas derivadas del catabolismo de las proteínas.

No toda la energía depositada en las uniones químicas de las moléculas alimenticias es transferida al ATP, ya que durante las sucesivas reacciones que conducen a su formación, parte de esa energía se convierte en calor. Debe señalarse que desde el punto de vista termodinámico el calor que se genera en el escenario celular como consecuencia de las reacciones químicas es también un producto de desecho. No obstante, en términos de aprovechamiento de energía para producir trabajo las células son muy eficientes, pues, comparadas con la mayoría de los motores, la relación consumo de combustible/producción de trabajo da cifras mucho más favorables para las células. Así, en las células el 40% de la energía liberada sirve para actividades provechosas y el 60% se disipa como calor, mientras que en los motores tales cifras suelen ser del orden del 20% y del 80%, respectivamente.

El mejor rendimiento logrado por la célula se debe a que degrada los alimentos en forma gradual, por medio de enzimas que ella misma sintetiza. Ello permite que la energía liberada de las moléculas alimenticias sea transferida al ADP y se forme ATP con mínima generación de calor.

8-3. La energía de las moléculas alimenticias es extraída mediante oxidaciones

La mayor parte de la energía contenida en las moléculas de los alimentos es extraída mediante una sucesión de **oxidaciones**, al cabo de las cuales el oxígeno atmosférico se une al hidrógeno y al carbono liberados por esas moléculas y se forma H_2O y CO_2, respectivamente. La gradualidad arriba mencionada resulta de tales oxidaciones, puesto que éstas se cumplen paso a paso y en algunos de esos pasos se liberan pequeñas porciones de energía. Si las oxidaciones no fueran graduales, la energía química se liberaría súbitamente y se disiparía como calor.

Deberá recordarse que una molécula se oxida no solamente cuando gana oxígeno (O) sino también cuando pierde hidrógeno (H). Debido a que éste puede disociarse en un electrón (e^-) y un protón (H^+), en un sentido general toda remoción de e^- de cualquier átomo o molécula constituye una reacción de oxidación.

Si el e^- removido proviene de un átomo de H, el H^+ resultante puede permanecer en la molécula oxidada (que entonces queda con una carga positiva)

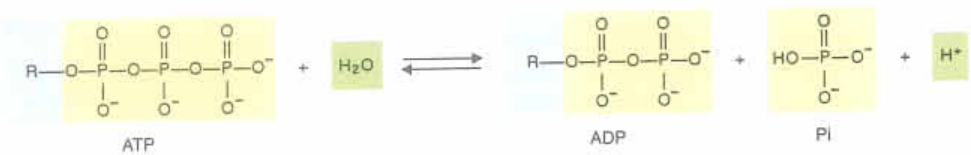


Fig. 8-3. Hidrólisis y síntesis del ATP.

Tabla 8-1. Diferencias entre los procesos energéticos de las plantas (fotosíntesis) y de los animales (fosforilación oxidativa)

Fotosíntesis	*Fosforilación oxidativa*
En cloroplastos	En mitocondrias
Reacción endergónica: $Energía + CO_2 + H_2O \rightarrow Alimentos + O_2$	Reacción exergónica: $Alimentos + O_2 \rightarrow Energía + CO_2 + H_2O$
Hidroliza agua	Forma agua
Libera O_2	Libera CO_2
Sólo en presencia de luz	Independiente de la luz
Periódica	Continua

o puede ser removido y pasar al medio acuoso. Ulteriormente los e^- y los H^+ pueden volver a unirse —para componer nuevos átomos de H—, por ejemplo, cuando son transferidos e^- y H^+ al O_2 y se forma H_2O.

Toda oxidación de un átomo o de una molécula está atada a la **reducción** de otro átomo o de otra molécula, que entonces ganan hidrógeno o e^-, o pierden oxígeno.

Durante el procesamiento de los alimentos, en algunas reacciones de oxidación y reducción intervienen dos moléculas intermediarias cardinales: las coenzimas **nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)** y **flavina adenina dinucleótido (FAD)** (fig. 8-4). En su forma oxidada la primera se representa con la sigla NAD^+, y en su forma reducida con la sigla NADH. La segunda, con las siglas FAD y $FADH_2$, respectivamente.

8-4. Los alimentos son degradados por enzimas

Apenas los alimentos son ingeridos, los polisacáridos, los lípidos y las proteínas que los integran comienzan a ser escindidos en moléculas cada vez más pequeñas por la acción de una gran variedad de **enzimas**. Estos procesos se cumplen de forma tal que las moléculas transformadas por unas enzimas son modificadas a continuación por otras, y así consecutivamente. De este modo se estable-

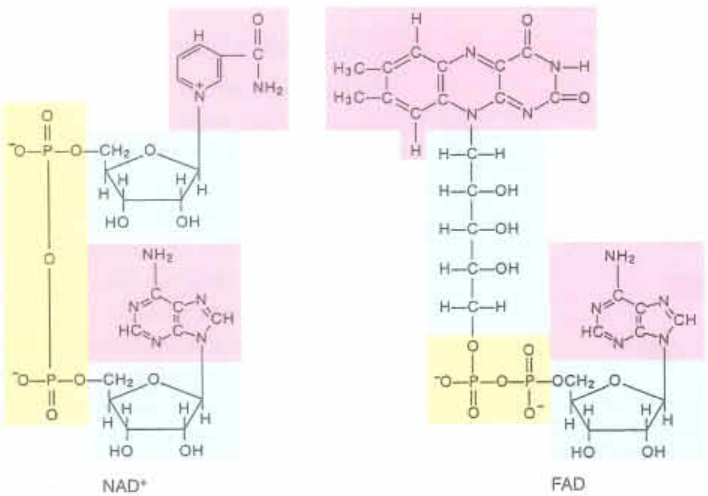


Fig. 8-4. Estructura química de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y de la flavina adenina dinucleótido (FAD).

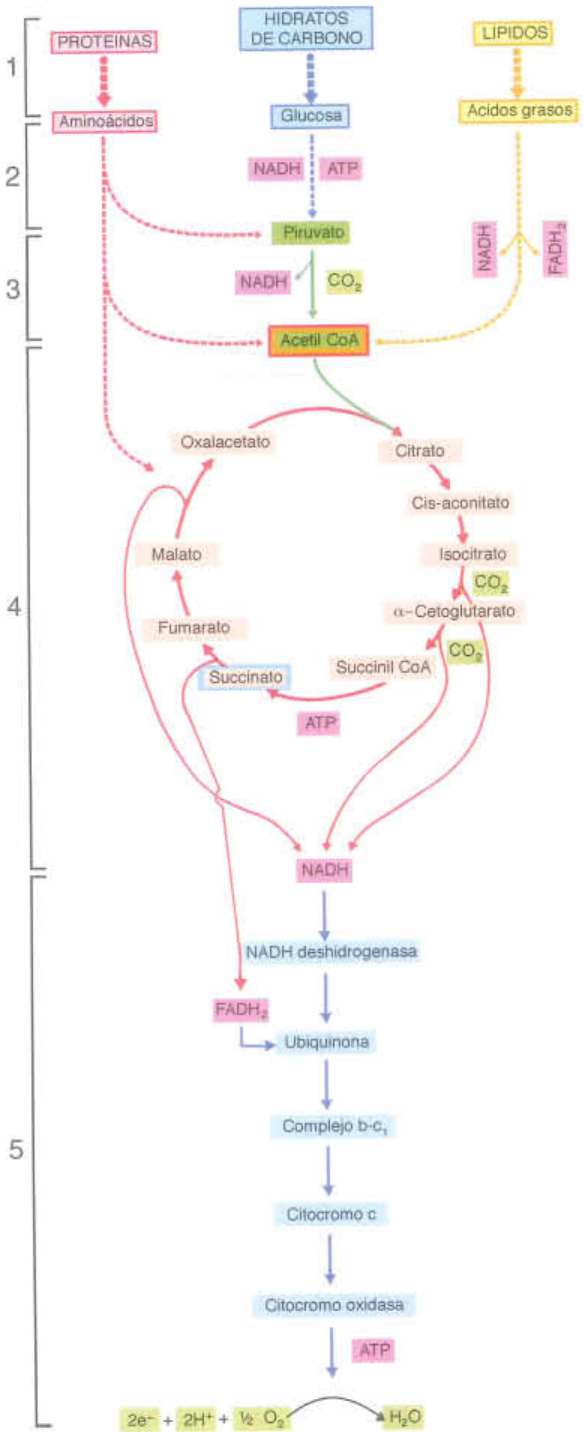


Fig. 8-5. Esquema general de la degradación de los alimentos una vez incorporados al organismo: 1) degradación enzimática en el tubo digestivo; 2) glucólisis en el citosol; 3) descarboxilación oxidativa; 4) ciclo de Krebs; 5) fosforilación oxidativa.

cen verdaderas cadenas metabólicas degradativas, que en los primeros pasos son distintas para cada tipo de alimento, pero que en las etapas finales confluyen en una vía metabólica común.

La escisión enzimática de los alimentos tiene lugar en tres escenarios orgánicos: el tubo digestivo, el citosol y la mitocondria (fig. 8-5).

8-5. La degradación de los alimentos comienza en el sistema digestivo

La primera etapa de la escisión enzimática de los alimentos tiene lugar en la luz del tubo digestivo, de modo que es extracelular. Así, mediante enzimas secretadas por diversas células de dicho tubo, los hidratos de carbono se degradan a monosacáridos —especialmente **glucosa**—, los lípidos (en su mayoría triacilgliceroles) se convierten en **ácidos grasos** y glicerol, y las proteínas son degradadas a **aminoácidos** (fig. 8-5). Tras ser absorbidas por el epitelio intestinal estas moléculas ingresan en la sangre y por ella llegan a las células.

Para asegurarse un abastecimiento continuo de energía, las células guardan en el citosol parte de la glucosa y de los ácidos grasos bajo la forma de glucógeno y de triacilgliceroles, respectivamente. En el capítulo 4-3 se vio que los hepatocitos y las células musculares estriadas suelen contener importantes reservas de esas moléculas en forma de inclusiones, desde donde se movilizan cuando se las necesita. También se señaló que los adipocitos sirven como depósito para grandes cantidades de triacilgliceroles.

8-6. La glucólisis tiene lugar en el citosol

Mediante una serie de reacciones químicas agrupadas con el nombre de **glucólisis** —en las que intervienen **10 enzimas** consecutivas localizadas en el citosol—, cada molécula de **glucosa**, que posee 6 átomos de carbono, da lugar a dos moléculas de **piruvato**, que constan de 3 carbonos cada una (figs. 8-6 y 8-11).

Al comienzo de este proceso —que constituye la segunda etapa de la degradación de los glúcidos— se invierte la energía de dos ATP. No obstante, debido a que de inmediato se generan cuatro, se ganan dos ATP, uno por cada piruvato.

Además, una parte de la energía liberada

durante la glucólisis no es transferida directamente al ATP sino que promueve la reducción de dos NAD^+ (una por cada piruvato). Más adelante veremos cómo, en las mitocondrias, la energía contenida en las dos NADH surgidas de la glucólisis es transferida al ATP (sección 8-18).

Volviendo a los piruvatos, dejan el citosol e ingresan en las mitocondrias.

8-7. En las mitocondrias se producen la descarboxilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa

Por acción de un complejo multienzimático llamado **piruvato deshidrogenasa**, presente en las mitocondrias, cada piruvato (3 C) se convierte en un **acetilo**, que es una molécula que contiene 2 carbonos. El acetilo se liga a una coenzima —la **coenzima A (CoA)**—, con la que compone la **acetil CoA** (figs. 8-7 y 8-11). El carbono del piruvato es removido junto con dos oxígenos, lo que produce CO_2 (figs. 8-5, 8-10 y 8-11). El piruvato cede también un hidruro (H^-), es decir, un H^+ y dos e^-. En conjunto estas reacciones reciben el nombre de **descarboxilación oxidativa**, que es la tercera etapa de la degradación de los hidratos de carbono.

Durante la descarboxilación oxidativa se genera energía suficiente para reducir una NAD^+ (que recibe el H^- mencionado en el párrafo anterior), lo cual se traduce en la formación de una NADH por cada acetilo producido (figs. 8-5 y 8-11). Luego se verá cómo la energía depositada en esta NADH es transferida al ATP.

A continuación —siempre en las mitocondrias— los átomos de carbono e hidrógeno del acetilo (recordemos que se halla unido a la CoA) son oxidados, por lo que se generan CO_2 y H_2O. Las oxidaciones son graduales y en su transcurso se libera la energía depositada en las uniones covalentes entre esos átomos, que pasa al ATP. Ambos procesos —las oxidaciones y la formación de ATP— ocurren en dos tiempos; en el primero se genera CO_2 y en el segundo H_2O (fig. 8-5).

El primero de esos tiempos —que representa la cuarta etapa de la degra-

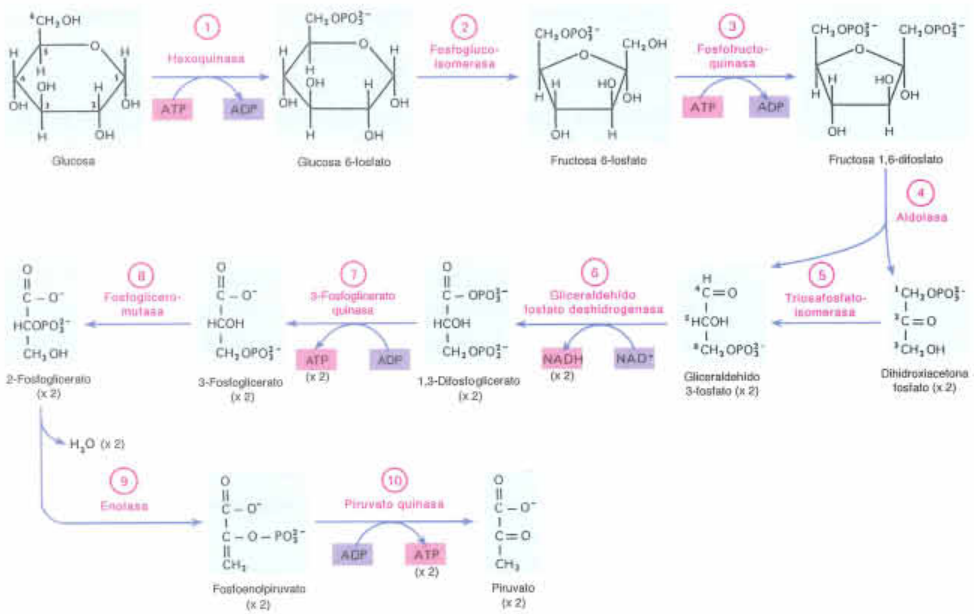


Fig. 8-6. Etapas de la glucólisis y enzimas intervinientes.

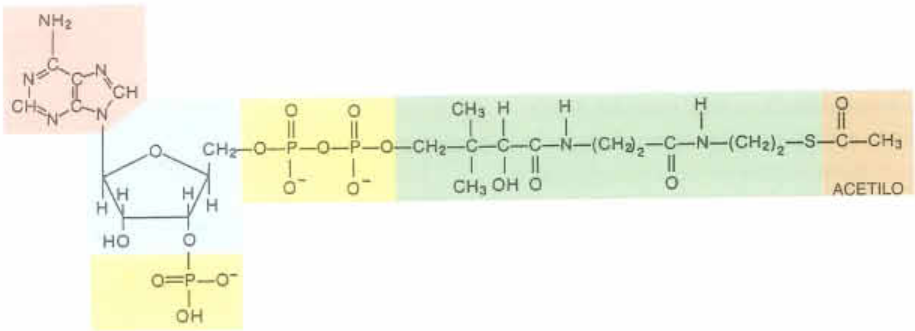


Fig. 8-7. Estructura química de la acetilcoenzima A (acetil CoA).

dación de los glúcidos— abarca una sucesión de oxidaciones durante el llamado **ciclo de Krebs** (figs. 8-5, 8-10 y 8-11). De la energía liberada en esta etapa, una pequeña fracción se aprovecha para generar un ATP en forma directa (aunque por vía del GTP), pero la mayor parte es utilizada para reducir tres NAD^+ —que entonces se convierten en otras tantas NADH— y una FAD, que pasa a su estado reducido o $FADH_2$.

En el segundo tiempo, contemporáneo al del ciclo de Krebs, las NADH y las $FADH_2$ son oxidadas en sendos puntos al comienzo de una serie de complejos moleculares que se agrupan con el nombre de **cadena transportadora de electrones** (o **cadena respiratoria**), de modo que las NADH y las $FADH_2$ vuelven a convertirse en NAD^+ y FAD, respectivamente. Cuando ambas coenzimas son oxidadas, la energía depositada en sus moléculas se libera y es transferida al ADP que se halla en las mitocondrias, el cual, dado que se fosforila, se convierte en ATP.

Esta etapa —la quinta y última en la degradación de los glúcidos—, porque da lugar a oxidaciones acopladas a fosforilaciones recibe el nombre de **fosforilación oxidativa** (fig. 8-5 y 8-10).

8-8. Los ácidos grasos son degradados en las mitocondrias

A diferencia de la glucosa, los **ácidos grasos** —provenientes de los alimentos o de la movilización de las reservas de grasa en las células— no se degradan en el citosol. Pasan a las mitocondrias, donde una serie de enzimas específicas los desdobla hasta generar entre ocho y nueve **acetilos** cada uno.

El proceso degradativo se denomina **β-oxidación** y comprende varios ciclos sucesivos, siete cuando se trata de un ácido graso de 16 carbonos y ocho en los de 18 carbonos. Es que el ácido graso cede un acetilo por ciclo. Además, cada ciclo produce una NADH y una $FADH_2$ (fig. 8-10).

La β-oxidación de los ácidos grasos es conducida por las enzimas acil CoA deshidrogenasa, enoil CoA hidratasa, hidroxiacil CoA deshidrogenasa y β-cetoacil CoA tiolasa.

Igual que los acetilos derivados de la descarboxilación oxidativa del piruvato, los surgidos de la β-oxidación de los ácidos grasos son cedidos a la CoA e ingresan en el **ciclo de Krebs**. Como vemos, las cadenas metabólicas que degradan a los glúcidos y a las grasas dan lugar a una molécula común, la acetil CoA. Antes se dijo que en el ciclo de Krebs cada acetil CoA genera un ATP, tres NADH y una $FADH_2$, y que la energía contenida en las NADH y $FADH_2$ es transferida al ATP al cabo de la fosforilación oxidativa.

Las grasas aportan más energía que los hidratos de carbono por la cantidad de NADH y $FADH_2$ suplementarias que se generan durante la β-oxidación de los ácidos grasos, proporcionalmente mayor que las producidas por la glucosa durante la glucólisis y la descarboxilación oxidativa.

8-9. Los primeros productos de la degradación de los aminoácidos son muy variados

En lo que atañe a los **aminoácidos**, cuando no se utilizan para sintetizar proteínas u otras moléculas y son requeridos para generar energía, se convierten —mediante distintas enzimas específicas— algunos en piruvato, otros en acetilos y otros en moléculas intermediarias del ciclo de Krebs (fig. 8-5).

DESCRIPCION GENERAL Y ESTRUCTURA DE LAS MITOCONDRIAS

8-10. Las mitocondrias se encuentran en todos los tipos celulares

Las mitocondrias se hallan en todos los tipos celulares y constituyen uno de los ejemplos de integración morfofuncional más admirables, ya que proveen el andamiaje sobre el cual se asientan las innumerables moléculas que participan en las reacciones que transfieren la energía depositada en los alimentos a una molécula extraordinariamente versátil como lo es el ATP.

Las mitocondrias son cilíndricas, aunque experimentan cambios de forma sutiles, derivados de su actividad. En promedio miden 3 μm de largo y tienen un diámetro de 0,5 μm. Su número varía según el tipo celular. En las células hepáticas, por ejemplo, suelen hallarse entre 1.000 y 2.000 mitocondrias (fig. 1-11). Están ubicadas en las regiones de las células donde la demanda de energía es mayor; así, se desplazan de un lado a otro del citoplasma hacia las zonas necesitadas de energía. Los microtúbulos y las proteínas motoras asociadas intervienen en tales desplazamientos (cap. 5-8). En algunos tipos celulares, como los espermatozoides, los adipocitos y las células musculares estriadas, las mitocondrias se hallan inmovilizadas en lugares fijos.

8-11. Las mitocondrias poseen dos membranas y dos compartimientos

Las mitocondrias poseen dos membranas —una externa y otra interna—, que dan lugar a dos compartimientos: el espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial (figs. 8-8 y 8-9). Mencionaremos las características y las moléculas de mayor interés de estos cuatro componentes.

Matriz mitocondrial. La matriz mitocondrial contiene numerosas moléculas, entre ellas:

1) El complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, responsable de la descarboxilación oxidativa (fig. 8-11).

2) Las enzimas involucradas en la β-oxidación de los ácidos grasos (fig. 8-10).

3) Las enzimas responsables del ciclo de Krebs, excepto la succinato deshidrogenasa (fig. 8-11).

4) La coenzima A (CoA), la coenzima NAD, ADP, fosfato, O_2, etc.

5) Gránulos de distintos tamaños, compuestos principalmente por Ca^{2+} (fig. 8-9).

6) Varias copias de un ADN circular (sección 8-26) (figs. 8-9, 8-16 y 8-18).

7) Trece tipos de ARNm, sintetizados a partir de otros tantos genes de ese ADN.

8) Dos tipos de ARNr, los cuales forman ribosomas parecidos a los citosólicos (fig. 8-9).

9) Veintidós tipos de ARNt para los veinte aminoácidos.

Membrana interna. La membrana interna desarrolla plegamientos hacia la matriz que dan lugar a las llamadas **crestas mitocondriales**, formadas con el objeto de aumentar la superficie membranosa. El número y la forma de las crestas varían en los distintos tipos celulares.

La membrana interna de las mitocondrias presenta un alto grado de especialización y las dos caras de su bicapa lipídica exhiben una marcada asimetría. En ella se localizan, entre otros, los siguientes elementos:

1) Un conjunto de moléculas que componen la **cadena transportadora de electrones** (o cadena respiratoria) (figs. 8-5, 8-10 y 8-12). Existen innumerables copias de estos conjuntos en el plano de la bicapa lipídica. Cada uno se compone de cuatro complejos proteicos relativamente grandes, llamados ***NADH deshidrogenasa (I)***, ***succinato deshidrogenasa (II)***, ***b-c_1 (III)*** y ***citocromo oxidasa (IV)***, entre los cuales se encuentran dos transportadores de electrones pequeños, denominados ***ubiquinona*** y ***citocromo c***.

Debe señalarse que la succinato deshidrogenasa es a la vez una de las enzimas del ciclo de Krebs; funciona asociada a la coenzima FAD y ambas se localizan en la membrana interna (figs. 8-5, 8-10 y 8-11). Además, que el citocromo c no es una proteína intrínseca de esta membrana sino una proteína periférica que apunta al espacio intermembranoso (fig. 8-10), y que la ubiquinona es una molécula no proteica que se aloja en la zona apolar de la bicapa lipídica mediante su cadena de 10 isoprenos, que es hidrofóbica (caps. 2-7 y 3-2) (fig. 2-24).

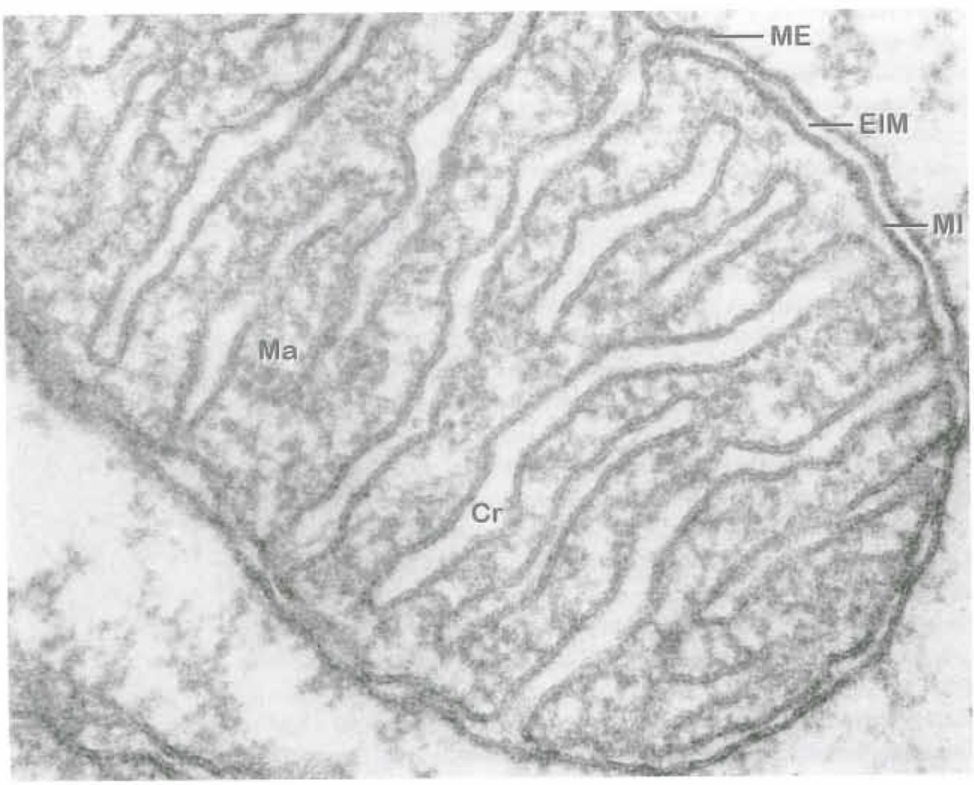


Fig. 8-8. Micrografía electrónica de la mitocondria. Obsérvense las crestas (*Cr*), la matriz (*Ma*), el espacio intermembranoso (*EIM*), la membrana externa (*ME*) y la membrana interna (*MI*). 207.000×. (Cortesía de G. E. Palade.)

2) La **ATP sintasa**, que es un complejo proteico ubicado en las inmediaciones de la cadena transportadora de electrones (figs. 8-10 y 8-12). Presenta dos sectores, uno transmembranoso (***porción F_0***), que tiene un túnel para el pasaje de H^+, y otro orientado hacia la matriz mitocondrial (***porción F_1***) (fig. 8-13). Este último cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, o sea, es el responsable de las fosforilaciones a que hace referencia el término "fosforilación oxidativa". El origen de la energía requerida por la porción F_1 de la ATP sintasa para que pueda concretar tales fosforilaciones será analizado más adelante.

3) Un fosfolípido doble —el difosfatidilglicerol o cardiolipina ilustrado en la figura 2-17—, que impide el pasaje de cualquier soluto a través de la bicapa lipídica, excepto O_2, CO_2, H_2O, NH_3 y ácidos grasos.

4) Diversos canales iónicos y permeasas que permiten el pasaje selectivo de iones y moléculas desde el espacio intermembranoso a la matriz mitocondrial, y en sentido inverso (fig. 8-10).

Membrana externa. La membrana externa es permeable a todos los solutos existentes en el citosol, pero no a las macromoléculas. Ello se debe a que en su bicapa lipídica posee numerosas proteínas transmembranosas multipaso llamadas **porinas**, que forman canales acuosos por los que pasan libremente iones y moléculas de hasta 5 kDa. En las porinas los tramos proteicos que cruzan la bicapa lipídica exhiben una estructura en hoja plegada β.

Espacio intermembranoso. Dada la presencia de las porinas en la membrana externa, el contenido de solutos en el espacio intermembranoso es similar al del citosol, aunque posee algunos elementos propios y una elevada concentración de H^+ (fig. 8-12).

FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS

8-12. La función principal de las mitocondrias es generar ATP

Vimos que mediante la descarboxilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, la mitocondria traslada al ADP —para formar ATP— la energía existente en las uniones químicas de las moléculas alimenticias.

Analizaremos estos tres procesos en el escenario biológico donde tienen lugar, es decir, en el andamiaje estructural provisto por la mitocondria.

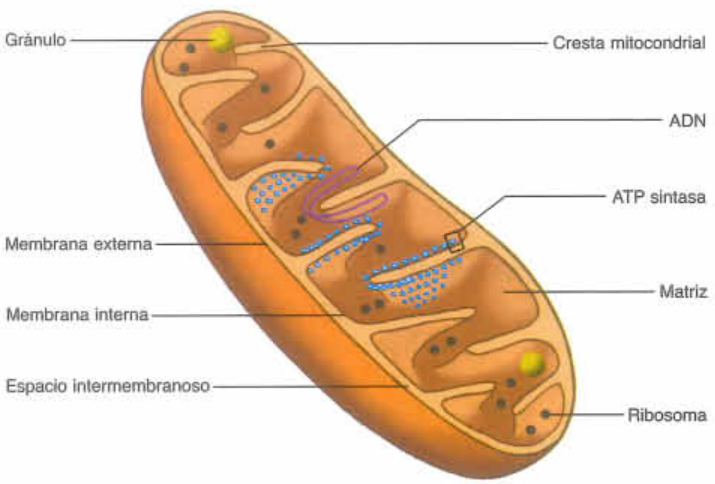


Fig. 8-9. Esquema tridimensional de una mitocondria cortada longitudinalmente. Las crestas aparecen tapizadas con moléculas de ATP sintasa.

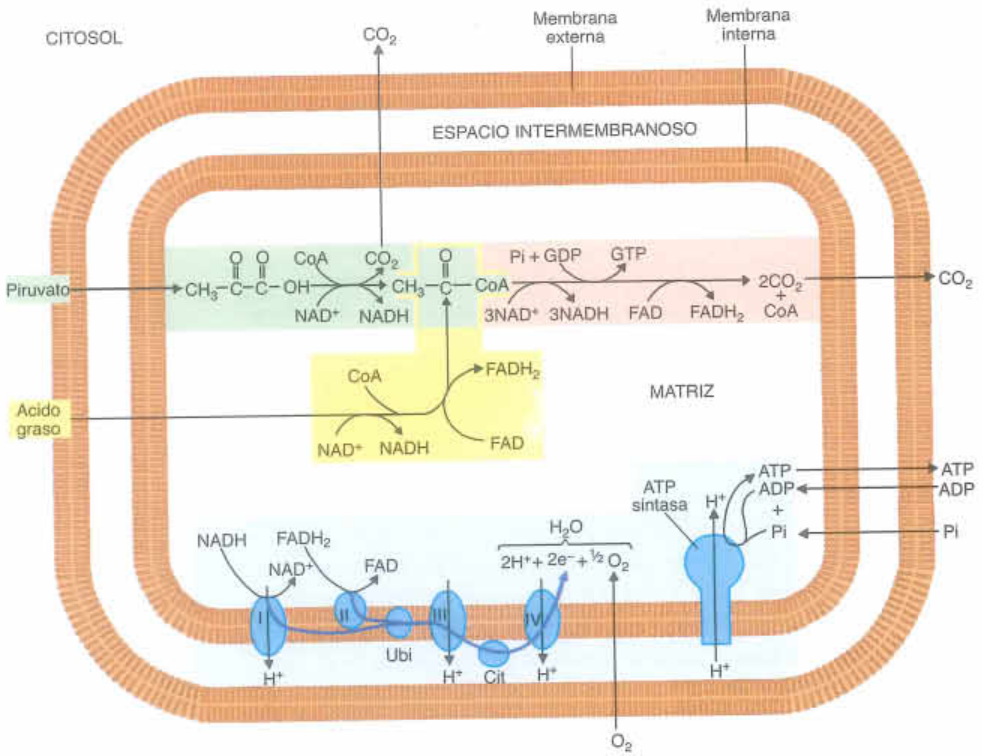


Fig. 8-10. Representación gráfica de la mitocondria. Se ilustran las reacciones correspondientes a la descarboxilación oxidativa (*verde*), al ciclo de Krebs (*rojo*), a la β-oxidación de los ácidos grasos (*amarillo*) y a la fosforilación oxidativa (*azul*). La acetil CoA deriva tanto de la descarboxilación oxidativa como de la β-oxidación de los ácidos grasos y es el punto de partida del ciclo de Krebs. *I*, NADH deshidrogenasa; *II*, Succinato deshidrogenasa (y FAD); *Ubi*, Ubiquinona; *III*, Complejo b-c_1; *Cit*, Citocromo c; *IV*, Citocromo oxidasa.

8-13. La descarboxilación oxidativa del piruvato y la β-oxidación de los ácidos grasos ocurren en la matriz mitocondrial

Proveniente del citosol, el piruvato ingresa en la matriz mitocondrial, donde por acción de la piruvato deshidrogenasa pierde un carbono y se convierte en el grupo acetilo de la acetil CoA (figs. 8-5, 8-7, 8-10 y 8-11). Recordemos que en esa conversión, además de CO_2, se genera energía suficiente para formar una NADH, de modo que por cada molécula de glucosa se originan dos de estas coenzimas.

A los acetilos generados a partir de los piruvatos deben sumarse los derivados de la β-oxidación de los ácidos grasos y del metabolismo de algunos aminoácidos (figs. 8-5 y 8-10).

Cualquiera que sea su origen, el grupo acetilo de cada acetil CoA ingresa en el ciclo de Krebs. Lo hace al combinarse con una molécula de 4 carbonos —el ácido oxalacético—, con la que forma una molécula de 6 carbonos llamada ácido cítrico, que da inicio y nombre al ciclo.

8-14. Las reacciones del ciclo de Krebs se producen en la matriz mitocondrial

Como muestra la figura 8-11, el ciclo de Krebs (llamado también ***ciclo del ácido cítrico*** o ciclo de los ácidos tricarboxílicos) comprende una serie de nueve reacciones químicas mediadas por otras tantas enzimas específicas. Estas actúan secuencialmente; lo hacen de forma tal que el último de sus productos vuelve a ser el ácido oxalacético, el cual, al combinarse con el grupo acetilo de otra acetil CoA, genera de nuevo ácido cítrico. Con esta molécula

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

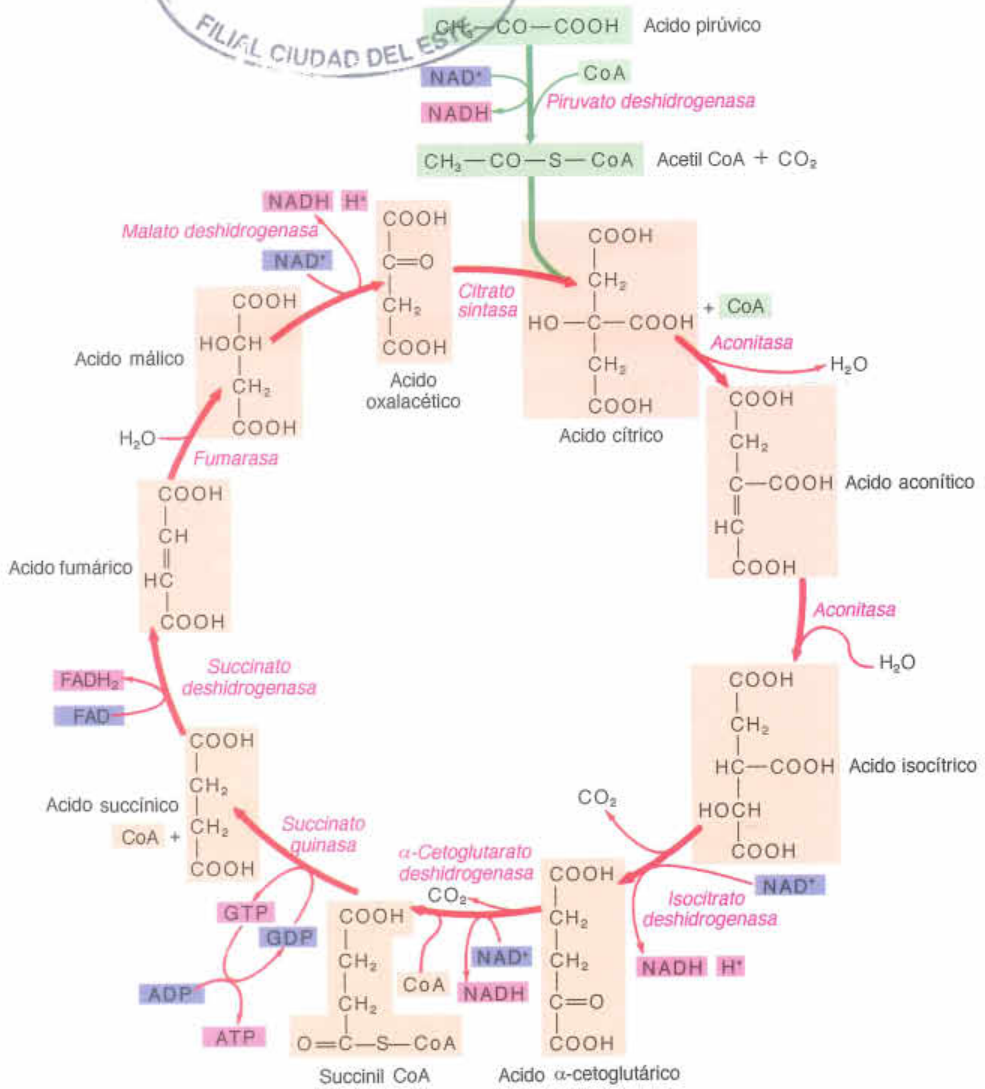


Fig. 8-11. La descarboxilación oxidativa y el ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico) en las mitocondrias. Están representadas las reacciones, las enzimas intervinientes y los productos de ambos procesos.

se inicia otro ciclo de Krebs, y así sucesivamente mientras haya O_2 y acetilos disponibles.

Al cumplirse cada vuelta del ciclo de Krebs, dos de los seis carbonos del ácido cítrico se liberan como CO_2. Además se genera energía suficiente para formar un ATP, tres NADH y una $FADH_2$.

Puesto que se necesitan dos vueltas del ciclo de Krebs para procesar a los dos acetilos derivados de la glucólisis de una molécula de glucosa, cada uno de estos monosacáridos da lugar a dos ATP, seis NADH y dos $FADH_2$. Debe advertirse que el ATP se forma a partir de GTP, que es el nucleósido trifosfato surgido del ciclo.

Como se aprecia en la figura 8-11, la enzima del ciclo de Krebs encargada de transferir el H_2 a la FAD es la succinato deshidrogenasa (vimos que la enzima y la coenzima se localizan en la membrana mitocondrial interna).

En la misma figura puede advertirse que junto a la primera y a la tercera

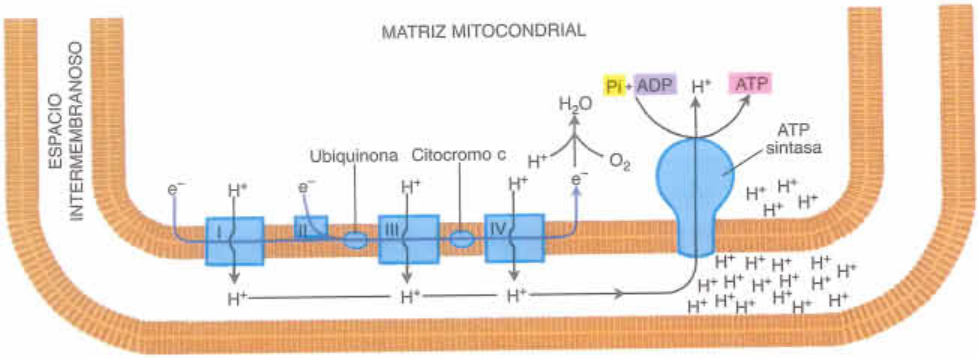


Fig. 8-12. Un sector de la mitocondria que muestra los complejos proteicos integrantes de la cadena transportadora de electrones (o cadena respiratoria) y la ATP sintasa. *I*, NADH deshidrogenasa; *II*, Succinato deshidrogenasa (y FAD); *III*, Complejo b-c_1; *IV*, Citocromo oxidasa.

NADH surgidas del ciclo de Krebs aparecen sendos H^+, pues los sustratos oxidados, a diferencia de lo que acontece en la glucólisis, en la descarboxilación oxidativa y en la formación de la segunda NADH nacida del ciclo de Krebs, ceden un H_2 en lugar de un H^-.

Las moléculas de CO_2 formadas durante la descarboxilación oxidativa y el ciclo de Krebs pasan al citosol, de éste al espacio extracelular y finalmente a la sangre, que las transporta a los pulmones para su eliminación.

8-15. Las oxidaciones de la fosforilación oxidativa tienen lugar en la membrana interna de la mitocondria

La energía contenida en las NADH y en la $FADH_2$ formadas durante el ciclo de Krebs se transfiere al ATP después de una serie de procesos que comienzan con la oxidación de ambas coenzimas.

Los átomos de hidrógeno liberados de las NADH y de la $FADH_2$ como consecuencia de ambas oxidaciones se disocian en H^+ y e^-, del modo expresado en las siguientes ecuaciones:

$$NADH \rightarrow NAD^+ + 1\ H^+ + 2\ e^-$$

$$FADH_2 \rightarrow FAD + 2\ H^+ + 2\ e^-$$

Es importante señalar que los e^- surgidos de estos procesos poseen un elevado potencial de transferencia, es decir, una gran cantidad de energía. Así ingresan en la cadena transportadora de electrones, cuyos componentes fueron enumerados cuando se describió la membrana mitocondrial interna (fig. 8-12).

Dado que cada componente de la cadena posee por los e^- una afinidad mayor que su predecesor, los e^- fluyen por ella en el siguiente orden:

Para los e^- cedidos por la NADH, el punto de entrada es la NADH deshidrogenasa (complejo I). Desde ésta pasan a la ubiquinona, que los transfiere al complejo b-c_1 (complejo III). Los e^- dejan este complejo e ingresan en el citocromo c, desde el cual pasan al último eslabón de la cadena, la citocromo oxidasa (complejo IV). Durante este recorrido los e^- consumen la mayor parte de su energía —ya se verá por qué—, y al concluirlo retornan a la matriz mitocondrial (fig. 8-12).

Por su lado, los e^- cedidos por la $FADH_2$ tienen como punto de entrada la succinato deshidrogenasa (complejo II), que los transfiere a la ubiquinona, a partir de la cual fluyen por los restantes eslabones de la cadena en el mismo orden en que lo hacen los e^- cedidos por la NADH.

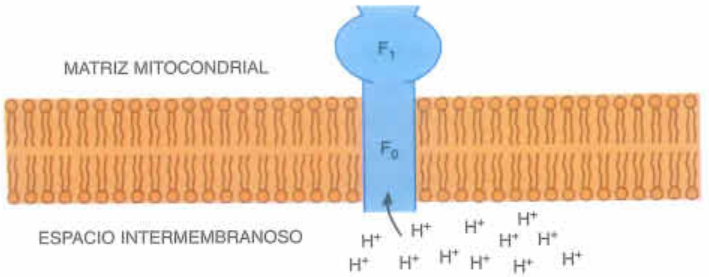


Fig. 8-13. Representación de la ATP sintasa en la membrana mitocondrial interna.

El potencial de transferencia de los e^- va disminuyendo en las sucesivas reacciones de oxidorreducción que se producen a lo largo de la cadena respiratoria, de modo que en cada etapa los e^- pasan a un estado de menor energía, la cual es bastante reducida cuando los e^- abandonan el último eslabón de la cadena.

La energía cedida por los e^- es utilizada para transportar a los H^+ (procedentes de las NADH y las $FADH_2$ oxidadas) desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranoso (fig. 8-12). La energía es requerida a causa de que ese transporte es activo, ya que los H^+ son transferidos desde un medio en que se hallan menos concentrados a otro en que su concentración es mayor. El mecanismo que hace posible el pasaje de los H^+ no ha sido determinado. Sólo se sabe que los H^+ pasan a través de los complejos principales de la cadena respiratoria —véase la figura 8-12—, los cuales actuarían como verdaderas **bombas de H^+** (cap. 3-25).

La existencia de un gradiente de concentración de H^+ (o gradiente de pH) entre ambos lados de la membrana mitocondrial interna es acompañada por un gradiente de voltaje o potencial eléctrico (cap. 3-11), bastante más positivo en la cara de la membrana que da al espacio intermembranoso. El gradiente electroquímico derivado de la suma de ambas fuerzas se traduce en la energía —llamada **protonicomotora**— que impulsa a los H^+ a regresar a la matriz mitocondrial, ahora por transporte pasivo. Los H^+ retornan por el túnel de la ATP sintasa (figs. 8-10, 8-12 y 8-13).

En síntesis, a medida que la energía suministrada por los e^- es utilizada para transferir los H^+ hacia el espacio intermembranoso, es absorbida por los propios H^+, que la retienen como energía protonicomotora.

8-16. La fosforilación es mediada por la ATP sintasa

En la sección 8-11 se dijo que la ATP sintasa está integrada por dos unidades que poseen localizaciones y funciones diferentes. Una atraviesa la bicapa lipídica (porción transmembranosa o F_0) y la otra da hacia la matriz mitocondrial (porción F_1) (fig. 8-13). La porción F_0 forma un túnel que permite el regreso de los H^+ a la matriz mitocondrial, mientras que la porción F_1 es responsable de la fosforilación, es decir, cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P. Como se ve, el regreso de los H^+ y la síntesis de ATP, si bien son procesos acoplados, se cumplen en dos lugares diferentes de la ATP sintasa.

La energía necesaria para la síntesis del ATP proviene de la energía protonicomotora contenida en los H^+, que la van perdiendo a medida que regresan pasivamente a la matriz mitocondrial.

En síntesis, la ATP sintasa se comporta como una turbina que convierte

una clase de energía (la protonicomotora, derivada del gradiente electroquímico de los H^+) en otra más provechosa para la célula, la energía química depositada entre el segundo y el tercer fosfato del ATP.

Se generan aproximadamente 2,5 ATP por cada NADH procesada y 1,5 por cada $FADH_2$.

El ATP sale al citosol por un contratransportador pasivo localizado en la membrana mitocondrial interna, la **ATP-ADP translocasa** (fig. 8-10). Por cada ATP que la atraviesa entra un ADP en la matriz mitocondrial.

La ATP sintasa puede también llamarse **ATPasa**, pues es capaz de hidrolizar ATP (a ADP y P) y con la energía liberada bombear H^+ al espacio intermembranoso a través de la porción F_0. No obstante, recibe el nombre de ATP sintasa porque en la matriz mitocondrial el cociente ATP/ADP normalmente es inferior a la unidad, lo cual lleva a la síntesis y no a la hidrólisis del ATP.

8-17. Los H^+ y los e^- se combinan con el oxígeno atmosférico para formar agua

Cabe ahora indagar sobre el destino de los e^-, los cuales, luego de perder una parte sustancial de su energía, abandonan la cadena respiratoria y regresan a la matriz mitocondrial. Se combinan con los H^+ venidos del espacio intermembranoso y el O_2 proveniente de la atmósfera, lo que da lugar a la formación de H_2O (figs. 8-10 y 8-12). La atracción de los e^- por el O_2 se debe a que poseen una gran afinidad por éste, mayor que la que tienen por la citocromo oxidasa (complejo IV), lugar por donde salen de la cadena respiratoria. Con la formación del H_2O culmina la fosforilación oxidativa.

Se necesitan 4 e^- y 4 H^+ por cada O_2 para que se produzcan 2 moléculas de H_2O, que es uno de los productos finales del metabolismo (el otro es el CO_2). El H_2O pasa de la mitocondria al citosol, donde puede quedar retenida o salir al espacio extracelular.

8-18. Las NADH generadas durante la glucólisis no ingresan en las mitocondrias

Hasta ahora hemos soslayado el destino de las NADH generadas durante la glucólisis (sección 8-6) (fig. 8-6). A diferencia de las NADH formadas en las mitocondrias, que rinden 2,5 ATP cada una, las de la glucólisis a veces generan 1,5 ATP y a veces 2,5. El menor rendimiento energético se debe a que la NADH citosólica no puede ingresar en la mitocondria, puesto que su membrana interna le es impermeable.

Para que la NADH citosólica pueda ceder su energía al ATP, ingresan en la mitocondria sólo sus e^- y H^+, ya que no la propia NADH. Ello es posible gracias a ciertas moléculas citosólicas que actúan como **"lanzaderas"**. Así,

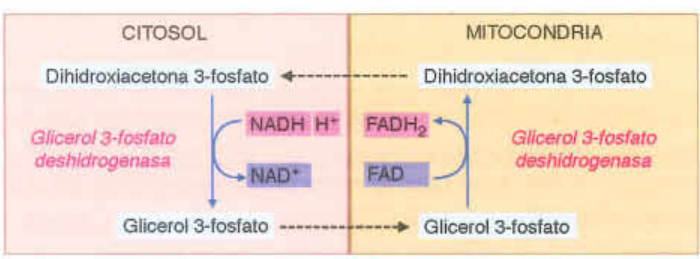


Fig. 8-14. Modo como actúa la lanzadera de glicerol 3-fosfato para transportar a la mitocondria los electrones de las NADH generadas durante la glucólisis.

una lanzadera, luego de captar dos e^- y un H^+ de la NADH (más otro H^+ del medio), los conduce a la mitocondria, donde los transfiere a otra molécula; luego retorna sin ellos al citosol, por lo que queda disponible para una nueva operación.

Una de las lanzaderas es el **glicerol 3-fosfato**, formado en el citosol al reducirse la dihidroxiacetona 3-fosfato (fig. 8-14). El glicerol 3-fosfato ingresa en el espacio intermembranoso y se pone en contacto con la membrana mitocondrial interna, más precisamente con la FAD, a la que le cede los dos e^- y los dos H^+, es decir, una molécula de hidrógeno (H_2). Se forma por lo tanto una $FADH_2$, que como sabemos cede sus e^- a la ubiquinona. En la sección 8-16 vimos que cuando los e^- ingresan en la cadena respiratoria por la ubiquinona dan lugar a 1,5 ATP en lugar de 2,5.

Existen además lanzaderas de **malato-aspartato** (fig. 8-15). En este caso los dos e^- y el H^+ de la NADH citosólica (más otro H^+ del medio) reducen a un oxalacetato, que se convierte en malato. Este ingresa en la matriz mitocondrial y se reoxida a oxalacetato. El H_2 salido del malato se usa para reducir una NAD^+ a NADH (el H^+ sobrante pasa al medio), que como se sabe produce tres ATP. El oxalacetato mitocondrial, dado que no puede atravesar la membrana interna de la mitocondria, para pasar al citosol se transforma en aspartato, que sí la atraviesa. En el citosol el aspartato se reconvierte en oxalacetato, lo cual cierra el ciclo.

8-19. En presencia de O_2, por cada molécula de glucosa se generan 30 o 32 ATP

Para efectuar el cálculo de la energía ganada en unidades de ATP al cabo de la oxidación de una molécula de **glucosa** se debe sumar la energía producida en el citosol a la gestada en la mitocondria.

La glucólisis genera 4 moléculas de ATP. Debido a que gasta 2, en esta etapa hay una ganancia neta de 2 ATP (fig. 8-6). Pero además genera 2 NADH, que por ser citosólicas producen 1,5 o 2,5 ATP cada una, 3 o 5 en total. Así, el aporte de la glucólisis es de 5 o 7 ATP, 2 generados en el citosol y 3 o 5 en la mitocondria.

Los dos piruvatos derivados de la glucólisis entran en la mitocondria, donde por descarboxilación oxidativa se convierten en dos acetilos. El proceso genera 2 NADH, una por cada piruvato. Dado que por cada NADH la fosforilación oxidativa produce 2,5 ATP, esta etapa rinde 5 ATP.

En el ciclo de Krebs cada acetilo genera 1 ATP, 3 NADH y 1 $FADH_2$, por

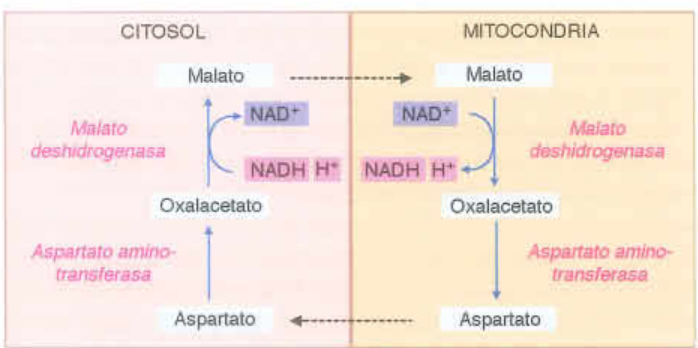


Fig. 8-15. Modo como actúa la lanzadera de malato-aspartato para transportar a la mitocondria los electrones de las NADH generadas durante la glucólisis.

lo que al cabo de las dos vueltas que se necesitan para metabolizar a los dos acetilos surgen 2 ATP, 6 NADH y 2 $FADH_2$. Dado que por cada NADH la fosforilación oxidativa genera 2,5 ATP, y por cada $FADH_2$, 1,5 ATP, a los 2 ATP surgidos de las dos vueltas del ciclo de Krebs deben sumárseles los 15 ATP aportados por las 6 NADH más los 3 ATP aportados por las 2 $FADH_2$, lo que hace un total de 20 ATP.

Sumados a los 5 o 7 ATP de la glucólisis y a los 5 ATP de la descarboxilación oxidativa, la ganancia de energía por molécula de glucosa es de 30 o 32 ATP.

Compárese esta producción con los exiguos 2 ATP generados en el citosol y se tendrá una idea de la importancia de la mitocondria en la provisión de energía para el funcionamiento de las células que consumen oxígeno.

Respecto de los **ácidos grasos**, si bien en su degradación no existen procesos equivalentes a la glucólisis y a la descarboxilación oxidativa (fig. 8-5), aportan más energía que la glucosa debido a las NADH y las $FADH_2$ suplementarias producidas durante la β-oxidación de sus cadenas (sección 8-8).

8-20. En las células musculares el piruvato puede convertirse en lactato

Las células musculares, cuando sobrepasan un determinado nivel de actividad, agotan el O_2 atmosférico que les llega mediante los glóbulos rojos, situación que es normal. Ante la falta de O_2, el piruvato, en lugar de convertirse en el grupo acetilo de la acetil CoA, se transforma en **lactato**. Este proceso metabólico se conoce con el nombre de **fermentación láctica**. Como es obvio, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa se omiten.

El lactato producido en las células musculares pasa a la sangre y llega al hígado. En los hepatocitos —vía piruvato— el lactato se convierte en glucosa, que utilizará la célula muscular si continúa demandando energía.

8-21. En las mitocondrias de las células de la grasa parda la energía generada por las oxidaciones se disipa en forma de calor

Si la energía protonicomotora de los H^+ situados en el espacio intermembranoso no se rescatara para formar ATP, los H^+, al volver a la matriz mitocondrial, igual se unirían a los e^- y al O_2 para formar H_2O, pero la energía protonicomotora, al cabo de la reacción, se convertiría en energía térmica, es decir, se disiparía como calor. Esto es lo que ocurre en las células adiposas de la denominada **grasa parda**, cuyas mitocondrias son incapaces de transferir la energía protonicomotora al ATP. Es que en la membrana interna de estas mitocondrias existe un transportador de H^+ llamado **termogenina**, el cual, debido a que no posee la porción F_1 —es decir, la función enzimática de la ATP sintasa—, permite el regreso de los H^+ a la matriz mitocondrial sin que su energía sea aprovechada para formar ATP. En consecuencia, la energía protonicomotora, al reaccionar los H^+ con los e^- y el O_2 atmosférico durante la formación de H_2O, se disipa como calor.

La grasa parda es un tejido que poseen los recién nacidos en la región interescapular. Si el niño nace en un medio muy frío, los ácidos grasos de los triacilgliceroles depositados en las células de la grasa parda se degradan y generan calor en lugar de ATP. Como vemos, la grasa parda puede ser vital en

el momento del nacimiento, al permitir una rápida adaptación de los recién nacidos a las bajas temperaturas.

8-22. Las mitocondrias desempeñan otras funciones

Remoción de Ca^{2+} del citosol. Normalmente esta función está a cargo del RE (cap. 7-26). No obstante, cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta en el citosol a niveles peligrosos para la célula, se pone en acción una Ca^{2+}-ATPasa localizada en la membrana interna de las mitocondrias, que al bombear el Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial lo retira del citosol.

Síntesis de aminoácidos. A partir de determinadas moléculas intermediarias del ciclo de Krebs, en las mitocondrias de los hepatocitos tienen lugar algunos pasos metabólicos que llevan a la síntesis de varios aminoácidos.

Síntesis de esteroides. En algunas células de la corteza suprarrenal, de los ovarios y de los testículos, la mitocondria participa en la síntesis de diversos esteroides (función esteroidogénica). En primer término, el ***colesterol*** captado por las células es transportado hacia la mitocondria, donde una enzima localizada en la membrana mitocondrial interna lo convierte en ***pregnenolona***. Esta sale de la mitocondria e ingresa en el RE (cap. 7-27), donde continúa su metabolismo mediante diversas enzimas que actúan secuencialmente. En el caso de la corteza suprarrenal, dan lugar a ***desoxicorticosterona***, ***desoxicortisol*** y al andrógeno ***androstenodiona***. Los dos primeros esteroides, luego de abandonar el RE, regresan a la mitocondria, donde la 11β-hidroxilasa convierte a la desoxicorticosterona en ***corticosterona*** y al desoxicortisol en ***cortisol***. Estos glucocorticoides son producidos en las células de la zona fasciculada de la corteza suprarrenal. Posteriormente, en el citoplasma de las células de la zona glomerulosa, por acción de la 18-hidroxilasa y la 18-hidroxiesteroide oxidasa, la corticosterona se convierte en el mineralocorticoide ***aldosterona***. La mayor parte de los pasos metabólicos mencionados son oxidaciones, y en su transcurso una familia de citocromos presentes en la mitocondria —los **citocromos P450**— actúan como receptores de e^-.

Muerte celular. En el capítulo 22-4 se analiza la participación de la mitocondria en la muerte celular programada.

REPRODUCCION DE LAS MITOCONDRIAS

8-23. Las mitocondrias se reproducen para duplicar su número antes de cada división celular y para reemplazar a las que desaparecen

En las células que no se multiplican o que poseen interfases prolongadas, las mitocondrias envejecen y son degradadas por fagolisosomas (cap. 7-35); no obstante, su número se mantiene estable debido a que se forman otras mitocondrias. Además, antes que las células se dividan, todos sus componentes se duplican, incluidas las mitocondrias. A continuación describiremos el mecanismo que hace posible que las mitocondrias se fabriquen en ambas situaciones de demanda.

La reproducción de las mitocondrias no se produce a consecuencia de un ensamblaje espontáneo de los componentes que las integran sino por la división de mitocondrias preexistentes, para lo cual previamente duplican su tamaño. Este proceso se denomina **fisión binaria**. En la figura 8-16 pueden observarse las etapas de crecimiento y de división mitocondrial.

La división de las mitocondrias tiene lugar durante todo el ciclo celular, tanto en la interfase como en la mitosis. Además, no todas las mitocondrias se multiplican, y por ello algunas deben dividirse repetidas veces en el curso de un mismo ciclo para compensar la falta de división por parte de otras.

8-24. Los fosfolípidos de las membranas mitocondriales son provistos por la membrana del RE

La génesis de nuevas mitocondrias requiere que se duplique el área de su membrana interna y su membrana externa, para lo cual deben sumarse nuevos fosfolípidos a sus bicapas lipídicas. Al igual que con las otras membranas de la célula, los fosfolípidos son provistos por la membrana del RE, donde se gestan (caps. 7-9 y 7-10).

Para tomarlos del RE, la mitocondria recurre a proteínas citosólicas llamadas **intercambiadoras**, que los sustraen de la membrana del retículo y los descargan en la monocapa citosólica de la membrana mitocondrial externa del modo ilustrado en la figura 8-17. Una parte de los fosfolípidos pasa a la monocapa opuesta gracias a movimientos de "flip-flop" (cap. 3-3). Finalmente, el traspaso de fosfolípidos de la membrana externa a la membrana interna se produce a través de puntos de contacto que se crean entre ambas membranas para tal fin.

Algunos glicerofosfolípidos que llegan a la membrana mitocondrial interna experimentan modificaciones. Por ejemplo, se unen de a dos y forman difosfatidilglicerol (sección 8-11).

8-25. Algunas proteínas mitocondriales se fabrican en la matriz

La mayor parte de las proteínas de la mitocondria provienen del citosol, en tanto unas pocas se producen en el territorio del propio organoide, que cuenta con los recursos para elaborarlas.

Efectivamente, la mitocondria posee varias unidades idénticas de un **ADN circular**, a partir del cual se transcriben los genes de 13 ARNm (base para la síntesis de otras tantas proteínas), de 22 tipos de ARNt y de 2 clases de ARNr (uno correspondiente a la subunidad mayor de los ribosomas mitocondriales y otro a la subunidad menor). Todas estas moléculas se encuentran en la matriz mitocondrial; las de los ADN circulares se hallan adosadas a la membrana interna del organoide (figs. 8-9 y 8-16).

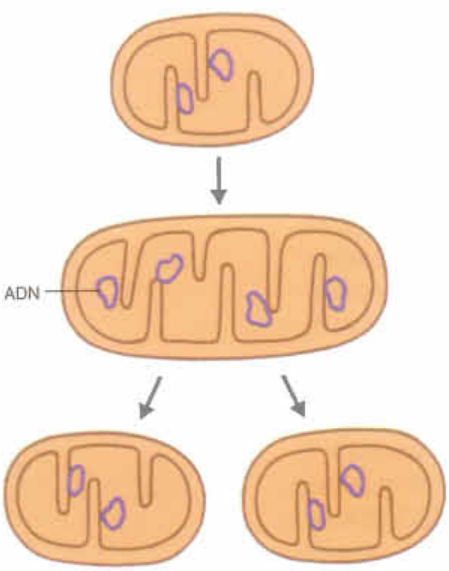


Fig. 8-16. Reproducción de las mitocondrias.

Con aminoácidos llegados desde el citosol, en los ribosomas mitocondriales se sintetizan las siguientes 13 proteínas, la mayoría pertenecientes a la cadena respiratoria: siete subunidades del complejo NADH deshidrogenasa, una del complejo b-c_1, tres del complejo citocromo oxidasa y dos subunidades de la ATP sintasa.

8-26. El ADN mitocondrial es diferente del ADN nuclear

El ADN mitocondrial presenta las siguientes particularidades que lo diferencian del ADN nuclear (fig. 8-18):

1) Es circular y carece de histonas.

2) Posee un solo origen de replicación (cap. 17-3), en el

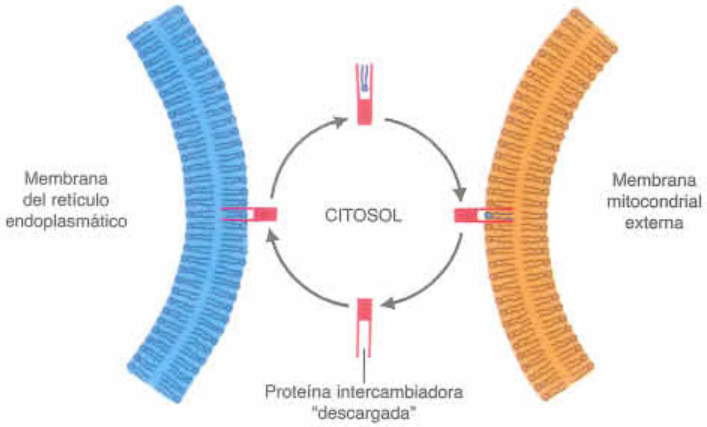


Fig. 8-17. Transferencia de fosfolípidos de la bicapa lipídica del retículo endoplasmático a la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial externa.

cual una de las cadenas hijas comienza a sintetizarse antes que la otra y lo hace a partir de un punto diferente del empleado por la segunda.

3) Es muy pequeño, pues posee 37 genes solamente. En casi todos los tipos celulares la suma de los ADN tomados de todas las mitocondrias representa no más del 1% del ADN nuclear.

4) Posee muy pocas y a la vez muy cortas secuencias no génicas, es decir, que no se transcriben.

5) Genera 22 tipos de ARNt, en lugar de los 31 que transcribe el ADN del núcleo.

6) Las dos clases de ARNr (12S y 16S) que codifica dan lugar a ribosomas que poseen un coeficiente de sedimentación de 55S, inferior al de los ribosomas de los procariotas (70S) y del citosol (80S).

7) En su código genético existen 4 codones cuyas instrucciones difieren de las de sus pares del ADN nuclear (cap. 13-4). Se trata de los codones AGA, AGG, AUA y UGA. En el ADN nuclear los dos primeros corresponden al aminoácido arginina, mientras que en el ADN mitocondrial se comportan como codones de terminación. En el ADN nuclear el codón AUA determina a la isoleucina, y en el ADN mitocondrial a la metionina. En el

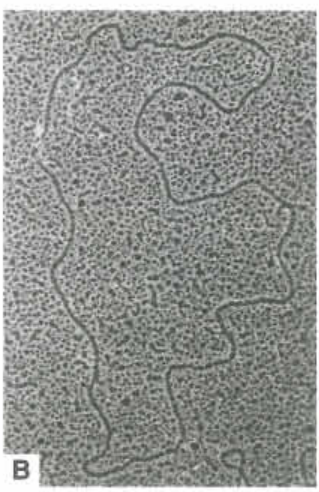


Fig. 8-18. A. ADN circular de la mitocondria humana en el que se representan los 37 genes existentes en sus dos cadenas. Se señalan los genes de los 22 ARNt (*rojo*), de los 2 ARNr (*marrón*) y de los 13 ARNm. Estos últimos corresponden a dos subunidades de la ATP sintasa (*naranja*), a siete del complejo NADH deshidrogenasa (*verde*), a una del complejo b-c_1 (*celeste*) y a tres del complejo citocromo oxidasa (*violeta*). Puede verse también el área donde se halla el origen de replicación (*grisado*). **B.** ADN mitocondrial de una célula de rata observado con la técnica de extendido y sombreado metálico. (Cortesía de B. Stevens.)

ADN nuclear el codón UGA es un codón de terminación y en el ADN mitocondrial determina al triptófano.

8) Se transcriben sus dos cadenas. Los genes de los 2 ARNr, de 14 ARNt y de 12 ARNm se localizan en una de las cadenas del ADN mitocondrial, mientras que los genes restantes, correspondientes a 8 ARNt y a un ARNm, se localizan en la otra cadena.

9) Las moléculas de ARN que transcribe el ADN se procesan mientras se sintetizan. El procesamiento comprende la remoción de partes de los ARN.

10) Como se señaló, la mitocondria posee varias copias de un mismo ADN y no dos como el ADN nuclear. Debe señalarse que las mitocondrias de cualquier individuo son de origen materno, pues todas provienen del ovocito (cap. 19-19).

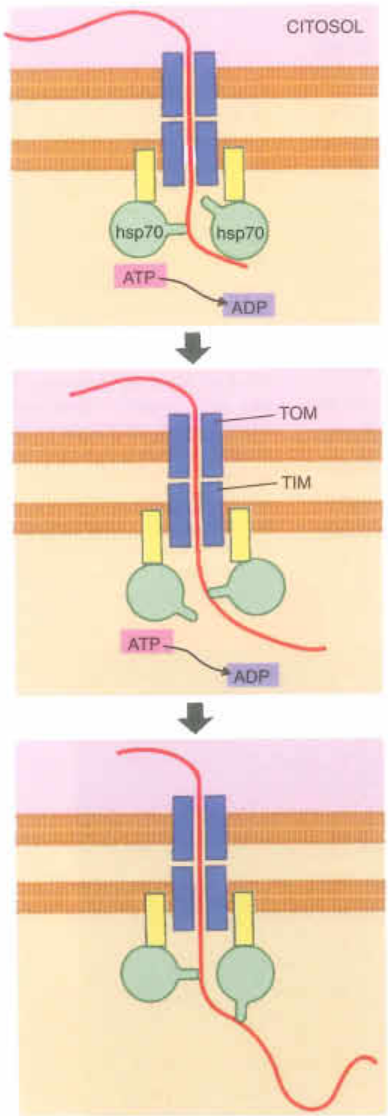


Fig. 8-19. Ingreso de las proteínas en la mitocondria a través de translocones de las membranas mitocondriales externa e interna y acción de las chaperonas hsp70 de la matriz mitocondrial.

8-27. La síntesis de las proteínas mitocondriales requiere una adecuada coordinación

Aunque la mitocondria posee ADN, ARNm, ARNt y ribosomas propios, las proteínas que fabrica son muy pocas, 13 en total. Por consiguiente, la mayor parte de las que necesita para su reproducción debe importarlas desde el citosol. Más aún, debido a esa doble procedencia se requiere una perfecta coordinación entre las actividades de los genomas mitocondrial y nuclear, a fin de que todos los componentes de la mitocondria sean producidos en las proporciones adecuadas.

Las proteínas importadas son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres (no asociados al RE). Entre las más importantes se encuentran las enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa, las responsables del ciclo de Krebs y de la β-oxidación de los ácidos grasos, muchas de las proteínas que participan en la fosforilación oxidativa, los canales iónicos y las permeasas de la membrana mitocondrial interna, la ADN polimerasa, la ARN polimerasa, las proteínas de los ribosomas mitocondriales, etcétera.

8-28. La incorporación de proteínas a las membranas y a los compartimientos mitocondriales es el resultado de un proceso complejo

Conforme surgen de los ribosomas, las proteínas mitocondriales producidas en el citosol se asocian con **chaperonas** de la familia hsp70. Estas mantienen desplegadas a las proteínas hasta que arriban a la mitocondria, a cuyo cuerpo no podrían incorporarse si llegaran plegadas (cap. 4-5).

El pasaje de las proteínas a través de las membranas externa e interna de la mitocondria es un proceso complejo. Cuando una de ellas se pone en contacto con la membrana mitocondrial externa, se desprende de las chaperonas hsp70 citosólicas, atraviesa ambas membranas y se asocia con chaperonas ligadas a la membrana mitocondrial interna. Estas chaperonas, que también pertenecen a la familia hsp70, atraen a la proteína hacia el interior de la mitocondria por un mecanismo que consume ATP, tal vez de la manera mostrada en la

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

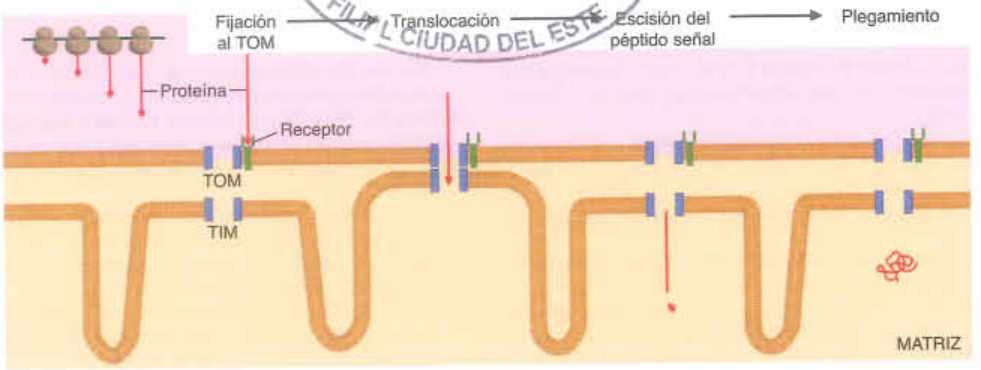


Fig. 8-20. Modo como ingresa en la matriz mitocondrial una proteína procedente del citosol.

figura 8-19. Una vez en la matriz mitocondrial, la proteína se pliega sin ayuda o con la asistencia de una chaperona de la familia hsp60 (cap. 4-5).

Las proteínas se incorporan a la mitocondria a través de los **translocones** denominados con las siglas **TOM** y **TIM** (por *translocase of the outer* y *of the inner mitochondrial membrane*), presentes en las membranas mitocondriales externa e interna, respectivamente (cap. 7-12). Como muestran las figuras 8-19 y 8-20, para que la proteínas puedan ingresar es necesario que ambos translocones estén juntos y sus luces alineadas, lo que obliga a las membranas externa e interna a acercarse mutuamente.

Todas las proteínas importadas desde el citosol incluyen en su extremo amino un **péptido señal** que las conduce hasta la mitocondria y que es reconocido por un receptor específico asociado al translocón externo (caps. 4-4 y 16-17) (tabla 4-1 y fig. 8-20). Si el paradero de la proteína es la matriz mitocondrial, apenas atraviesa los translocones pierde el péptido señal y se libera en su interior (el péptido señal es escindido por una proteasa de la matriz) (fig. 8-20). En cambio, las proteínas destinadas a las membranas externa e interna poseen señales adicionales, distintas entre sí, las cuales retienen a ambos tipos de proteínas en la membrana que corresponde.

8-29. Probablemente las mitocondrias deriven de bacterias aeróbicas

Vimos que las mitocondrias se reproducen por fisión binaria, como lo hacen las bacterias. Esta no es la única semejanza con los procariotas; se parecen también en sus formas y medidas y porque poseen varios componentes comunes. Tales semejanzas han llevado a sugerir que las mitocondrias son un producto evolutivo de bacterias aeróbicas.

Sustentan esta teoría otros supuestos. Así, se cree que las primeras células eucariotas eran anaeróbicas y que cuando la atmósfera terrestre se hizo rica en oxígeno incorporaron en sus citoplasmas bacterias aeróbicas que, tras sucesivos cambios adaptativos, se convirtieron en las actuales mitocondrias. La simbiosis les permitió a las células eucariotas aprovechar el oxígeno atmosférico, por lo que comenzaron a producir una mayor cantidad de energía a partir de la misma cantidad de alimentos. Paralelamente, la membrana plasmática de la célula eucariota quedó eximida de realizar procesos energéticos y pudo concentrarse en otras actividades, como controlar la transferencia de solutos, posibilitar la entrada y la salida de macromoléculas, recibir y emitir señales, etcétera.

BIBLIOGRAFIA

Anderson S., Barrel B., Sanger F. et al. (1981) Sequence and organization of the mitochondrial genome. Nature 290:465.

Attardi G. and Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol. 4:289.

Babcock G.T. and Wikström M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. Nature 356:301.

Bereiter-Hahn J. (1990) Behavior of mitochondria in the living cell. Int. Rev. Cytol. 122:1.

Bianchet M. et al. (1991) Mitochondrial ATP synthase. Quaternary structure of the F_1 moiety at 3.6 Å determined by X-ray diffraction analysis. J. Biol. Chem. 266:21197.

Boyer P.D. (1989) A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. FASEB J. 3:2164.

Brand M.D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. Biochem. Soc. Trans. 33:897.

Brandt U. (2006) Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). Annu. Rev. Biochem. 75:69.

Brodsky J.L. (1996) Post-translational protein translocation: not all hsp70s are created equal. TIBS 21:122.

Capaldi R.A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. Annu. Rev. Biochem. 59:569.

Clayton D.A. (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annu. Rev. Cell Biol. 7:453.

Cleves A.E. and Kelly R.B. (1996) Protein translocation: rehearsing the ABCs. Curr. Biol 6:276.

Ferguson S.J. and Sorgato M.C. (1982) Proton electrochemical gradients and energy transduction processes. Annu. Rev. Biochem. 51:185.

Finkel E. (2001) The mitochondrion: Is it central to apoptosis? Science 292:624.

Gennis R. and Ferguson-Miller S. (1995) Structure of cytochrome c oxidase, energy generator of aerobic life. Science 269:1063.

Glick B.S., Beasley E.M. and Schatz G. (1992) Protein sorting in mitochondria. TIBS 17:453.

Gray M.W. (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. Annu. Rev. Cell Biol. 5:25.

Grivell L.A. (1983) Mitochondrial DNA. Sci. Am. 248 (3):60.

Hatefi Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem. 45:1015.

Hinkle P.C., Kumar M.A., Resetar A. and Harris D.L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem. 54:1015.

Hofhaus G., Weiss H. and Leonard K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). J. Mol. Biol. 221:1027.

Klingenberg M. (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. TIBS 15:108.

Manella C.A. (1992) The "ins" and "outs" of mitochondrial membrane channels. TIBS 17:315.

Manella C.A., Marko M. and Buttle K. (1997) Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. TIBS 22:37.

Mokranjac D. and Neupert W. (2005) Protein import into mitochondria. Biochem. Soc. Trans. 33:1019.

Nicholls D. and Rial E. (1984) Brown-fat mitochondria. TIBS 9: 489.

Ostermeier C., Iwata S. and Michel H. (1996) Cytochrome c oxidase. Curr. Opin. Struc. Biol. 6:460.

Sazanov L.A. (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. Biochemistry 46:2275.

Schatz G. (1996) The protein import system of mitochondria. J. Biol. Chem. 271:31763.

Srere P.A. (1982) The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment. TIBS 5:375.

Stryer L. (1995) Biochemistry, 4th Ed. W.H. Freeman & Co, New York.

Stuart R.A. and Neupert W. (1996) Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria. TIBS 21:261.

Wallace D.C. (1992) Diseases of the mitochondrial DNA. Annu. Rev. Biochem. 61:1175.

Weber J. (2007) ATP synthase-the strucrure of the stator stalk. Trends Biochem. Sci. 32:53.

Wickner W.T. (1994) How ATP drives proteins across membranes. Science 266:1197.

Wikström M. (1989) Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. Nature 338:776.

Xia D. et al. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. Science 277:60.

Yaffe M.P. (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. Science 283:1475.

Cloroplastos
Energía celular II

9

9-1. Los plástidos son los organoides más característicos de la célula vegetal

Los **plástidos** son organoides que se encuentran exclusivamente en las células vegetales. Los más comunes y de mayor importancia biológica son los **cloroplastos** (fig. 1-7), que junto con las mitocondrias constituyen las maquinarias bioquímicas que se encargan de producir las transformaciones energéticas necesarias para mantener las funciones de las células. En el caso de los cloroplastos, atrapan la energía electromagnética derivada de la luz solar y la convierten en energía química mediante un proceso llamado **fotosíntesis**. Luego utilizan esa energía junto con el CO_2 atmosférico para sintetizar varias clases de moléculas, algunas de las cuales sirven de alimento para las mismas plantas y para los organismos heterótrofos herbívoros (cap. 1-4) (fig. 1-2).

Los cloroplastos se caracterizan por poseer pigmentos (clorofilas, carotenoides) y, como se dijo, en ellos tiene lugar la fotosíntesis. Por este proceso producen oxígeno y la mayor parte de la energía química utilizada por los organismos vivos. La vida se mantiene gracias a los cloroplastos. Sin ellos no habría plantas ni animales, ya que estos últimos se alimentan de lo producido por los vegetales; así, puede decirse que cada molécula de oxígeno usada en la respiración y cada átomo de carbono presente en sus cuerpos pasaron alguna vez por un cloroplasto.

Además de los cloroplastos existen otros plástidos con pigmentos, agrupados bajo la denominación genérica de **cromoplastos**. En los pétalos, frutos y raíces de ciertas plantas superiores hay cromoplastos amarillos o anaranjados. En general, éstos tienen menor contenido de clorofila y por lo tanto menor actividad fotosintética. El color rojo del tomate maduro se debe a la presencia de cromoplastos cuyo pigmento rojo, llamado licopeno, pertenece al grupo de los carotenoides. En las algas rojas existen cromoplastos que contienen, además de clorofila a y carotenoides, un pigmento rojo y un pigmento azul, la ficoeritrina y la ficocianina, respectivamente.

Las células vegetales contienen también plástidos incoloros. Se denominan **leucoplastos** y se encuentran tanto en las células embrionarias como en las células de los órganos de las plantas que no reciben luz. Debe señalarse que los plástidos de las células de los cotiledones y de los esbozos foliares del tallo inicialmente son incoloros, pero más tarde comienzan a acumular clorofila y adquieren el color verde característico de los cloroplastos. Sin

embargo, las células diferenciadas poseen leucoplastos verdaderos que nunca se vuelven verdes. Algunos leucoplastos —a los que se les da el nombre de **amiloplastos**— producen y acumulan gránulos de almidón. Carecen de ribosomas, tilacoides y pigmentos y son muy abundantes en las células de las raíces y de los tubérculos.

9-2. Las características de los cloroplastos varían según los tipos celulares

Los cloroplastos se localizan principalmente en las células del mesófilo, tejido que se encuentra en las hojas de las plantas superiores y en las algas. Cada célula contiene un número considerable de cloroplastos, de forma esférica, ovoide o discoidal. Su tamaño varía considerablemente, pero en promedio tienen un diámetro de 4 a 6 μm. Esta medida suele ser constante para cada tipo celular, aunque es mucho mayor en las células poliploides que en las diploides. En general, en las plantas que crecen a la sombra los cloroplastos son más grandes y más ricos en clorofila.

El número de cloroplastos se mantiene relativamente constante en los diversos vegetales. Las algas poseen a menudo un solo cloroplasto muy voluminoso. En las plantas superiores existen entre 20 y 40 por célula. En las hojas de algunas especies se ha calculado que hay alrededor de 400.000 cloroplastos por mm^2. Si su número es insuficiente, aumentan por división; si es excesivo, se reducen por degeneración.

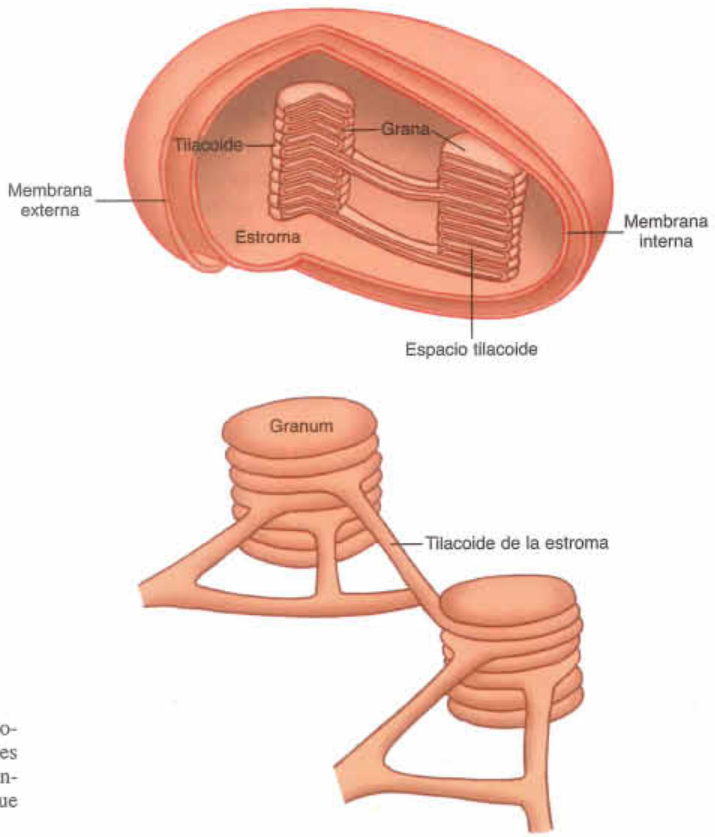


Fig. 9-1. Arriba. Esquema tridimensional del cloroplasto, con sus principales componentes. **Abajo.** Esquema tridimensional de dos grana y de tilacoides que atraviesan la estroma del cloroplasto.

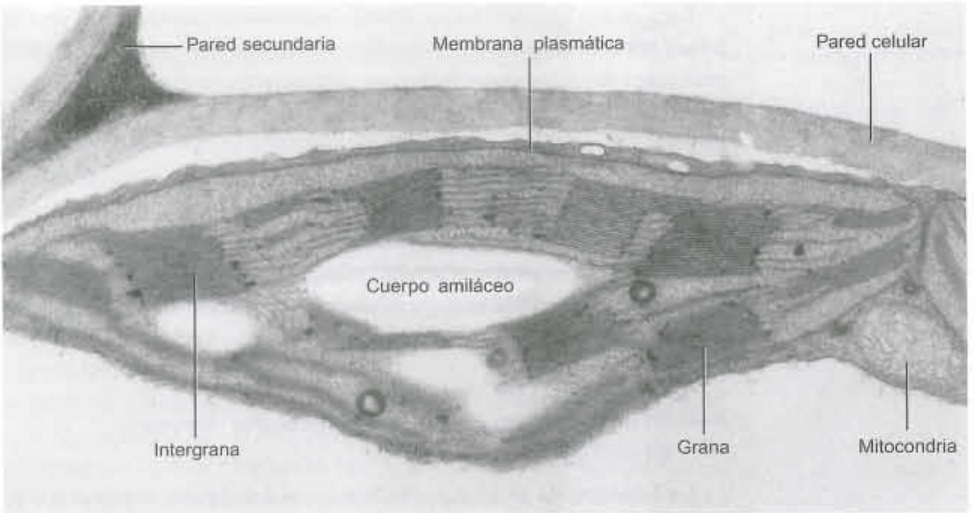


Fig. 9-2. Micrografía electrónica del cloroplasto. Se trata de un corte longitudinal que muestra los grana y los tilacoides de la estroma (intergrana). (Cortesía de M. Cresti y M. Wurtz.)

En cloroplastos aislados de espinaca se han verificado cambios de forma y volumen por acción de la luz. El volumen disminuye notablemente cuando son iluminados, aunque este efecto es reversible.

9-3. La estructura de los cloroplastos incluye la envoltura, la estroma y los tilacoides

El cloroplasto posee tres componentes principales: la envoltura, la estroma y los tilacoides (fig. 9-1).

La **envoltura** de los cloroplastos presenta ***dos membranas*** —una externa y otra interna—, a través de las cuales se producen los intercambios moleculares con el citosol. En el cloroplasto maduro —a diferencia de su predecesor— no se observa continuidad entre la membrana interna y los tilacoides. Ambas membranas carecen de clorofila, pero tienen color amarillo por la presencia de pigmentos carotenoides. Contienen solamente el 2% de las proteínas del cloroplasto.

La **estroma** representa la mayor parte del cloroplasto y en ella se encuentran inmersos los tilacoides. Está compuesta principalmente por proteínas. Contiene ADN y también ARN, que intervienen en la síntesis de algunas de las proteínas estructurales y enzimáticas del cloroplasto. Es en la estroma donde se produce la fijación del CO_2 —es decir, la producción de hidratos de carbono—, así como la síntesis de algunos ácidos grasos y proteínas.

Los **tilacoides** constituyen sacos aplanados agrupados como pilas de monedas. Cada pila de tilacoides recibe el nombre de **granum** (plural, **grana**), y a los elementos individuales que forman las pilas se los llama ***tilacoides de los grana*** o ***intergrana*** (figs. 9-1 y 9-2). Además, hay tilacoides que atraviesan la estroma y que conectan entre sí a dos grana; se los denomina ***tilacoides de la estroma*** (figs. 9-1, 9-2 y 9-3). Empero, la descripción antedicha es engañosa, pues en rigor existen tilacoides pequeños —que poseen un diámetro promedio de 1 μm (la mayoría de los tilacoides de los grana)— y tilacoides grandes y alargados, compartidos por dos grana. En éstos se distinguen tres sectores: dos extremos que aparentan ser tilacoides de los grana, y un segmento intermedio que corresponde al tilacoide de la estroma.

La pared de los tilacoides —llamada **membrana tilacoide**— es una bicapa lipídica poblada de proteínas y de otras moléculas, casi todas involucradas en las reacciones químicas de la fotosíntesis. Esta pared separa el compartimiento de los tilacoides —es decir, el **espacio tilacoide**— de la estroma. Algunas evidencias parecen indicar que, directa o indirectamente, las luces de todos los tilacoides están interconectadas, de modo que existiría un solo espacio tilacoide (fig. 9-4).

Por lo tanto, el cloroplasto tendría tres compartimientos: el intermembranoso (entre la membrana externa y la membrana interna), la estroma (entre la membrana interna y la membrana tilacoide) y el espacio tilacoide. Se verá que desde el punto de vista funcional el espacio tilacoide equivale a la matriz mitocondrial.

FOTOSINTESIS

9-4. En la fotosíntesis la energía luminica se convierte en energía quimica

La **fotosíntesis** es una de las funciones biológicas fundamentales de las células vegetales. Por medio de la **clorofila** contenida en los cloroplastos, los vegetales verdes son capaces de absorber la energía que la luz solar emite como fotones y transformarla en energía química. Esta se acumula en las uniones químicas entre los átomos de las moléculas alimenticias que se forman con el concurso del CO_2 atmosférico. En el capítulo 8-15 se analizó la fosforilación oxidativa que se cumple en la mitocondria, mediante la cual se procesa la energía contenida en las sustancias alimenticias. La fotosíntesis es, en cierta medida, un proceso inverso, de modo que los cloroplastos y las mitocondrias poseen muchas semejanzas estructurales y funcionales.

En la fotosíntesis la reacción principal es:

$$n\ CO_2 + n\ H_2O \rightarrow \text{luz-clorofila} \rightarrow (CH_2O)_n + n\ O_2, \quad (1)$$

que consiste en la combinación de CO_2 y H_2O para formar hidratos de carbono con liberación de O_2.

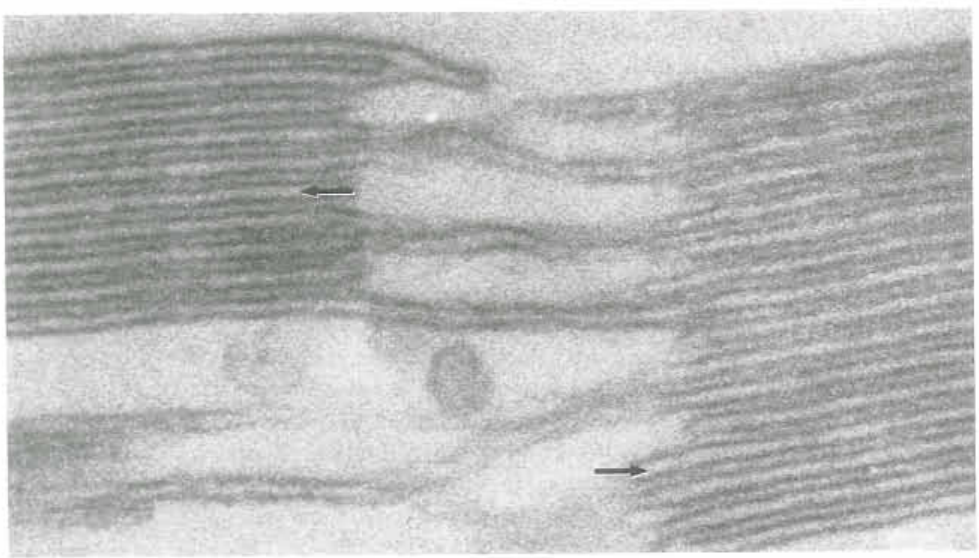


Fig. 9-3. Micrografía electrónica del cloroplasto que muestra dos grana y los tilacoides de la estroma que los conectan. Las flechas señalan la cavidad del compartimiento membranoso de los grana, es decir, el espacio tilacoide. 240.000×. (Cortesía de I. Nir y D. C. Pease.)

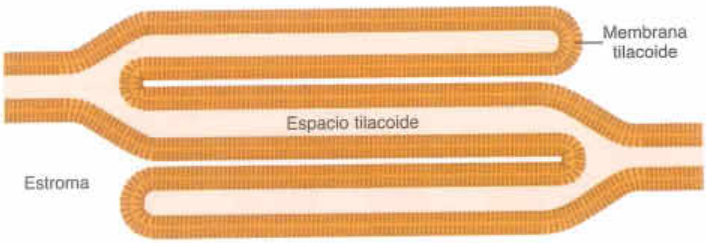


Fig. 9-4. Esquema que ilustra la continuidad del espacio tilacoide y cómo se halla separado de la estroma.

Se ha calculado que cada molécula de CO_2 de la atmósfera se incorpora a un vegetal cada 200 años, y que el O_2 del aire es renovado por las plantas cada 2.000 años. Sin plantas no existiría O_2 en la atmósfera terrestre y la vida sería casi imposible.

Es importante señalar que en la reacción (1) el H_2O es el dador de H_2 (e^- y H^+) y de O_2, mientras que el CO_2 actúa como aceptador de H_2.

Los hidratos de carbono formados por la fotosíntesis son sacáridos solubles que circulan por los distintos tejidos de la planta o se acumulan como **granos de almidón** en los cloroplastos (fig. 9-2) o, más frecuentemente, en los amiloplastos. Además, como corolario de diversas reacciones que involucran la participación de diferentes sistemas enzimáticos, el material surgido de la fotosíntesis puede convertirse —por lo general fuera de los plástidos— en un polisacárido estructural o en lípidos o proteínas de la planta.

9-5. La clorofila es un pigmento capaz de ser excitado por la luz

La luz visible corresponde a una pequeña porción del espectro de radiación electromagnética total y comprende las longitudes de onda de 400 a 700 nm. La energía contenida en esas longitudes es transmitida mediante unidades denominadas **fotones**. Un fotón contiene un cuanto de energía. Esto se expresa con la ecuación enunciada por Max Planck en el año 1900:

$$E = \frac{hc}{\lambda},$$

donde h es la constante de Planck ($1{,}585 \times 10^{34}$ cal/seg), c es la velocidad de la luz (3×10^{10} cm/seg) y λ es la longitud de onda de la radiación. De esta ecuación se deduce que los fotones con longitudes de onda más cortas tienen mayor energía.

Los pigmentos como la clorofila están particularmente adaptados para ser excitados por la luz. Así, los fotones que absorbe la clorofila excitan a ciertos electrones, que al desplazarse de la órbita de sus átomos adquieren un nivel de energía mayor, es decir, un elevado potencial de transferencia. Esta energía puede disiparse en forma de calor o de radiación lumínica (fluorescencia), ser transferida de una molécula a otra por resonancia, o convertirse en energía química. En la fotosíntesis predominan los dos últimos procesos.

9-6. La fotosíntesis comprende reacciones fotoquímicas y reacciones en la oscuridad

La fotosíntesis comprende una serie compleja de reacciones, algunas de las cuales tienen lugar exclusivamente en presencia de luz y otras se producen en la oscuridad (aunque éstas también pueden ocurrir en presencia de

luz). Se las llama, respectivamente, reacciones lumínicas (o fotoquímicas) y reacciones en la oscuridad.

En las fases finales de las **reacciones fotoquímicas** se forma NADPH (a partir de $NADP^+$, e^- y H^+) y ATP (a partir de ADP y fosfato). Ambos procesos remedan a los que ocurren normalmente en las mitocondrias. En la fotosíntesis la formación de ATP se conoce con el nombre de fotofosforilación.

Debe recordarse que en la fosforilación oxidativa —en las mitocondrias— el flujo de electrones viaja desde la NADH (o la $FADH_2$) hacia el O_2 y se genera H_2O (cap. 8-17). En la fotosíntesis ocurre el fenómeno opuesto, pues los electrones fluyen desde el H_2O —previamente disociada en O_2, H^+ y e^-— hasta la NADPH.

Las **reacciones en la oscuridad** completan el ciclo fotosintético. En su transcurso la energía contenida en los ATP y en las NADPH es aprovechada por la célula vegetal para elaborar diversas moléculas alimenticias con el CO_2 tomado de la atmósfera.

9-7. Existen varias clases de clorofilas

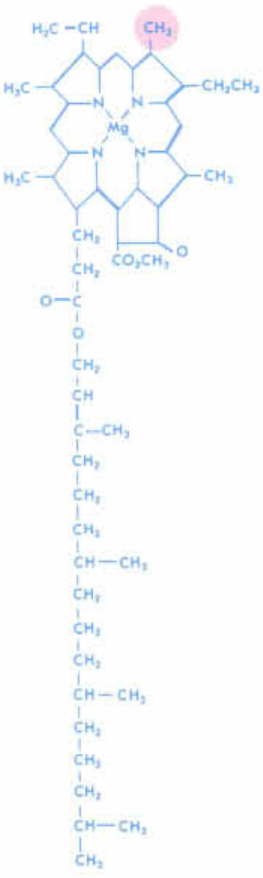
Las reacciones fotoquímicas se producen en la membrana tilacoide, cuya bicapa lipídica contiene una serie de complejos proteicos transmembranosos, algunos asociados a pigmentos. Estos son los encargados de capturar la energía lumínica solar. Existen varios tipos, cada uno de ellos capaz de absorber una gama particular de longitudes de onda del espectro lumínico.

Entre los pigmentos se destacan las **clorofilas**, moléculas asimétricas que contienen una cabeza hidrofílica integrada por cuatro anillos pirrólicos unidos por un átomo de magnesio, y una cola hidrofílica (fitol) ligada a uno de los anillos (fig. 9-5).

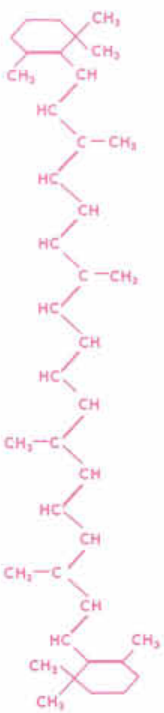
Otros pigmentos presentes en la membrana tilacoide son los **carotenoides** (xantófilas y carotenos) (fig. 9-5), que quedan ocultos por el color verde de la clorofila. Cuando en otoño ésta disminuye se ponen de manifiesto los colores amarillos, anaranjados y rojos de los carotenoides.

Existen dos clases de clorofila, identificadas con las letras a y b. En la ***clorofila b***, un grupo –CHO reemplaza a un $-CH_3$ de la clorofila a (marcado con un círculo en la figura 9-5). Por otra parte, hay varias clases de ***clorofila a***, caracterizadas por sus composiciones químicas, sus espectros de absorción de la luz y sus funciones. Se destacan tres: una muy abundante, encargada de captar la energía lumínica, y otras dos especiales —menos numerosas—, llamadas P_{680} y P_{700} (*P* por pigmento; el número identifica la longitud de onda que cada pigmento absorbe más eficientemente).

Fig. 9-5. Estructura química de la clorofila a (obsérvese el grupo CH_3 con un círculo) y del β-caroteno.



Clorofila a



β-Caroteno

9-8. En la membrana de los tilacoides se encuentran los complejos moleculares responsables de las reacciones fotoquímicas

Así como en la membrana interna de las mitocondrias hay cadenas transportadoras de electrones que dan lugar a la fosforilación oxidativa, en la membrana tilacoide de los cloroplastos también hay **cadenas de complejos moleculares**, que

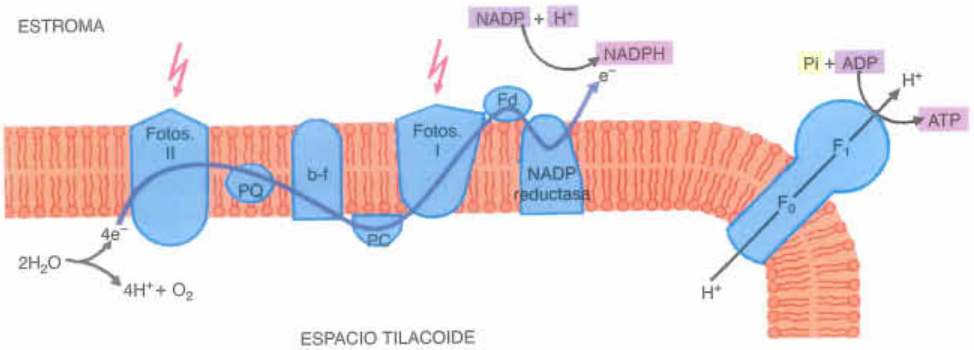


Fig. 9-6. Estructura molecular de la membrana tilacoide. La línea gruesa marca el flujo de electrones a través de una cadena de complejos moleculares. La energía lumínica es captada por el fotosistema II. Se produce la fotólisis del H_2O en el interior del tilacoide y los electrones son transmitidos a la plastoquinona (*PQ*). De allí pasan al complejo b-f y luego a la plastocianina (*PC*). Esta los transfiere al fotosistema I, que absorbe luz. Luego los electrones son transportados a la ferredoxina (*Fd*) y a la NADP reductasa, que reduce la $NADP^+$ a NADPH. La acumulación de protones (H^+) en el interior del tilacoide crea un gradiente con respecto a la estroma, de modo que los H^+ salen a través de la ATP sintasa y se produce ATP. (Cortesía de L. Bogorad; modificado.)

aquí son responsables de las reacciones fotoquímicas. Cada una de las cadenas está integrada por los siguientes eslabones, los cuales serán mencionados en el orden en que se activan (fig. 9-6).

Fotosistema II. Es un complejo molecular que posee dos sectores claramente definidos, la ***antena***, que da hacia la estroma y se encarga de capturar la luz, y el ***centro de reacción***, que da hacia el espacio tilacoide. La antena ha sido comparada con un embudo y su pared se compone de agregados de proteínas y pigmentos, especialmente de clorofila a, clorofila b y carotenoides. Por su parte, el centro de reacción contiene varias proteínas asociadas a moléculas de clorofila de tipo P_{680}.

Complejo b-f. Este complejo contiene una proteína de 17 kDa asociada a los citocromos b y f, y una proteína con un centro Fe-S.

Fotosistema I. Es un complejo molecular que, como el fotosistema II, posee una ***antena*** captadora de energía lumínica, integrada por proteínas, clorofila a, clorofila b y carotenoides, y un ***centro de reacción***, compuesto por proteínas y moléculas de clorofila de tipo P_{700}.

NADP reductasa. Este complejo reduce a la $NADP^+$ tomada de la estroma y la convierte en NADPH. Los H^+ necesarios para la reducción pertenecen a la estroma.

Como se observa en la figura 9-6, entre estos complejos se encuentran varias moléculas intermediarias: 1) la **plastoquinona**, entre el fotosistema II y el complejo b-f (equivale a la ubiquinona de las mitocondrias); 2) una pequeña proteína llamada **plastocianina**, entre el complejo b-f y el fotosistema I, y 3) la **ferredoxina**, entre el fotosistema I y la NADP reductasa.

9-9. La membrana de los tilacoides posee ATP sintasa

En las inmediaciones de las cadenas responsables de las reacciones fotoquímicas se encuentra la **ATP sintasa**, la cual —como en la mitocondria— posee una porción transmembranosa F_0, por la que pasan protones, y una porción F_1, que genera ATP a partir de ADP y fosfato (cap. 8-16). La porción F_1 da hacia la estroma del cloroplasto (fig. 9-6).

9-10. Los fotones excitan a las clorofilas de los fotosistemas II y I

Cuando un fotón excita a una molécula de clorofila, uno de los electrones de esta última es sacado de su órbita molecular para ser transferido a otra de mayor energía.

En el caso de las clorofilas situadas en la antena del fotosistema II, la ener-

gía del electrón energizado es transferida por resonancia a uno de los electrones de la clorofila P_{680}, localizada, como vimos, en el centro de reacción. El nuevo electrón energizado abandona el fotosistema II y pasa al siguiente eslabón de la cadena de reacciones fotoquímicas, la plastoquinona. Mientras tanto, mediante una reacción química no muy bien comprendida (en la que intervienen átomos de manganeso), dos moléculas de H_2O situadas en el espacio tilacoide son escindidas y generan 4 H^+, 4 e^- y una molécula de O_2. Cada uno de estos electrones pasa al centro de reacción del fotosistema II y reemplaza al salido de la clorofila P_{680}, transferido como vimos a la plastoquinona.

A continuación, el e^- pasa de la plastoquinona al complejo b-f, donde parte de su energía es utilizada para transportar un H^+ hacia el espacio tilacoide en contra del gradiente electroquímico (este H^+ se suma a los generados por la escisión del H_2O). El e^-, con un potencial energético menor, pasa del complejo b-f a la plastocianina y de ésta al fotosistema I. Para explicar su destino, veamos las reacciones que acontecen en el fotosistema I.

Por acción de la luz ocurren procesos equivalentes a los registrados en el fotosistema II, con las siguientes particularidades: 1) el e^- energizado en el centro de reacción corresponde a la clorofila P_{700} (no a la P_{680}); 2) este e^- es transferido a la ferredoxina (no a la plastoquinona) y es reemplazado por el electrón de bajo potencial energético proveniente de la plastocianina (no de la escisión del H_2O).

El e^- transferido a la ferredoxina, que como acabamos de ver se ha revitalizado considerablemente, deja a esa molécula transportadora e ingresa en la NADP reductasa, donde parte de su energía es utilizada para reducir una $NADP^+$ a NADPH en la cara de la membrana tilacoide que da a la estroma. En este proceso se utiliza un H^+ tomado de la estroma.

El último paso de las reacciones fotoquímicas corresponde a la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, es decir, a la **fotofosforilación**. Esta tiene lugar en la ATP sintasa, que por su porción F_0 permite el traslado pasivo de los H^+ desde el espacio tilacoide hacia la estroma. Durante ese pasaje la energía protonicomotora contenida en los H^+ es cedida a la porción F_1 de la ATP sintasa. Finalmente, la ATP sintasa utiliza la energía para sintetizar ATP (fig. 9-6).

Mediante la fotofosforilación los vegetales verdes pueden producir una cantidad de ATP 30 veces mayor que la obtenida en sus mitocondrias. Por otra parte, las células vegetales poseen muchos más cloroplastos que mitocondrias.

Se requieren 8 fotones para liberar 2 moléculas de O_2 (más 8 e^- y 8 H^+) del H_2O. La energía de esos fotones, transferida a los e^-, al alcanzar éstos la NADP reductasa genera 2 NADPH, mientras que el gradiente de H^+ —consecuencia también de la energía cedida por los electrones— posibilita la síntesis de 3 ATP.

9-11. Las reacciones en la oscuridad tienen lugar en la estroma del cloroplasto

En las reacciones fotosintéticas que tienen lugar en la oscuridad, las moléculas de ATP y NADPH —producidas por las reacciones fotoquímicas— proporcionan la energía necesaria para sintetizar hidratos de carbono a partir de CO_2 y H_2O. Tal síntesis se produce en la estroma del cloroplasto mediante una serie de reacciones químicas agrupadas bajo el nombre de **ciclo de Calvin** o **ciclo C_3**, en las que intervienen varias enzimas localizadas en la estroma.

Como puede observarse en la figura 9-7, la reacción inicial por la cual ingresan el CO_2 y el H_2O al ciclo de Calvin es catalizada por la enzima ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa. Se trata de una enzima de gran tamaño (500 kDa) que se calcula que representa aproximadamente la mitad de las proteínas de la estroma.

Por la acción de esta enzima, 6 ribulosas 1,5-difosfato (son pentosas) se combinan con 6 CO_2 y se producen 12 moléculas de 3-fosfoglicerato. A continuación, estas 12 triosas son fosforiladas con fosfatos provistos por otros tantos ATP, lo cual genera 12 moléculas de 1,3-difosfoglicerato. Cada una de estas moléculas, de tres carbonos, pierde un fósforo y tiene la capacidad de aceptar H^+ y e^- de la NADPH, por lo que se convierte en 3-fosfogliceraldehído. Dos de las 12 moléculas de 3-fosfogliceraldehído abandonan el ciclo y se convierten en la materia prima a partir de la cual —mediante enzimas específicas— se sintetizan los monosacáridos, los ácidos grasos y los aminoácidos que forman las moléculas estructurales y alimenticias de la célula vegetal. Por su parte, las restantes 10 moléculas de 3-fosfogliceraldehído son reducidas a 6 moléculas de ribulosa 1,5-difosfato. Estas son fosforiladas (con fosfatos aportados por otros tantos ATP) a 6 ribulosas 1,5-difosfato, con las cuales se inicia —mientras haya CO_2— otra vuelta del ciclo de Calvin.

9-12. La fotosíntesis genera agua, oxígeno y hexosas

El balance químico de la fotosíntesis es:

$$6\,CO_2 + 12\,H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 + 6\,H_2O,$$

que representa una acumulación de 686.000 calorías por mol. Esta energía es proporcionada por 12 moléculas de NADPH y 18 de ATP, que contienen 750.000 calorías. Así, la eficiencia alcanzada por el ciclo fotosintético llega al 90%.

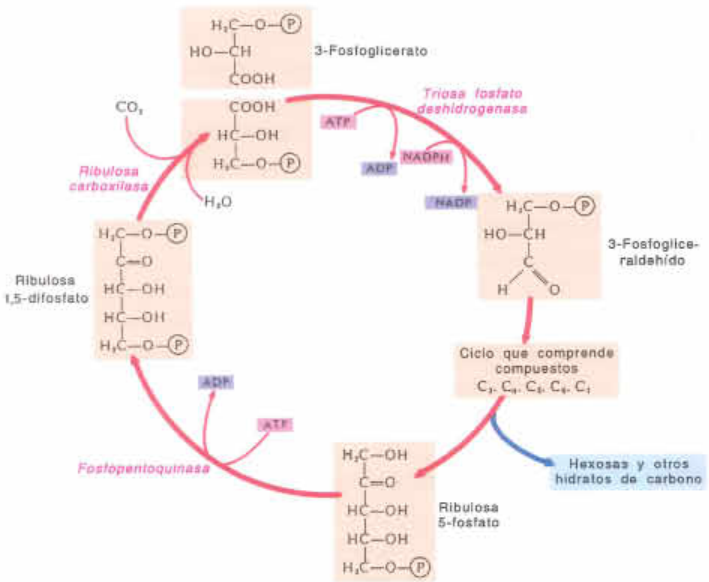


Fig. 9-7. Ciclo de Calvin (o del C_3) de la fotosíntesis, en el que se reduce CO_2 y se sintetizan hidratos de carbono.

Como hemos visto, los fotones absorbidos por la clorofila y otros pigmentos primero son convertidos en energía química bajo la forma de ATP y NADPH. Durante esta fase fotoquímica el H_2O pierde su O_2, el cual se libera hacia la atmósfera como un producto secundario. La reducción del CO_2 se produce en la oscuridad (no necesariamente), siempre que haya ATP y NADPH. Los productos de esta fase son hexosas, a partir de las cuales, en otros lugares de la célula, se generan diversas clases de hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

9-13. En las plantas tropicales tiene lugar un ciclo C_4

El ciclo de Calvin se produce en los vegetales superiores, pero en algunas células de plantas tropicales existe un ciclo cuyo producto no es el 3-fosfoglicerato sino una molécula de 4 carbonos, el oxalacetato. Una de las primeras reacciones de este ciclo consiste en la unión del CO_2 con una molécula de tres carbonos, el fosfoenolpiruvato. La enzima actuante es la fosfoenolpiruvato carboxilasa y el producto es el citado oxalacetato. Este se convierte en malato, que se dirige a las células de la planta que cuentan con ciclo de Calvin. En ellas el malato pierde un CO_2 —que ingresa en el ciclo de Calvin— y se transforma en piruvato. Este compuesto de tres carbonos retorna a las primeras células, donde se convierte en fosfoenolpiruvato y da inicio a un nuevo ciclo C_4.

BIOGENESIS DE LOS CLOROPLASTOS

9-14. Los plástidos se desarrollan a partir de proplástidos

Los plástidos se desarrollan a partir de estructuras precursoras llamadas **proplástidos**, que se encuentran en las células vegetales no diferenciadas. Según el tipo celular, los proplástidos se convierten en leucoplastos —exentos de pigmentos— o en cromoplastos, entre los cuales se encuentran los cloroplastos. El desarrollo de estos últimos se ilustra en la figura 9-8.

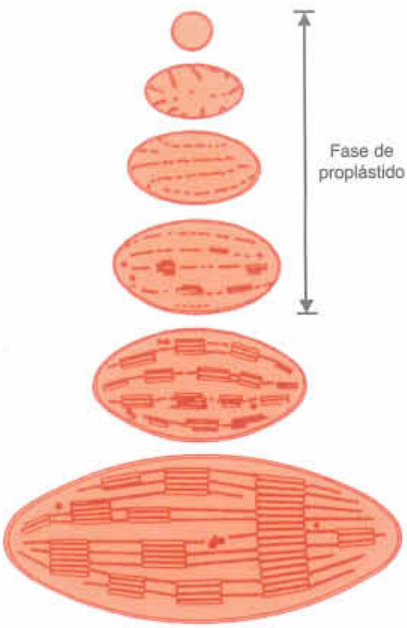


Fig. 9-8. Nacimiento y desarrollo de los plástidos en presencia de luz.

La primera estructura que aparece es el citado proplástido, de forma discoidal, con un diámetro de alrededor de 1 μm y una pared integrada por dos membranas. En presencia de luz, la membrana interna del proplástido crece y emite vesículas —en dirección de la estroma—, que luego se transforman en sacos aplanados. Estos son los futuros tilacoides, que en algunas regiones se apilan apretadamente hasta formar los grana. En el cloroplasto maduro los tilacoides ya no se hallan conectados a la membrana interna, pero los grana quedan unidos entre sí por los tilacoides de la estroma.

Si se coloca una planta en un medio poco iluminado se produce un fenómeno denominado **etiolación**, en el cual las hojas pierden su color verde y las membranas de los tilacoides se desorganizan. El agregado de éstas da lugar a los ***cuerpos prolamelares***, en los que las membranas adquieren una disposición en forma de enrejado. En los bordes de estos cuerpos aparecen adheridas membranas de tilacoides jóvenes, que carecen de actividad fotosintética.

El cloroplasto, tras esta conversión de los tilacoides, cambia su nombre por el de **etioplasto**. Una vez que las plantas etiola-

das son expuestas a la luz, los tilacoides reaparecen y las membranas del material prolamelar son utilizadas para su organización.

9-15. El cloroplasto se comporta como un organoide semiautónomo

Del mismo modo que las mitocondrias, los proplástidos y los cloroplastos se multiplican por **fisión binaria** (cap. 8-23), proceso que exige el crecimiento de proplástidos y cloroplastos preexistentes, los cuales deben duplicar su tamaño. Como es obvio, este crecimiento, lo mismo que el experimentado por los proplástidos en vías de convertirse en cloroplastos maduros, requiere que se sinteticen los componentes proteicos normales del organoide. En tal síntesis intervienen dos sistemas genéticos, uno propio del cloroplasto y el nuclear.

Los cloroplastos contienen ADN, ARN y los demás componentes que intervienen en la síntesis proteica. Sin embargo, la mayoría de sus proteínas provienen del citosol, de modo que son codificadas por genes nucleares. Como se ve, los cloroplastos son semiautónomos y dependen de la cooperación de dos sistemas genéticos, uno propio y exclusivo del organoide y otro perteneciente a toda la célula.

Los cloroplastos poseen un **ADN circular** de alrededor de 45 μm de largo y cerca de 135.000 pares de bases (se conoce la secuencia de la mayoría de sus genes). Además contienen ribosomas pequeños, que representan hasta un 50% de los ribosomas totales de las células fotosintéticas. Se estima que alrededor del 10% de las proteínas del cloroplasto se sintetizan en el organoide y que las restantes —es decir, la gran mayoría— son tomadas del citosol.

Una de las enzimas que participa en la elaboración de sacáridos a partir del CO_2 —la ***ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa*** (fig. 9-7)— representa cerca del 50% de las proteínas solubles totales que se encuentran en los cloroplastos, por lo que podría ser la proteína más abundante de la naturaleza. Posee dos subunidades, una de alto peso molecular (de alrededor de 400 kDa) y otra más pequeña (de unos 100 kDa).

La subunidad mayor es codificada por genes del ADN cloroplástico, mientras que la menor es codificada por genes nucleares (fig. 9-9). Esta última es sintetizada en el citosol (en ribosomas libres) bajo la forma de una molécula precursora, la cual ingresa en la estroma del cloroplasto y allí es clivada hasta alcanzar su tamaño definitivo. La envoltura del cloroplasto posee receptores que reconocen a los péptidos señal de las proteínas que deben ser incorporadas al organoide. En el caso de la subunidad menor de la ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa, luego de ingresar en el cloroplasto, su péptido señal es escindido por una proteasa presente en la envoltura del organoide y la subunidad es liberada en la estroma.

La figura 9-9 resume un modelo que explica la síntesis de las dos subunidades de la ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa en proporciones equimoleculares. El modelo sugiere que la subunidad menor controla el ritmo sintético de la subunidad mayor, con la que luego se asocia para formar la enzima activa.

9-16. El cloroplasto derivaría de una simbiosis

El cloroplasto sería el resultado de una simbiosis entre un microorganismo autótrofo (una bacteria) susceptible de capturar energía lumínica y una célula huésped heterótrofa (eucariota). Aunque esta hipótesis simbiótica es atractiva,

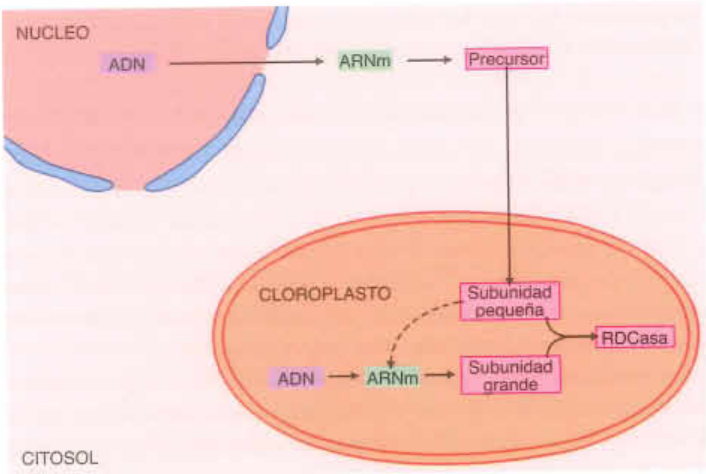


Fig. 9-9. Modelo propuesto para la síntesis de la enzima ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa (*RDCasa*). (De P. E. Highfield y R. J. Ellis.)

vimos que el cloroplasto posee en su ADN una cantidad de información genética que sólo le permite codificar el 10% de sus proteínas, además de los ARN ribosómicos, mensajeros y de transferencia utilizados en la síntesis de éstas. Igual que en la mitocondria (cap. 8-25), la mayoría de los componentes del cloroplasto se elaboran bajo la dependencia de genes nucleares.

BIBLIOGRAFIA

Anderson J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. Annu. Rev. Plant Physiol. 37:93.

Barber J. (1987) Photosynthetic reaction centers: a common link. TIBS 12:321.

Bjorkman O. and Berry J. (1973) High-efficiency photosynthesis. Sci. Am. 229 (4):80.

Cramer W.A., Widger W.R., Hermann R.G. and Trebst A. (1985) Topography and function of thylakoid membrane proteins. TIBS 10:125.

Fromm P. (1996) Structure and function of photosystem I. Curr. Opin. Struc. Biol. 6:473.

Iwata S. and Barber J. (2004) Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving center. Curr. Opin. Struct. Biol. 14:447.

Knaff D.B. (1989) Structure and regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. TIBS 14:159.

Krauss N. et al. (1993) Three-dimensional structure of system I of photosyntesis at Å resolution. Nature 361:326.

Prince R.C. (1996) Photosynthesis: the Z-scheme revised. TIBS 21: 121.

Soll J. and Schleiff E. (2004) Protein import into chloroplasts. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5:198.

Stowell M.H.B. et al. (1997) Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer. Science 276:812.

Stryer L. (1988) Biochemistry, 3rd Ed. W.H. Freeman & Co, New York.

Youvan D. and Marrs B.L. (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. Sci. Am. 256:42.

Peroxisomas
Destoxificación celular

10

10-1. Los peroxisomas contienen enzimas oxidativas

Los **peroxisomas** son organoides que se encuentran en todas las células; su forma es ovoide y están limitados por una sola membrana (figs. 7-6 y 10-1). Poseen un diámetro medio de 0,6 μm, y su número varía entre 70 y 100 por célula, aunque en las células hepáticas y renales suelen ser mucho más numerosos.

Los peroxisomas contienen **catalasa** y **enzimas oxidativas**. Cumplen variadas funciones metabólicas y su nombre se debe a que son capaces de formar y descomponer ***peróxido de hidrógeno*** (H_2O_2). En conjunto, las enzimas encontradas en los peroxisomas son alrededor de 40.

Existen muchas clases de peroxisomas, los cuales se diferencian entre sí por la enzima o el conjunto de enzimas presentes en su interior. Debe señalarse que cada tipo celular posee peroxisomas que contienen una enzima determinada o una variedad particular de enzimas.

Entre las enzimas oxidativas más comunes detectadas en los peroxisomas se encuentran la D-aminoácido oxidasa, la urato oxidasa y las responsables de la β-oxidación de los ácidos grasos (cap. 8-8). Los peroxisomas que contienen urato oxidasa exhiben un pequeño cuerpo cristalino compuesto por múltiples cristalitos.

Con excepción de la catalasa —que convierte al H_2O_2 en H_2O y O_2—, las restantes enzimas oxidan a sus sustratos, representados por aminoácidos, purinas (adenina, guanina), uratos, ácido úrico, ácidos grasos, etcétera.

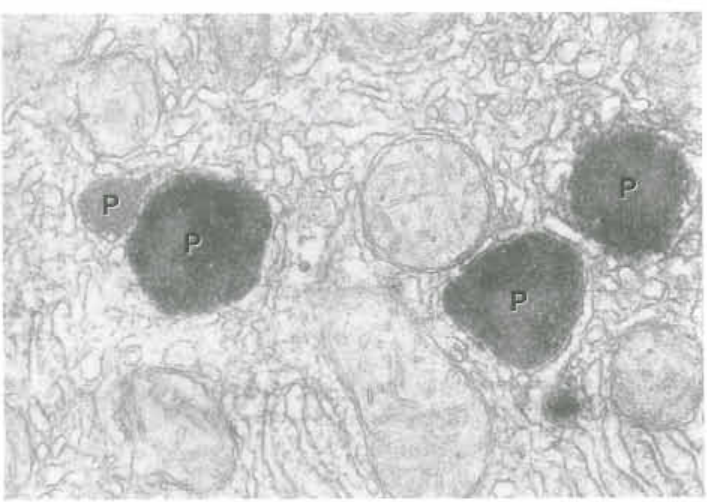


Fig. 10-1. Micrografía electrónica de una célula hepática coloreada inmunocitoquímicamente para localizar la catalasa en los peroxisomas (*P*). Se observan varias mitocondrias. 30.000×. (Cortesía de H. F. Fahimi y S. Yokota.)

A diferencia de lo que sucede en las mitocondrias —donde las oxidaciones producen energía química (ATP)—, en los peroxisomas las oxidaciones generan energía térmica. No obstante, la β-oxidación de los ácidos grasos conduce finalmente a la formación de ATP, ya que los grupos acetilo que se producen en los peroxisomas se transfieren a las mitocondrias e ingresan en el ciclo de Krebs. Es necesario advertir que solamente una pequeña proporción de los ácidos grasos celulares es oxidada en los peroxisomas (en el capítulo 8-8 se señaló que esta función se cumple principalmente en las mitocondrias).

10-2. En los peroxisomas se genera H_2O_2, que es neutralizado por la catalasa

La oxidación de sustratos en los peroxisomas tiene como consecuencia la formación de H_2O_2, una molécula sumamente tóxica para la célula. En la sección anterior dijimos que la enzima encargada de neutralizar al H_2O_2 es la **catalasa**, que lo degrada mediante la siguiente reacción:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2\ H_2O + O_2$$

10-3. La catalasa también degrada al H_2O_2 producido fuera de los peroxisomas

La catalasa no sólo degrada al H_2O_2 producido en los peroxisomas sino también al que se genera en otros puntos de la célula, particularmente las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el citosol. En estos sitios las oxidaciones dan lugar a pequeñas cantidades de **aniones superóxido** (O_2^-), conocidos comúnmente con el nombre de ***radicales libres***. Estos radicales son muy reactivos, y una enzima, la superóxido dismutasa, se encarga de eliminarlos mediante la siguiente reacción:

$$2\ (O_2^-) + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{superóxido dismutasa}} H_2O_2 + O_2$$

A su turno, en los peroxisomas este H_2O_2 es convertido en H_2O y O_2 por acción de la catalasa. Se sospecha que el anión superóxido remueve los sulfhidrilos de las proteínas. Además, produce alteraciones en la bicapa lipídica de las membranas celulares y mutaciones génicas, lo que podría acelerar el envejecimiento orgánico y facilitar la aparición de cuadros cancerígenos.

10-4. La catalasa utiliza al H_2O_2 para neutralizar las sustancias tóxicas de la célula

En las células hepáticas y renales la catalasa actúa también como una enzima destoxificante. Para ello, ante la presencia de ciertos tóxicos, en lugar de convertir al H_2O_2 en H_2O y O_2, utiliza al H_2O_2 para oxidarlos y neutralizar su toxicidad. La reacción puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$H_2O_2 + TH_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2\ H_2O + T$$

La sigla TH_2 simboliza a la sustancia tóxica, y la T a la misma sustancia después de su oxidación. Ejemplos de sustancias tóxicas neutralizadas por este mecanismo son los fenoles, el formaldehído, el ácido fórmico y el etanol.

Parte del etanol ingerido con las bebidas alcohólicas es neutralizado por la catalasa de los peroxisomas, que lo oxida a acetaldehído.

10-5. Los peroxisomas se reproducen por fisión binaria

Se cree que los peroxisomas tienen una vida media de 5 a 6 días, al cabo de los cuales son eliminados por autofagosomas. Su número se restablece del mismo modo como lo hacen las mitocondrias (cap. 8-23), mediante la duplicación de peroxisomas "jóvenes", es decir, por **fisión binaria** de peroxisomas preexistentes (fig. 10-2). Como es obvio, antes de la mitosis se produce la duplicación de todos los peroxisomas de la célula. Para que la fisión binaria se concrete, previamente deben duplicarse las estructuras que integran el peroxisoma.

Así, la bicapa lipídica de su membrana crece por el agregado de fosfolípidos extraídos del RE, los cuales son transferidos de una membrana a otra por **proteínas intercambiadoras** (fig. 8-17).

Por su parte, las proteínas que se incorporan a la membrana o a la matriz del peroxisoma provienen de ribosomas libres en el citosol, e ingresan en el organoide una vez que se han plegado (cap. 4-5). Son conducidas selectivamente al peroxisoma porque poseen, cerca del extremo carboxilo, un péptido señal específico compuesto por tres aminoácidos (serina, lisina, leucina) (cap. 4-4) (tabla 4-1). El péptido señal es reconocido por un receptor proteico que reside en el citosol, el cual, a su vez, interactúa con una proteína específica de la membrana del organoide.

Los canales de la membrana del peroxisoma que permiten el paso de las proteínas no han sido identificados.

La mutación del gen que codifica la síntesis de una proteína perteneciente a la membrana de los peroxisomas —involucrada aparentemente en la incorporación de las enzimas oxidativas a la matriz— genera un cuadro llamado ***síndrome de Zellweger***, caracterizado por la presencia de peroxisomas "vacíos". Los pacientes mueren antes del primer año de vida.

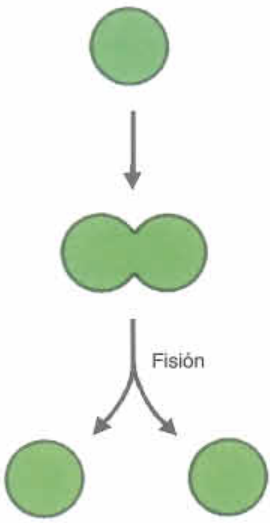


Fig. 10-2. Reproducción de los peroxisomas.

LOS PEROXISOMAS EN LAS CELULAS VEGETALES

10-6. Los glioxisomas son peroxisomas vegetales relacionados con el metabolismo de los triacilgliceroles

La germinación de las semillas suele necesitar de la degradación de lípidos acumulados en el endosperma (cap. 19-20). En este proceso intervienen los **glioxisomas**, que son peroxisomas relacionados con el metabolismo de los triacilgliceroles.

El glioxisoma posee enzimas que transforman a los ácidos grasos de la semilla en hidratos de carbono por la vía del **ciclo del glioxilato**, que es una versión diferente del ciclo de Krebs (fig. 10-3). La ecuación que se verifica al cabo de sus reacciones es:

$$2 \text{ acetil CoA} \longrightarrow \text{succinato} + 2\ H^+ + 2 \text{ CoA}$$

La diferencia con el ciclo de Krebs radica en que el ciclo del glioxilato requiere dos moléculas de acetil CoA y utiliza dos enzimas exclusivas, la isocitrato liasa y la malato sintasa. Sus otras tres enzimas, la aconitasa, la malato deshidrogenasa y la citrato sintasa, corresponden también al ciclo de Krebs (fig. 8-11).

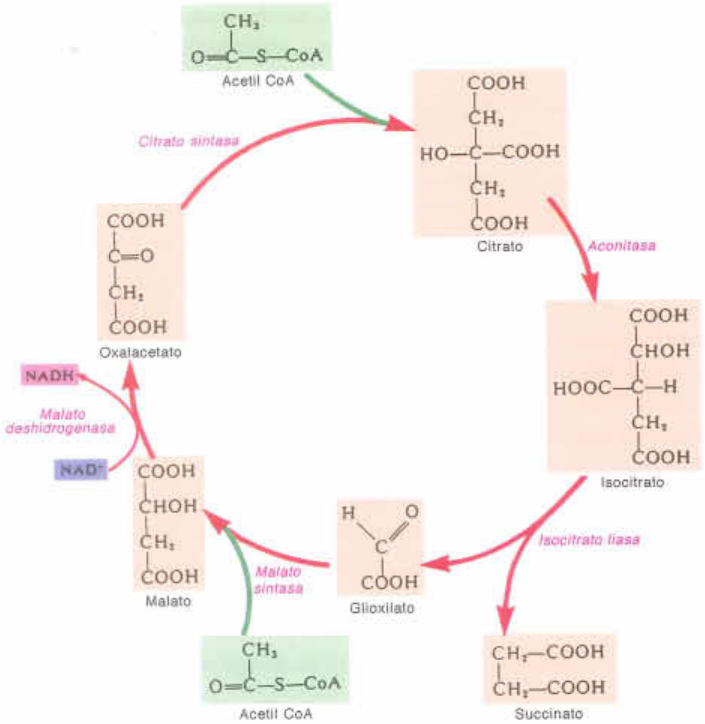


Fig. 10-3. Ciclo del glioxilato, en el que los ácidos grasos de la semilla se transforman en hidratos de carbono.

10-7. Ciertos peroxisomas vegetales intervienen en el proceso de fotorrespiración

Las células de las hojas verdes poseen un tipo de peroxisoma que mediante una oxidasa específica cataliza la oxidación de una molécula de dos carbonos, el glicolato. Este se sintetiza en el cloroplasto en los días secos de sol intenso. La oxidación del glicolato consume O_2 y produce H_2O_2 y glioxilato. Luego el H_2O_2 es descompuesto por la catalasa del peroxisoma (en H_2O y O_2) y —siempre en el peroxisoma— el glioxilato se convierte en glicina, que se metaboliza en la mitocondria y genera CO_2.

Este proceso, en el que participan tres organoides —el cloroplasto, la mitocondria y el peroxisoma—, se denomina **fotorrespiración**, ya que para la síntesis y la oxidación del glicolato se necesita luz y O_2 y se libera CO_2.

BIBLIOGRAFIA

Borst P. (1983) Animal peroxisomes (microbodies), lipid biosynthesis and the Zellweger syndrome. TIBS 8:269.

Cleves A.E. and Kelly R.B. (1996) Protein translocation: rehearsing the ABCs. Curr. Biol 6:276.

Jacobson M.D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. TIBS 21:83.

Kindl H. (1982) The biosynthesis of microbodies (peroxisomes and glyoxysomes). Int. Rev. Cytol. 80:193.

Lehninger A.L., Nelson D.L. and Cox M.M. (2008) Principles of Biochemistry, 5th Ed. W.H. Freeman, New York.

Masters C. and Holmes R. (1977) Peroxisomes: New aspects of cell physiology and biochemistry. Physiol. Rev. 57:816.

Monteith G.R. and Roufogalis B.D. (1995) The plasma membrane calcium pump. A physiological perspective on its regulation. Cell Calcium 18:459.

Rachubinski R.A. and Subramani S. (1995) How proteins penetrate peroxisomes. Cell 83:525.

Rusting R.L. (1992) Why do we age? Sci. Am. 267 (6):86.

Sohal R.J. and Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273:59.

Subramani S. (1996) Protein translocation into peroxisomes. J. Biol. Chem. 271:32483.

van der Zand A., Braakman I. and Tabak H.F. (2006) The return of the peroxisome. J. Cell Sci. 119:989.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Comunicación intercelular y transmisión intracelular de señales

11

11-1. En los organismos pluricelulares las células son interdependientes

En los organismos multicelulares complejos, tanto la supervivencia de las células como las actividades que éstas realizan dependen de estímulos externos provenientes de otras células.

La dependencia recíproca entre los distintos tipos celulares responde a la necesidad de adaptar la actividad de cada uno a los requerimientos globales del organismo, que debe ser considerado como una unidad diseñada para funcionar integradamente y no como una suma de células individuales. Así, en un organismo multicelular cada célula depende de otras y a la vez las influye. Estas interrelaciones celulares se producen desde las primeras etapas del desarrollo embrionario y persisten hasta el fin de la vida posnatal.

De acuerdo con la clase de estímulo emitido y el tipo de célula que lo recibe, ésta responde, entre otros, con alguno de los siguientes cambios: 1) se mantiene viva o muere; 2) se diferencia; 3) se multiplica; 4) degrada o sintetiza sustancias; 5) las secreta; 6) incorpora solutos o macromoléculas; 7) se contrae; 8) se moviliza; 9) conduce estímulos eléctricos.

11-2. Las células afectan las actividades de otras células mediante sustancias inductoras

La acción de estimular a la célula desde el exterior se llama **inducción**; es mediada por una **sustancia inductora**, conocida también como **ligando**.

La célula que produce el ligando se denomina **célula inductora**; la que lo recibe, **célula inducida** o **célula blanco**.

La sustancia inductora interactúa con la célula inducida a través de un **receptor**, que es una proteína o un complejo proteico localizado en el citosol o en la membrana plasmática de la célula blanco.

Si el receptor se halla en el citosol, la sustancia inductora debe ser pequeña e hidrofóbica, pues para alcanzarlo debe atravesar la membrana plasmática de la célula blanco. En cambio, si el receptor es membranoso no interesa el tamaño de la sustancia inductora ni que sea hidrofóbica.

11-3. Existen distintas clases de inducciones, dependientes de las distancias entre las células inductoras y las células inducidas

Cuando la célula inductora y la célula blanco se hallan distantes entre sí, la sustancia inductora, tras ser secretada por la primera, ingresa en la sangre y a través de ella alcanza a la célula inducida. Las inducciones de este tipo se

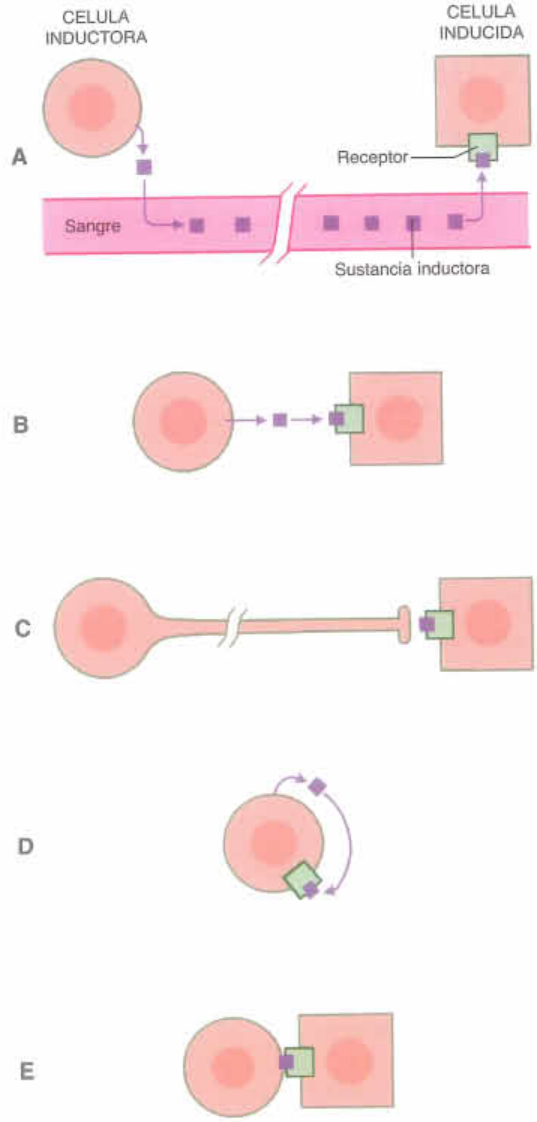


Fig. 11-1. Formas de inducción en los organismos pluricelulares. **A.** Secreción endocrina. **B.** Secreción paracrina. **C.** Sinapsis nerviosa. **D.** Secreción autocrina. **E.** Por contacto directo.

llaman **endocrinas** (del griego *éndon*, dentro, y *krínein*, separar) (fig. 11-1A).

A esta categoría pertenecen también las secreciones **neuroendocrinas**, ya que la sustancia inductora que sale del terminal axónico de la neurona debe volcarse en la sangre para poder llegar a la célula inducida.

Las sustancias inductoras vehiculizadas por la sangre se denominan ***hormonas*** y son producidas por las células de las glándulas de secreción interna que integran el sistema endocrino.

Cuando la célula inductora se halla cerca de la célula inducida se dice que la inducción es **paracrina** (del griego *pará*, contigüidad). Aquí la sustancia inductora debe recorrer un corto trecho de la matriz extracelular para alcanzar a la célula blanco (fig. 11-1B).

Un caso especial de cercanía entre la célula inductora y la célula inducida se da en las **sinapsis nerviosas**. En éstas el terminal axónico de una neurona (célula inductora) se halla junto a la membrana plasmática de otra neurona o de una célula muscular o de una célula secretoria (células inducidas). La sustancia liberada por el terminal axónico de la neurona inductora se llama ***neurotransmisor*** (fig. 11-1C). Las sinapsis permiten establecer una comunicación casi instantánea entre la neurona inductora y la célula inducida aun cuando ésta se halle muy lejos del cuerpo de la primera.

Existe una clase de inducción en la que la sustancia inductora es secretada y recibida por la propia célula, de modo que ésta se induce a sí misma. Se llama **autocrina** (del griego *autós*, por sí mismo) y ocurre durante algunas respuestas inmunológicas (fig. 11-1D).

En otros casos la sustancia inductora es retenida en la membrana plasmática de la célula inductora y **no se secreta**. Por lo tanto, para que la sustancia inductora pueda entrar en contacto con el receptor se necesita que la célula inductora se traslade hasta el lugar de la célula inducida (fig. 11-1E). Este tipo de inducción se da, por ejemplo, durante algunas respuestas inmunológicas (cap. 22-5) (fig. 22-4), la fecundación (cap. 19-19) (figs. 19-22 y 19-23) y la reparación de heridas.

Como se ve, pese a las diferencias entre las distintas clases de inducciones, todas actúan en forma similar: una célula produce un intermediario químico que interactúa con el receptor de otra célula, en la cual se desencadena una respuesta.

El carácter y la naturaleza de la respuesta dependen de la identidad de la célula inducida. A veces una misma sustancia inductora produce respuestas

diferentes por parte de dos o más tipos de células blanco. Por ejemplo, en las células musculares estriadas la adrenalina estimula la glucogenólisis, mientras que en las células adiposas estimula la lipólisis. Otras veces, distintas sustancias inductoras producidas por células inductoras diferentes generan una sola clase de respuesta por parte de uno o de varios tipos de células blanco.

11-4. Las sustancias inductoras se unen a los receptores con una gran especificidad

Una de las propiedades más notables de las sustancias inductoras es su **especificidad**. Así, cada sustancia inductora actúa sólo sobre ciertas células, que constituyen su objetivo o blanco. El caso más llamativo es el de las hormonas en las inducciones endocrinas, ya que luego de volcarse en la sangre llegan a todos los tejidos del organismo pero accionan únicamente sobre un limitado número de células.

La especificidad de las sustancias inductoras se corresponde con la especificidad de los receptores, que son moléculas o asociaciones moleculares —generalmente glicoproteínas— a las que las sustancias inductoras se unen selectivamente en virtud de una mutua adaptación conformacional. Más aún, la sustancia inductora y el receptor integran un complejo que posee las siguientes características:

1) **Adaptación inducida**. De manera similar a la unión enzima-sustrato, la fijación de la sustancia inductora al receptor requiere una adaptación estructural recíproca entre ambas moléculas (cap. 2-14). Se cree que se produce la adaptación conocida como ***encaje inducido***, que sería más probable que el modelo rígido representado por una llave y su cerradura (fig. 2-33).

2) **Saturabilidad**. El número de receptores existente en cada célula es limitado, de modo que si en un sistema de coordenadas se representa la cantidad de sustancia inductora unida a los receptores, se obtiene —en función de su concentración— una curva hiperbólica que delata la saturabilidad del sistema (fig. 2-34).

3) **Reversibilidad**. La unión sustancia inductora-receptor es reversible, ya que el complejo se disocia tiempo después de su formación.

11-5. La interacción sustancia inductora-receptor es la primera de una cadena de reacciones

La interacción entre la sustancia inductora y el receptor es el primer eslabón de una cadena de reacciones químicas que se propaga en el interior de la célula inducida, cuya respuesta es el último eslabón de la serie.

La respuesta celular puede producirse segundos u horas después de la llegada de la sustancia inductora. En el primer caso tiene lugar al cabo de reacciones que ocurren exclusivamente en el citoplasma. En el segundo, cuando un producto químico de la cadena de reacciones ingresa en el núcleo e induce la activación de un gen. Ello origina una serie de sucesos —a ser estudiados en los capítulos 14, 15 y 16— al cabo de los cuales se elabora una proteína cuya presencia provoca la respuesta celular.

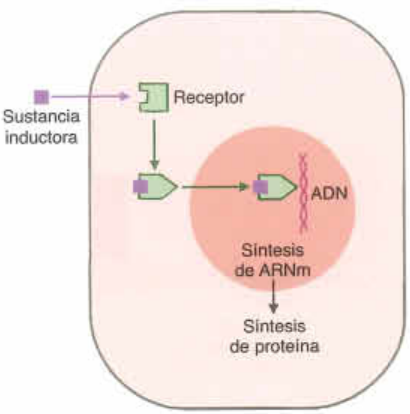


Fig. 11-2. Inducción celular a través de un receptor citosólico. Se ilustra el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas y tiroideas, de la vitamina D y del ácido retinoico.

En las próximas secciones se analizarán distintas vías de propagación de señales. Como se verá, el número y tipo de reacciones de cada vía dependen de la naturaleza de las células inducidas, de sus receptores y de las sustancias emitidas por las células inductoras.

Estas sustancias se clasifican en dos grupos, según interactúen con receptores localizados en el citosol o en la membrana plasmática de las células inducidas.

INDUCCIONES CELULARES MEDIADAS POR RECEPTORES CITOSOLICOS

11-6. Las hormonas esteroideas se unen a receptores citosólicos

Las **hormonas esteroideas**, las **hormonas tiroideas**, la **vitamina D** y el **ácido retinoico** son sustancias inductoras que se unen con receptores de las células inducidas, situados en el citosol. Las tres primeras generan inducciones endocrinas, ya que habitualmente se vuelcan en la sangre. En cambio, el ácido retinoico —una sustancia que interviene mayormente durante el desarrollo embrionario— da lugar a inducciones paracrinas.

Una vez en el citosol, la sustancia inductora se une a su receptor específico y ambos forman un complejo que ingresa en el núcleo. Allí el complejo se combina con la secuencia reguladora de un gen particular, el cual se activa (caps. 13-6 y 14-7). Su transcripción conduce a la síntesis de una proteína cuya presencia provoca la respuesta celular (fig. 11-2).

Los receptores citosólicos son proteínas que poseen cuatro dominios (fig. 11-3): 1) uno diseñado para unirse al inductor; 2) otro flexible, que se dobla como una bisagra; 3) otro que se une a la secuencia reguladora del gen, y 4) otro que activa al gen.

Cuando la sustancia inductora se une al receptor, éste adquiere una forma característica que le permite ingresar en el núcleo y unirse a la secuencia reguladora del gen. Debe señalarse que en ausencia de la sustancia inductora, el receptor permanece en el citosol unido a la **chaperona hsp90** (cap. 4-5), la cual lo encorva. En cambio, cuando la sustancia inductora se acopla al receptor, éste se libera de la chaperona y adquiere una configuración extendida debido a que su dominio flexible se endereza. Como consecuencia, el receptor puede ingresar en el núcleo y unirse a la secuencia reguladora del gen (fig. 11-3) (cap. 12-4).

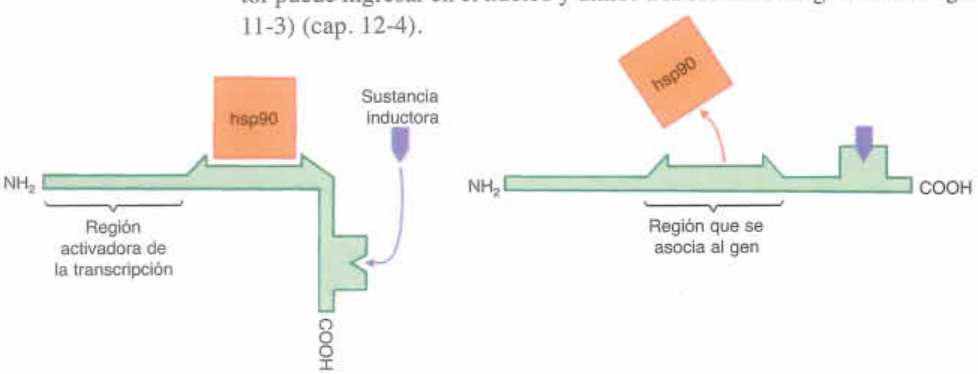


Fig. 11-3. Esquema que ilustra los cuatro dominios presentes en un receptor citosólico. Obsérvese la interacción del receptor con la chaperona hsp90 y cómo se endereza su dominio flexible.

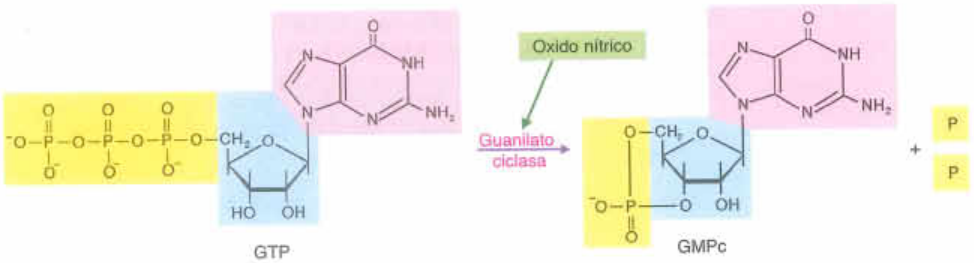


Fig. 11-4. Transformación del GTP en GMPc al actuar el óxido nítrico sobre la guanilato ciclasa.

11-7. El óxido nítrico interactúa con una enzima citosólica

Cuando es secretado por macrófagos, por las células endoteliales de los vasos sanguíneos o por algunos tipos de neuronas, el **óxido nítrico (NO)** se comporta como una sustancia inductora.

En la célula inducida el NO interactúa con una enzima citosólica —más específicamente con el grupo hem de la enzima **guanilato ciclasa**—, cuya activación convierte al nucleótido guanosina trifosfato (GTP) en **guanosina monofosfato cíclico (GMPc)** (fig. 11-4), que es el desencadenante de la respuesta celular. Debe señalarse que la acción del NO es muy breve, pues se convierte en nitrato o en nitrito en menos de 10 segundos.

El NO secretado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos tiene como blanco a las células musculares lisas de los propios vasos (secreción paracrina), que se relajan y producen vasodilatación. En algunos casos el proceso se inicia antes, cuando otra sustancia inductora —la acetilcolina— emerge de los terminales axónicos que inervan a las células endoteliales e interactúa con receptores localizados en sus membranas plasmáticas (fig. 11-5). Debido a ello las células endoteliales producen óxido nítrico sintasa, una enzima que genera NO a partir del aminoácido arginina. Finalmente, el NO secretado por las células endoteliales induce la relajación de las células musculares lisas de los vasos.

Un ejemplo de inducción de esta clase corresponde a la dilatación de los vasos sanguíneos del pene durante la erección. La vasodilatación es inducida por el NO que secretan las células endoteliales de los vasos penianos ante la llegada de estímulos nerviosos especiales. Otro ejemplo corresponde a la nitroglicerina, que es un fármaco que se emplea para tratar las crisis de angina de pecho. A poco de su administración, los vasos coronarios obstruidos se dilatan por períodos relativamente prolongados debido a que la nitroglicerina se convierte en NO en forma lenta y gradual.

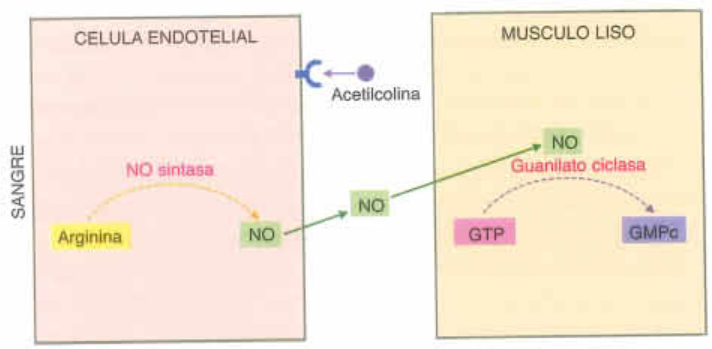


Fig. 11-5. Formación de óxido nítrico (*NO*) en las células endoteliales y su acción sobre las células musculares lisas de los vasos sanguíneos.

INDUCCIONES CELULARES MEDIADAS POR RECEPTORES LOCALIZADOS EN LA MEMBRANA PLASMATICA

11-8. En las inducciones mediadas por receptores membranosos las señales fluyen por el interior de la célula a través de distintas clases de moléculas

Las sustancias inductoras que se unen a receptores localizados en la membrana plasmática ponen en marcha en las células inducidas una serie de reacciones moleculares hasta que se llega a la respuesta celular. Esas reacciones dan lugar a distintas vías de conducción, transducción y amplificación de señales, algunas de las cuales se analizarán en las próximas secciones.

La llegada de la sustancia inductora —considerada el **primer mensajero** de la vía de señales— produce cambios en el receptor, que se transmiten a la segunda molécula del sistema. A su vez, ésta actúa sobre la tercera molécula del sistema, y así sucesivamente hasta arribarse a la respuesta celular. Algunas de esas moléculas —llamadas comúnmente **segundos mensajeros**— son de tamaño pequeño, por lo que difunden con rapidez y son muy efectivas para propagar las señales dentro de la célula. Debe agregarse que las primeras moléculas del sistema suelen localizarse en la membrana plasmática, cuya fluidez les permite desplazarse e interactuar con el receptor y las moléculas que les suceden (cap. 3-5).

Entre las moléculas que intervienen en la mayoría de las vías de señales abundan las **quinasas** (cap. 2-12), ya que muchas de sus reacciones son fosforilaciones catalizadas por ese tipo de enzimas. Existen diversas clases de quinasas, cada una para un sustrato específico, que puede ser otra quinasa, una enzima diferente o una proteína no enzimática. Cuando se trata de otra quinasa, a menudo ésta fosforila a una tercera, y así sucesivamente hasta que se llega al último eslabón de la cadena. Cabe agregar que en algunos casos la fosforilación activa al sustrato y en otros lo inactiva, lo cual genera distintas clases de consecuencias en el funcionamiento celular. Como se ve, las quinasas son moléculas muy difundidas en los procesos de transmisión de señales, que desempeñan funciones sobresalientes dentro de la célula.

Pese a las innumerables sustancias inductoras producidas por el organismo y a la enorme variedad de respuestas que generan, éstas se logran a través de un número relativamente pequeño de vías de transmisión de señales. Ello es porque la mayoría de las vías se interconectan y componen redes integradas similares a las de las computadoras. Por tal motivo, el estudio de este tema presenta dificultades que —en un texto sucinto— obligan a analizar sólo las vías de señales más importantes y a omitir sus eslabones menos representativos.

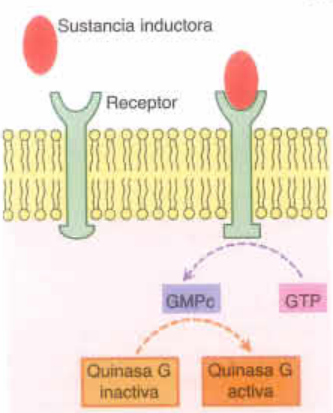


Fig. 11-6. Receptor membranoso cuyo dominio citosólico posee actividad de guanilato ciclasa.

11-9. Existen distintas clases de receptores membranosos que generan señales intracelulares

Los receptores de la membrana plasmática que dan origen a vías de señales intracelulares se componen de una o más proteínas. Cada receptor posee un dominio externo, un dominio transmembranoso y un dominio citosólico. Cuando la sustancia inductora se une al primero, el receptor se activa y su dominio citosólico experimenta uno de los siguientes cambios:

1) Adquiere actividad enzimática o activa a una enzima independiente del receptor (figs. 11-6 a 11-12).

2) Activa a una proteína localizada en la membrana plasmática, llamada proteína G, la cual activa a una enzima (figs. 11-13, 11-16, 11-19 y 11-21).

RECEPTORES MEMBRANOSOS QUE ADQUIEREN ACTIVIDAD ENZIMATICA O QUE ACTIVAN ENZIMAS

Como se acaba de mencionar, existen receptores membranosos que al ser inducidos adquieren actividad enzimática o activan a una enzima independiente. La actividad enzimática que se revela en los primeros puede ser de guanilato ciclasa, de serina-treonina quinasa o de tirosina quinasa, mientras que la enzima que activan los segundos es siempre una tirosina quinasa.

11-10. Existen receptores membranosos que al ser inducidos adquieren actividad de guanilato ciclasa

Cuando la presión arterial se eleva, las células musculares de las aurículas cardíacas secretan una hormona llamada ***péptido natriurético auricular (ANP)***, cuyos blancos son las células renales que reabsorben Na^+ y las células musculares lisas de los vasos arteriales. El ANP se acopla a un receptor específico de la membrana plasmática de esas células, cuyo dominio citosólico adquiere actividad de **guanilato ciclasa**, ya que interactúa con moléculas de guanosina trifosfato (GTP) presentes en el citosol y las convierte en **guanosina monofosfato cíclico (GMPc)** (fig. 11-4).

Como muestra la figura 11-6, los GMPc activan a la enzima **quinasa G** (por *GMPc*), que a su vez fosforila a una proteína citosólica específica. Con ella se pone en marcha una cadena de reacciones químicas citoplasmáticas, hasta que se produce la respuesta celular. En nuestro ejemplo se trata de la excreción de Na^+ por parte del riñón y de la relajación del músculo liso vascular, estados que llevan a la disminución de la presión arterial.

11-11. Existen receptores membranosos que al ser inducidos adquieren actividad de serina-treonina quinasa

Las sustancias inductoras que interactúan con los receptores que poseen actividad de **serina-treonina quinasa** pertenecen a una familia de moléculas llamadas ***TGF-β*** (por *transforming growth factor-β*), cuyos miembros —algunos se analizan en el capítulo 21-16— regulan la proliferación y la diferenciación celular.

La figura 11-7 muestra que la llegada de la sustancia inductora a la membrana plasmática de la célula inducida reúne a las cuatro subunidades proteicas que integran el receptor, las cuales se hallan agrupadas de a dos y serían diferentes entre sí.

A continuación, mediante fosfatos tomados de moléculas de ATP, los dominios citosólicos de dos de las cuatro subunidades fosforilan a serinas y treoninas de los dominios citosólicos de las otras dos subunidades, que se activan y fosforilan a serinas específicas de la proteína citosólica **Smad** (por *seven mothers against dpp*, un gen de la *Drosophila* de los que hay siete análogos en los vertebrados).

Luego la Smad se une a otra proteína de su misma familia y ambas ingre-

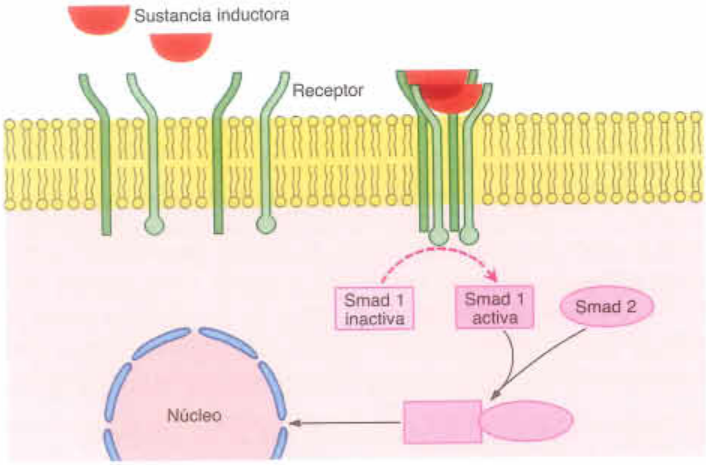


Fig. 11-7. Receptor membranoso cuyo dominio citosólico posee actividad de serina-treonina quinasa. Obsérvese que el receptor se compone de cuatro subunidades —aparentemente diferentes entre sí—, las cuales se reúnen con la llegada de las dos subunidades de la sustancia inductora y forman un receptor heterotetramérico.

san en el núcleo, donde se combinan con factores de transcripción que activan a genes cuyos productos inhiben el crecimiento celular, controlan la diferenciación o funcionan como sustancias inductoras durante el desarrollo embrionario temprano (caps. 14-5 y 21-16).

11-12. Existen receptores membranosos que al ser inducidos adquieren actividad de tirosina quinasa

Las sustancias inductoras que interactúan con los receptores que poseen propiedades de **tirosina quinasa** pertenecen a una familia de moléculas llamadas ***factores de crecimiento***. Estos factores —cuyas funciones se analizan en el capítulo 18-28— suelen ser secretados por células inductoras cercanas a las células inducidas (secreción paracrina).

Los factores de crecimiento más conocidos son el ***EGF*** (por *epidermal growth factor*), el ***FGF*** (*fibroblast*), el ***PDGF*** (*plateled-derived*), el ***HGF*** (*hepatocyte*), el ***NGF*** (*nerve*), el ***VEGF*** (*vascular endothelial*) y la ***insulina***. Esta última estimula el crecimiento de varios tipos celulares, por ejemplo, los fibroblastos.

Como muestran las figuras 11-8, 11-10 y 11-11, la llegada de las sustancias inductoras reúne a las dos subunidades que integran el receptor, hecho que posibilita la fosforilación de algunas tirosinas presentes en sus dominios citosólicos (los fosfatos son tomados de moléculas de ATP).

La fosforilación de las tirosinas activa al dominio citosólico del receptor, lo cual origina tres tipos de vías de transmisión de señales: uno en el que interviene la proteína Ras, otro en el que participa la enzima fosfolipasa C-γ y otro en el que lo hace la fosfatidilinositol 3-quinasa.

Proteína Ras. La figura 11-8 muestra que la proteína **Ras** (por *rat sarcome virus*) está anclada en el lado citosólico de la membrana plasmática mediante dos ácidos grasos. Obsérvese que cuando se activa se relaciona con el dominio citosólico del receptor a través de una proteína adaptadora y de la proteína GEF.

Ello es porque la Ras es miembro de la familia de GTPasas que actúan asociadas a las proteínas reguladoras GEF y GAP (cap. 7-38) (fig. 11-9). Al igual que sus análogas, cuando es influida por la **GEF**, la Ras reemplaza el

GDP presente en su molécula por un GTP. En cambio, cuando es influida por la **GAP**, la Ras hidroliza el GTP a GDP y P. Cabe agregar que el GTP activa a la Ras y el GDP la inactiva (figs. 11-8 y 11-9).

La Ras-GTP activa a la quinasa **Raf** (por *Ras-associated factor*), la cual fosforila a la quinasa **MEK** (por *MAP kinase/ERK kinase*) y ésta a la quinasa **ERK** (por *extracellular signal-regulated kinase*) (figs. 11-8 y 11-22). Finalmente, la ERK fosforila y activa a otras quinasas citosólicas o ingresa en el núcleo y fosforila a proteínas que activan a genes cuyos productos regulan el crecimiento y la diferenciación celular.

Debe señalarse que las proteínas Raf, MEK y ERK pertenecen a una familia de quinasas llamadas **MAP** (por *mitogen-activated protein kinases*), las cuales —con fosfatos provenientes de moléculas de ATP— fosforilan a serinas y treoninas de un grupo amplio de proteínas.

Como se ve, la Ras-GTP desencadena una serie de reacciones químicas cuyo último sustrato da lugar a la respuesta celular. Cuando ésta concluye, una fosfatasa específica remueve los fosfatos del receptor y la GAP induce a la Ras a que hidrolice su GTP a GDP y P.

Fosfolipasa C-γ (PLC-γ). En la célula existen varias clases de fosfolipasas, una de las cuales es la fosfolipasa C-γ (PLC-γ). Esta enzima es la que se une a receptores con actividad de tirosina quinasa (fig. 11-10).

Otra es la fosfolipasa C-β (PLC-β), que como se verá en la sección 11-14 se activa por medio de receptores acoplados a la proteína G (fig. 11-19).

Debido a que las vías de señales que nacen de las enzimas citosólicas PLC-γ y PLC-β producen efectos similares, se analizan conjuntamente en las secciones 11-14, 11-17, 11-18 y 11-19 (fig. 11-22).

Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-K). En la célula existen varias clases de fosfatidilinositol 3-quinasas, entre ellas una que se activa mediante receptores con actividad de tirosina quinasa y otras que lo hacen por medio de receptores acoplados a proteínas G (figs. 11-11, 11-21 y 11-22).

Debido a que sus efectos son similares —tienen que ver con la muerte celular—, las vías de señales que se originan a partir de estas enzimas se analizan conjuntamente en las secciones 11-14 y 11-20 y en el capítulo 22-4.

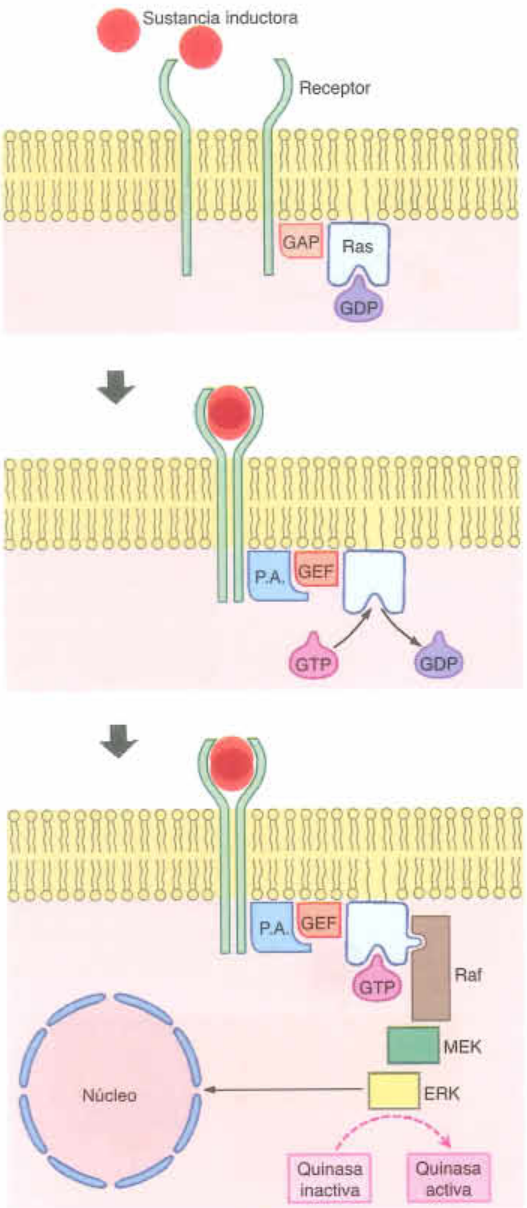


Fig. 11-8. Receptor membranoso cuyo dominio citosólico posee actividad de tirosina quinasa. El receptor se compone de dos unidades idénticas, las cuales se reúnen con la llegada de las dos subunidades de la sustancia inductora y forman un complejo homodimérico. Obsérvese que el receptor activa a la proteína Ras a través de la proteína GEF y de una proteína adaptadora (*P.A.*). Luego, la Ras-GTP activa a la quinasa Raf, ésta a la quinasa MEK y ésta a la quinasa ERK, la cual fosforila y activa a otras quinasas citosólicas. En otros casos la quinasa ERK ingresa en el núcleo y fosforila a proteínas que activan a genes cuyos productos regulan el crecimiento y la diferenciación celular.

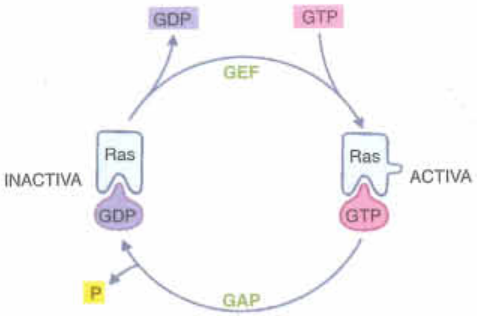


Fig. 11-9. Activación e inactivación de la proteína Ras mediante las proteínas GEF y GAP, respectivamente.

11-13. Existen receptores membranosos que al ser inducidos activan a una enzima ajena a sus moléculas

Existen receptores que cuando son inducidos activan a una tirosina quinasa independiente de sus moléculas, localizada en el citosol (fig. 11-12). Las sustancias inductoras más conocidas que se acoplan a estos receptores son la ***hormona del crecimiento***, la ***prolactina***, la ***eritropoyetina*** (cap. 18-18), algunas ***citoquinas*** y los ***antígenos*** cuando se unen a los linfocitos B o T.

La vía de señales que se origina en estos receptores comienza cuando la sustancia inductora interactúa con las dos o las tres subunidades que integran el receptor. Si bien en algunos receptores esas subunidades son iguales entre sí, en otros no lo son. Como muestra la figura 11-12, la llegada de la sustancia inductora reúne a las dos subunidades (o a las tres), lo cual activa al receptor y origina una vía de señales que tiene la propiedad de llegar al núcleo muy rápidamente, pues se vale de un escaso número de moléculas intermediarias.

Una de las primeras moléculas de esta vía de señales es la tirosina quinasa nombrada al comienzo de la sección. Entre las enzimas más difundidas de este tipo se encuentra la tirosina quinasa **JAK** (por *Janus kinase*), que nos servirá de ejemplo.

Así, apenas se activan los dominios citosólicos de las subunidades del receptor, atraen a sendas JAK, las cuales se fosforilan recíprocamente y se activan (fig. 11-12).

Luego las JAK fosforilan a los dominios citosólicos del receptor, que se vuelven a activar y atraen a unas proteínas citosólicas llamadas **STAT** (por *signal transducer and activators of transcription*), las cuales son fosforiladas por las JAK. Como se ve, las JAK primero se autofosforilan, luego fos-

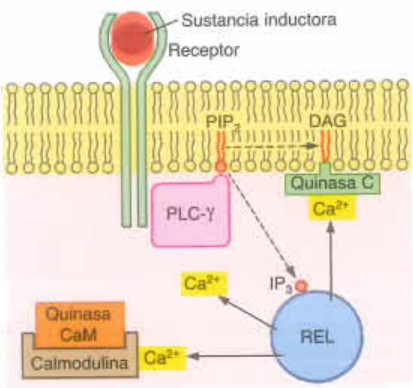


Fig. 11-10. Receptor membranoso cuyo dominio citosólico posee actividad de tirosina quinasa. El receptor se compone de dos unidades idénticas, las cuales se reúnen con la llegada de las dos subunidades de la sustancia inductora y forman un complejo homodimérico. Obsérvese que el receptor activa a la fosfolipasa C-γ (*PLC-γ*). *REL*, Retículo endoplasmático liso.

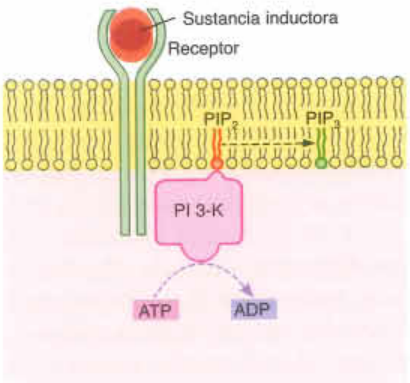


Fig. 11-11. Receptor membranoso cuyo dominio citosólico posee actividad de tirosina quinasa. El receptor se compone de dos unidades idénticas, las cuales se reúnen con la llegada de las dos subunidades de la sustancia inductora y forman un complejo homodimérico. Obsérvese que el receptor se une a una fosfatidilinositol 3-quinasa (*PI 3-K*) y la activa.

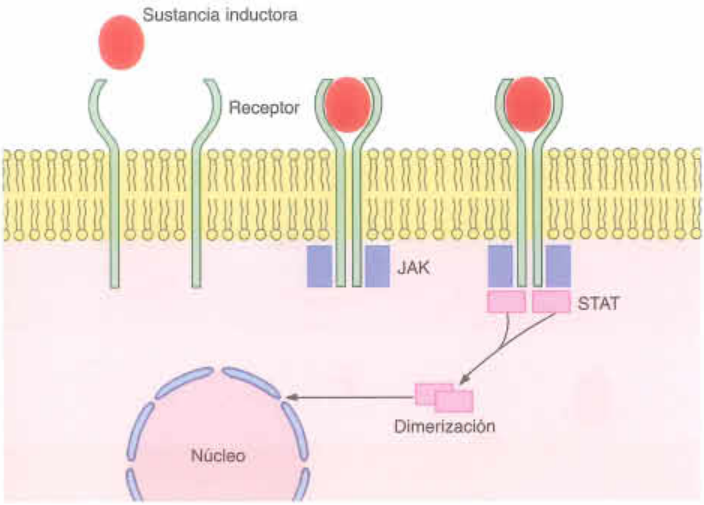


Fig. 11-12. Receptor membranoso cuyo dominio citosólico activa a una tirosina quinasa independiente del receptor. Obsérvese que cuando el receptor está inactivo se compone de dos subunidades separadas idénticas, las cuales se reúnen con la llegada de la sustancia inductora y componen un complejo homodimérico. En otros casos se forman receptores heterodiméricos o heterotriméricos.

forilan a los dominios citosólicos del receptor y finalmente fosforilan a las proteínas STAT.

Una vez fosforiladas, las STAT se dimerizan e ingresan en el núcleo (fig. 11-12), donde se combinan con proteínas especiales y forman complejos que activan a diversos tipos de genes. Estos —y sus productos— varían según las sustancias inductoras y las células inducidas. Por ejemplo, la prolactina hace que las células de la glándula mamaria secreten leche; en cambio, otros inductores regulan el desarrollo embrionario, la proliferación de distintos tipos celulares, etc.

RECEPTORES MEMBRANOSOS ACOPLADOS A PROTEINAS G

Como se dijo en la sección 11-9, existen receptores localizados en la membrana plasmática que al ser inducidos activan a proteínas G. En las próximas secciones se verá que las proteínas G activan a varias clases de enzimas a partir de las cuales nacen importantes vías de señales intracelulares.

11-14. Existen receptores membranosos que al ser inducidos activan a proteínas G y, a través de ellas, a distintos tipos de enzimas

Los receptores que se unen a las proteínas G son proteínas integrales multipaso que cruzan siete veces la bicapa lipídica de la membrana plasmática (fig. 11-13).

Las **proteínas G** (por *GTP-binding protein*) también pertenecen a la membrana plasmática, pero son heterotriméricas y se hallan adosadas a la cara citosólica de la membrana. Sus tres subunidades se identifican con las letras griegas α, β y γ. Como muestra la figura 11-13, las subunidades α y γ se unen a la membrana por medio de sendos ácidos grasos. En cambio, la subunidad β se une a la membrana por medio de la subunidad γ, con la que forma un complejo.

La subunidad α se comporta como una GTPasa que posee un GDP o un GTP, lo que la asemeja a la proteína Ras (compárense las figuras 11-9 y 11-14). Cuando la subunidad α posee un GDP, tanto ella como el complejo $\beta\gamma$ —es decir, la proteína G completa— se inactivan. En cambio, la proteína G se activa cuando el GDP es reemplazado por un GTP (fig. 11-14).

La activación de la proteína G se produce cuando la sustancia inductora se

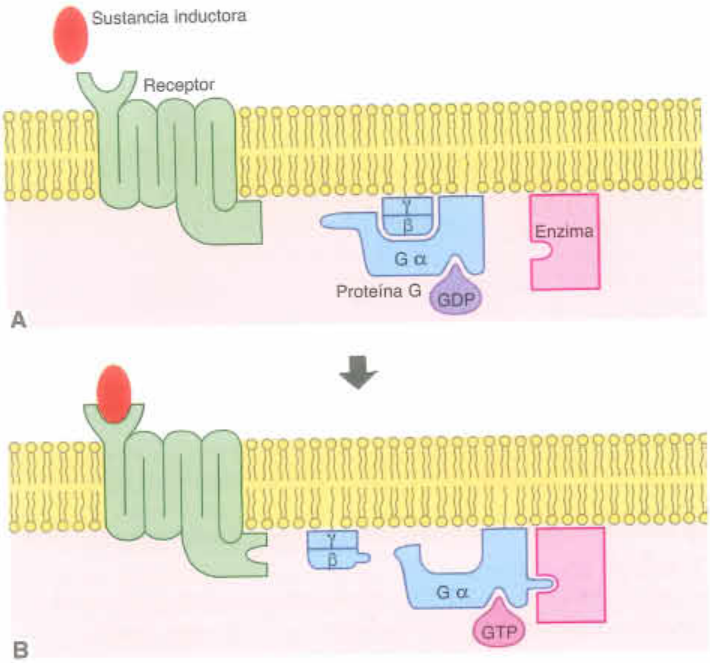


Fig. 11-13. Receptor membranoso acoplado a una proteína G. **A.** En reposo. **B.** En actividad.

acopla al receptor, pues éste se pone en contacto con la subunidad α y hace que su GDP sea reemplazado por un GTP (fig. 11-13B). Opuestamente, cuando la sustancia inductora se desliga del receptor y la transmisión de la señal concluye, la proteína G se inactiva debido a que la GTPasa de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP y P (fig. 11-13A).

Existen varias clases de proteínas G, las cuales dan origen a distintas vías de señales intracelulares después de interactuar con las siguientes enzimas:

1) **Adenilato ciclasa** (**AC**), que a partir de adenosina trifosfato (ATP) genera ***adenosina monofosfato cíclico*** (***AMPc***) (figs. 11-15, 11-16 y 11-22).

2) **Fosfolipasa C-β** (**PLC-β**), que al igual que la PLC-γ cataliza la escisión del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2) localizado en la monocapa citosólica de la membrana plasmática (cap. 3-3) (fig. 2-16) y forma ***inositol 1,4,5-trifosfato*** (***IP_3***) y ***diacilglicerol*** (***DAG***) (figs. 2-13, 11-10, 11-18, 11-19 y 11-22).

3) **Fosfatidilinositol 3-quinasa** (**PI 3-K**), que le añade un fosfato al PIP_2 y lo convierte en ***fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato*** (***PIP_3***) (figs. 11-20, 11-21 y 11-22).

Debe señalarse que el AMPc, el IP_3, el DAG y el PIP_3 son catalogados como segundos mensajeros.

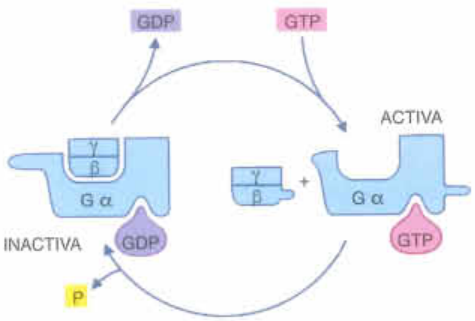


Fig. 11-14. Activación de la subunidad α y del complejo βγ de las proteínas G por medio del GTP.

Volviendo a las proteínas G, cuando el receptor las activa —y el GDP de la subunidad α es intercambiado por un GTP—, la subunidad α y el complejo βγ se separan (figs. 11-13B y 11-14). Luego la subunidad α o el complejo βγ entran en contacto con la adenilato ciclasa, con la fosfolipasa C-β o con la fosfatidilinositol 3-quinasa, las cuales en algunos casos se activan y en otros se inhiben (figs. 11-16, 11-19 y 11-21).

En las próximas secciones se analizan las distintas consecuencias de esas activaciones o inhibiciones, que

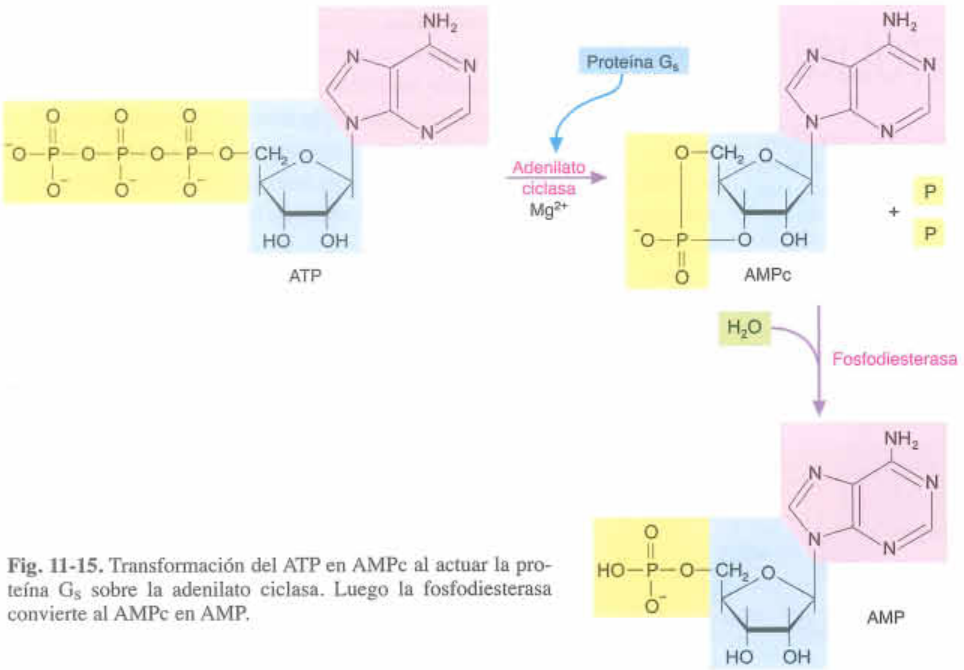


Fig. 11-15. Transformación del ATP en AMPc al actuar la proteína G_S sobre la adenilato ciclasa. Luego la fosfodiesterasa convierte al AMPc en AMP.

cesan apenas la sustancia inductora se separa del receptor. Es que el retiro de la sustancia inductora induce a la GTPasa de la subunidad α a hidrolizar el GTP a GDP y P, al cabo de lo cual la proteína G se inactiva y la subunidad α se reúne con el complejo βγ (figs. 11-13A, 11-14 y 11-16).

Habitualmente las proteínas G amplifican las señales. Lo logran porque una sola suele activar a muchas unidades de la enzima, cada una de las cuales, a su vez, da lugar a numerosos segundos mensajeros.

Por otra parte, cuando por alguna circunstancia los receptores acoplados a las proteínas G son estimulados en forma ininterrumpida, intervienen dos tipos de proteínas citosólicas desensibilizantes: unas quinasas específicas que fosforilan a los receptores y los inhiben, y las proteínas denominadas **arrestinas**, que los bloquean.

11-15. La adenilato ciclasa genera AMP cíclico, que activa a la quinasa A

El nucleótido **adenosina monofosfato cíclico** (**AMPc**) debe su nombre a que su fosfato compone un anillo al unirse simultáneamente con el C3′ y el C5′ de la ribosa. El AMPc se forma a partir de ATP mediante la **adenilato ciclasa**, una enzima situada en la membrana plasmática que requiere Mg^{2+} para funcionar. La figura 11-15 muestra la reacción y las fórmulas de las moléculas involucradas. Debe agregarse que la adenilato ciclasa es activada por la subunidad α de una proteína G específica, llamada **proteína G_s** (fig. 11-16).

A su vez, el aumento del AMPc en el citosol activa a la **quinasa A** (por *AMPc*), que en su estado inactivo es un tetrámero compuesto por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas unidas entre sí (fig. 11-17). Para que la quinasa A se active deben conectarse dos AMPc con cada subunidad reguladora, de modo que se le unen cuatro AMPc. La unión de los

AMPc separa a las subunidades reguladoras de las catalíticas, las cuales se activan, es decir, manifiestan sus propiedades enzimáticas.

A continuación, parte de las subunidades catalíticas activadas transfieren fosfatos tomados de moléculas de ATP a serinas y treoninas de diversas proteínas citosólicas, que se activan y dan lugar a respuestas celulares casi inmediatas. Simultáneamente, otras subunidades catalíticas ingresan en el núcleo y generan respuestas celulares tardías. Más adelante se describen ejemplos de ambos tipos de respuestas.

Debido a que el AMPc es un segundo mensajero muy potente, las células poseen dos mecanismos alternativos para regular su concentración. El más importante depende de la enzima **fosfodiesterasa**, que hidroliza la unión entre el fosfato y el hidroxilo del carbono 3′ en la ribosa del AMPc. Ello convierte al AMPc en AMP, que es un nucleótido inactivo (fig. 11-15). Varias metilxantinas, como la cafeína, la teofilina y la aminofilina, inhiben la actividad de la fosfodiesterasa y, por lo tanto, la caída del AMPc.

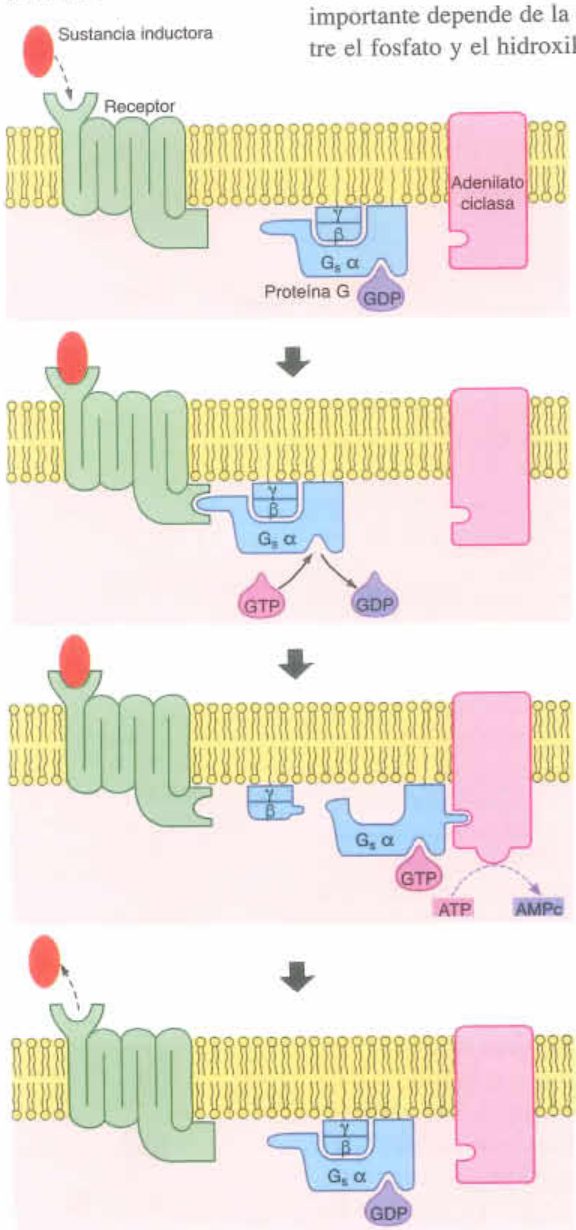


Fig. 11-16. Reacciones producidas a partir de la unión de una sustancia inductora con un receptor membranoso que activa a la subunidad α de la proteína G_s. Obsérvese cómo ésta interactúa con la adenilato ciclasa.

El segundo mecanismo que regula la concentración del AMPc es más lento que el anterior, ya que depende de la unión de una sustancia inductora a su receptor y de una proteína G que produce efectos contrarios a los de la proteína G_s. Se trata de la **proteína G_i**, cuya subunidad α inhibe a la adenilato ciclasa y hace caer la concentración del AMPc. A su vez, la caída del AMPc inactiva a la quinasa A —sus subunidades catalíticas y reguladoras se reúnen— y la respuesta celular se detiene.

El AMPc es un segundo mensajero plurivalente que provoca respuestas muy distintas según la clase de célula en que actúa, la sustancia que induce a esta última y el receptor que se activa. En la tabla 11-1 se dan ejemplos de respuestas inmediatas mediadas por el AMPc cuando se une a quinasas A que actúan en el citosol.

La degradación del glucógeno y la detención de su síntesis que se producen en las células musculares estriadas en situaciones de estrés, son dos ejemplos de respuestas inmediatas mediadas por las subunidades catalíticas de la quinasa A. El proceso comienza en las glándulas suprarrenales, que a consecuencia del estrés liberan ***adrenalina***, una sustancia inductora que se vuelca en la sangre y llega a las células musculares estriadas, a cuyas membranas plasmáticas se une. Se conecta con un receptor membranoso llamado **β_2-adrenérgico**, que activa a la proteína G_s. Dado que ésta activa a la enzima adenilato ciclasa, se genera AMPc y se activa la quinasa A, cuyas subunidades catalíti-

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

cas fosforilan a dos enzimas citosólicas: la glucógeno fosforilasa quinasa y la glucógeno sintasa (fig. 11-17).

La **glucógeno fosforilasa quinasa** se activa y fosforila a otra enzima, la **glucógeno fosforilasa**, que degrada al glucógeno mediante la liberación progresiva de sus monómeros, representados por moléculas de glucosa 1-fosfato (estimulación de la glucogenólisis).

En cambio, la **glucógeno sintasa** se inhibe y deja de sintetizar glucógeno a partir de moléculas de glucosa (detención de la glucogenogénesis).

Como se ve, en las células musculares estriadas la activación del receptor β_2-adrenérgico eleva la concentración de glucosa 1-fosfato y de glucosa. Cabe agregar que posteriormente estas dos hexosas se convierten en glucosa 6-fosfato por acción de las enzimas **fosfoglucomutasa** y **hexoquinasa**, respectivamente.

Dado que para generar ATP el organismo consume glucosa 6-fosfato (caps. 8-6 y 8-7) (fig. 8-6), en situaciones de estrés recurre a ella en grandes cantidades a fin de sostener la contracción muscular (cap. 5-33). Tal demanda hace que parte de la glucosa 6-fosfato requerida por los músculos sea provista por el hígado. Para ello, a través también del receptor β_2-adrenérgico, la adrenalina induce al hepatocito a producir glucosa 6-fosfato mediante las mismas reacciones de las células musculares estriadas. Luego, una enzima situada en la membrana del REL, la **glucosa 6-fosfatasa**, transforma a la glucosa 6-fosfato en glucosa, que sale del hepatocito, pasa a la circulación sanguínea (cap. 7-27) y llega a las células musculares, donde la hexoquinasa la reconvierte en glucosa 6-fosfato con el fin de generar ATP (fig. 8-6).

Otro ejemplo de respuesta inmediata mediada por la adrenalina ocurre en las células musculares lisas del tubo digestivo y los bronquios. En este caso la adrenalina se acopla a un receptor diferente, llamado **α_2-adrenérgico**, que activa a la proteína G_i, la cual funciona de una manera distinta de la esperada, puesto que no interviene su subunidad α —que según se vio inhibe a la adenilato ciclasa— sino su complejo $\beta\gamma$. Más aún, este complejo no se une a una enzima sino a un canal de K^+ de la membrana plasmática, que se abre y

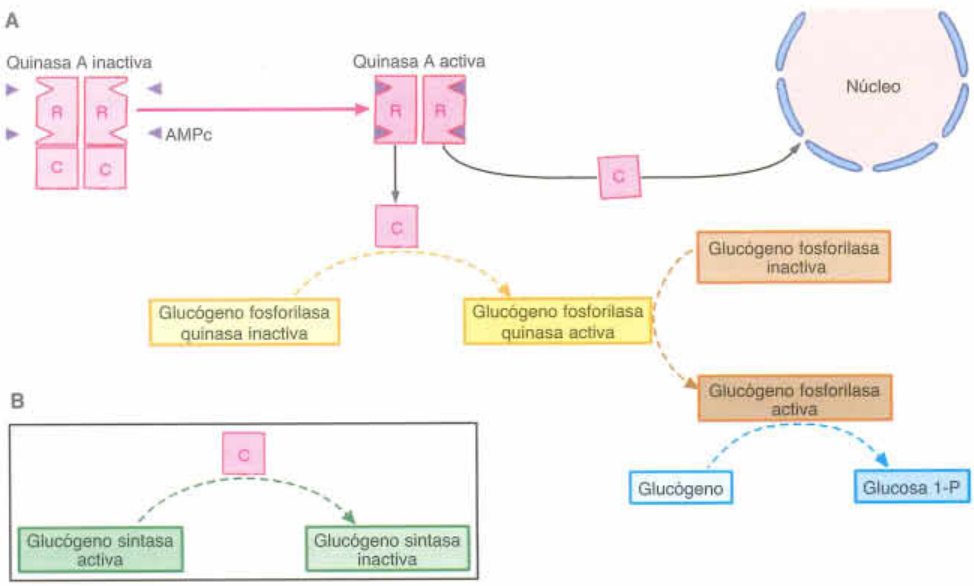


Fig. 11-17. Unidades reguladoras (*R*) y catalíticas (*C*) de la quinasa A. Obsérvese la unión del AMPc con las unidades reguladoras y cómo las unidades catalíticas fosforilan a las enzimas citosólicas responsables de la glucogenólisis (**A**) y la glucogenogénesis (**B**) e ingresan en el núcleo para fosforilar a la proteína CREB.

permite que el K^+ se escape de la célula. Debido a ello la membrana plasmática se hiperpolariza y su excitabilidad disminuye, con la consiguiente relajación de las células musculares lisas mencionadas.

La figura 19-20 muestra un sector de la membrana plasmática del espermatozoide en el que se ilustra otro ejemplo de respuesta inmediata mediada por una proteína G, que también funciona de manera distinta a la esperada Obsérvese que aquí la subunidad α se une a la adenilato ciclasa y que el complejo $\beta\gamma$ lo hace con un canal de Ca^{2+} localizado en la membrana plasmática (cap. 19-18).

Los dos últimos ejemplos añaden un nuevo dato sobre las funciones de las proteínas G, dado que en algunos casos sus complejos $\beta\gamma$ interactúan con canales iónicos.

A continuación se analizará la actuación de las subunidades catalíticas de la quinasa A que entran en el núcleo y generan respuestas tardías (fig. 11-17). En el nucleoplasma, mediante un fosfato tomado de un ATP, cada subunidad catalítica fosforila a una serina de una proteína llamada **CREB** (por *cAMP response element binding protein*), que se activa y se une a otra proteína nuclear, denominada **CBP** (por *CREB binding protein*).

Luego el complejo CREB-CBP se une a la secuencia reguladora de algunos genes, más precisamente a un segmento llamado **CRE** (por *cAMP response element*). Dado que ello estimula la expresión de esos genes, puede decirse que la CREB y la CBP son factores de transcripción activadores (cap. 14-7).

La secuencia CRE se halla en genes relacionados con la proliferación y la diferenciación celular. Además, se encuentra en el gen de la somatostatina, una hormona producida por los islotes de Langerhans y la mucosa del tubo digestivo, que inhibe la síntesis de glucosa y la secreción de gastrina.

11-16. En la tos ferina y en el cólera se afecta el funcionamiento de proteínas G

La ***tos ferina*** es una enfermedad producida por la toxina del bacilo *Bordetella pertussis*. La toxina actúa en las células musculares lisas de los bronquios, donde impide que el GTP se acople a la subunidad α de la proteína G_i, hecho que conserva a la subunidad α unida al dímero $\beta\gamma$ en forma permanente. Ello imposibilita la acción inhibitoria de la proteína G_i sobre la adenilato ciclasa, por lo que los niveles de AMPc se mantienen altos y la quinasa A permanece activa. Como consecuencia, los canales de K^+ mencionados en la sección anterior se cierran y la excitabilidad del músculo liso bronquial aumenta, por lo que el músculo se contrae en forma sostenida y causa la tos que caracteriza a la enfermedad.

El ***cólera*** es una enfermedad producida por la toxina del bacilo *Vibrio cholerae*, caracterizada por diarreas profusas, desequilibrios iónicos y deshidratación. Estos trastornos son causados por el aumento de los niveles de AMPc en las células de la mucosa intestinal. Es que la toxina bloquea a la GTPasa de la subunidad α de la proteína G_s, lo cual impide que el GTP se hidrolice a GDP y P. Por consecuencia, tanto la proteína G_s como la adenilato ciclasa se mantienen activas y la enzima produce AMPc en forma sostenida. Dado que en las células del epitelio intestinal el AMPc se une a un canal de Cl^- de la

Tabla 11-1. Ejemplos de respuestas celulares mediadas por el AMP cíclico

Sustancias inductoras	*Células inducidas*	*Efectos*
Adrenalina Glucagón	Hepatocitos	Degradación de glucógeno Menor síntesis de glucógeno
Adrenalina	Musculares estriadas	Degradación de glucógeno
Adrenalina	Musculares cardíacas	Mayor frecuencia cardíaca
Adrenalina Glucagón	Adipocitos	Degradación de triacilgliceroles Menor captación de aminoácidos
Hormonas foliculo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH)	Folículos ováricos	Mayor síntesis de estrógeno y de progesterona
Tirotropina (TSH)	Tiroideas	Secreción de hormona tiroidea
Adrenocorticotropina (ACTH)	Suprarrenales (corteza)	Secreción de cortisol
Hormona antidiurética	Renales	Retención de agua
Parathormona	Oseas	Reabsorción de Ca^{2+}
Odorantes	Neuroepiteliales de la nariz	Detección de olores

membrana plasmática, ese canal se abre y el ion pasa a la luz del intestino en forma masiva. La diarrea se debe a que el Cl^- arrastra al Na^+ y a que ambos iones provocan la salida de grandes cantidades de agua.

11-17. La fosfolipasa C-β genera IP_3 y DAG a partir de PIP_2

En la membrana plasmática de diversos tipos de células la unión de algunas sustancias inductoras con sus receptores activa a la subunidad α de la **proteína G_q**, que debido a ello reemplaza su GDP por un GTP. A su vez, la proteína G_q activa a la **fosfolipasa C-β (PLC-β)**, una enzima que se halla en el citosol cerca de la membrana (fig. 11-19).

Un ejemplo de esta clase de inducciones corresponde a la ***adrenalina*** cuando se une a un receptor distinto de los nombrados hasta aquí, llamado **α_1-adrenérgico**.

En el capítulo 3-3 se dijo que uno de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de las membranas celulares es el fosfatidilinositol (PI). En la membrana plasmática se localiza en la monocapa citosólica y, aunque es el más escaso, tiene un enorme significado funcional debido a que interviene en importantes vías de señales intracelulares. Para ello se fosforila en el C4′ y en el C5′ del inositol mediante la transferencia de fosfatos tomados de moléculas de ATP, lo cual lo convierte primero en fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) y luego en **fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2)** (figs. 2-16 y 11-18).

Volviendo a la fosfolipasa C-β, una vez activada cataliza la hidrólisis del PIP_2, que como se dijo en la sección 11-14 se fracciona en dos moléculas relativamente pequeñas, el **inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)** y el **diacilglicerol (DAG)** (figs. 2-13, 11-18 y 11-19). En las próximas secciones se verá que ambas moléculas actúan como segundos mensajeros en vías de señales de gran importancia para el funcionamiento celular.

Debe señalarse que esas vías cesan cuando intervienen dos **fosfatasas** específicas que catalizan la remoción de dos de los tres fosfatos del PIP_2, lo cual lo convierte nuevamente en PI.

En la sección 11-12 se dijo que la célula posee varias clases de fosfolipasas. Entre las más comunes se halla la **fosfolipasa C-γ (PLC-γ)**, que al igual que la PLC-β hidroliza el PIP_2 y lo fracciona en IP_3 y DAG (figs. 11-10 y 11-22). Debido a que ambas fosfolipasas generan productos similares, sus efectos se analizan conjuntamente en las próximas dos secciones.

Corresponde agregar que a esos efectos deben sumarse los de la proteína Ras (cap 11-12), ya que las vías de señales nacidas en las dos fosfolipasas pasan por la proteína Raf (fig. 11-22).

Otras dos fosfolipasas relativamente comunes en diversas clases de células son la **fosfolipasa A (PLA)** y la **fosfolipasa D (PLD)**. Se ilustran en la figura 19-22, que muestra partes del espermatozoide y de la membrana pelúcida del ovocito al comienzo de la fecundación.

11-18. El IP_3 abre los canales de Ca^{2+} situados en la membrana del RE, y parte del Ca^{2+} citosólico se une a la calmodulina, que activa a la quinasa CaM

Apenas el PIP_2 es fraccionado en DAG e IP_3 por la PLC-β o la PLC-γ, el **IP_3** abandona la membrana plasmática y pasa al citosol. Pronto se une a un canal de Ca^{2+} dependiente de ligando situado en la membrana del REL, cuya apertura permite que parte del **Ca^{2+}** que se halla en ese organoide se transfiera al citosol (cap. 7-26) (figs. 11-10, 11-19, 19-22 y 19-23).

Normalmente, la concentración citosólica de Ca^{2+} es muy baja (cerca de 10^{-7} M), más de mil veces inferior a la concentración en el REL y en la matriz extracelular. Estímulos de distinta naturaleza elevan el Ca^{2+} en el citosol, que puede proceder de fuera de la célula o de depósitos citoplasmáticos, como lo son el REL y las mitocondrias (caps. 7-26 y 8-22). Así, en respuestas que requieren un incremento rápido de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, el ion se moviliza desde el exterior o desde los organoides mencionados (normalmente lo hace desde el REL) debido a la apertura transitoria de canales de Ca^{2+} situados en la membrana plasmática o en la membrana de esos organoides.

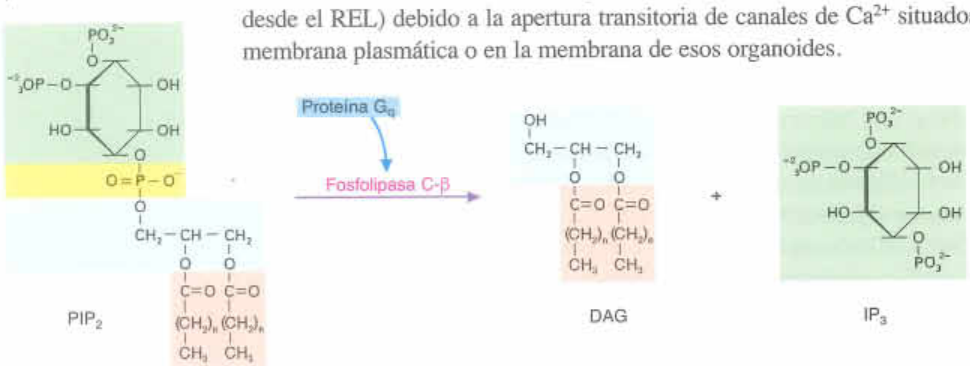


Fig. 11-18. División del PIP_2 en IP_3 y DAG cuando actúa la proteína G_q sobre la fosfolipasa C-β.

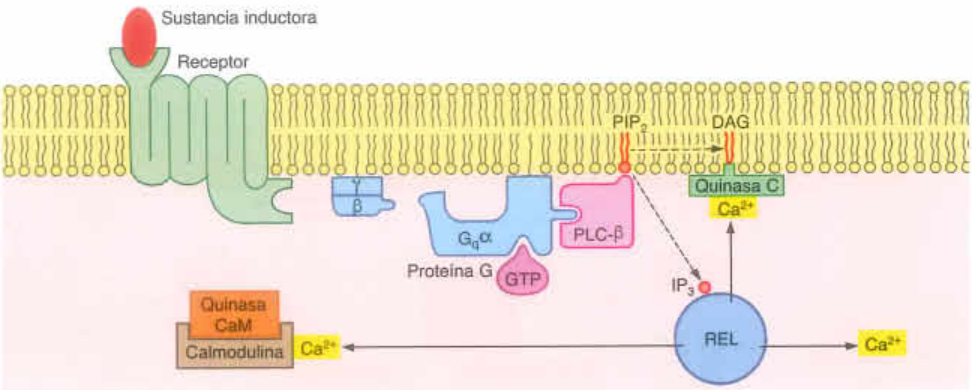


Fig. 11-19. Acción de la subunidad α de la proteína G_q sobre la enzima fosfolipasa C-β (*PLC-β*).

En los capítulos 3-14 y 7-26 se dijo que los canales iónicos se abren por medio de un ligando (se acaba de ver que el IP_3 lo es) o por un cambio en el potencial eléctrico de la membrana (fig. 3-20). Un ejemplo de este último mecanismo se da en las células musculares estriadas, en las cuales el Ca^{2+} sale del retículo sarcoplasmático a través de un canal iónico dependiente de voltaje.

En el citosol, el **Ca^{2+} libre** da lugar a una extensa variedad de respuestas celulares. Por ejemplo, participa en el desarmado de los microtúbulos (cap. 5-7), interviene en la activación de la enzima glucógeno fosforilasa quinasa en las células musculares estriadas y en las células hepáticas (sección 11-15) (fig. 11-17A), estimula la exocitosis de insulina en las células B de los islotes de Langerhans (fig. 7-20) y de neurotransmisores en algunos terminales axónicos (fig. 7-21), etcétera.

El Ca^{2+} actúa también como segundo mensajero en distintas vías de señales intracelulares, para lo cual se liga a una proteína llamada **calmodulina** (figs. 11-10 y 11-19).

La parte media de esta proteína es alargada y cada uno de sus dos extremos, que son globulares, posee dos lugares de unión para el Ca^{2+}. La calmodulina se activa sólo si se le unen los cuatro Ca^{2+} que es capaz de albergar.

Una vez formado, el complejo **Ca^{2+}-calmodulina** activa a la **quinasa CaM** (por *Ca^{2+}-calmodulin*), que luego de autofosforilarse fosforila a serinas y treoninas de otras quinasas citosólicas.

La quinasa CaM da origen a varias vías de señales intracelulares. Así, en distintos tipos celulares inicia una cadena particular de activaciones derivada de la fosforilación de sucesivas quinasas, hasta que la última produce la respuesta celular. Otro ejemplo corresponde al cerebro, en algunas de cuyas neuronas la quinasa CaM-II se mantiene activa aún después de la caída del Ca^{2+} citosólico, de ahí que se estima que esa quinasa se relaciona con la memoria y los procesos de aprendizaje.

En el capítulo 5-33 se vio que la calmodulina de la célula muscular estriada recibe el nombre de **troponina C**. Además, se analizó la intervención del complejo Ca^{2+}-troponina C durante la contracción muscular.

Por otro lado, el Ca^{2+} se une a la **quinasa C** y hace posible la vía de señales intracelulares descrita en la próxima sección (figs. 11-10 y 11-19).

Las señales intracelulares mediadas por el Ca^{2+} concluyen cuando el ion retorna al interior del REL o es extraído hacia la matriz extracelular por medio de bombas de Ca^{2+} (caps. 3-23 y 7-26).

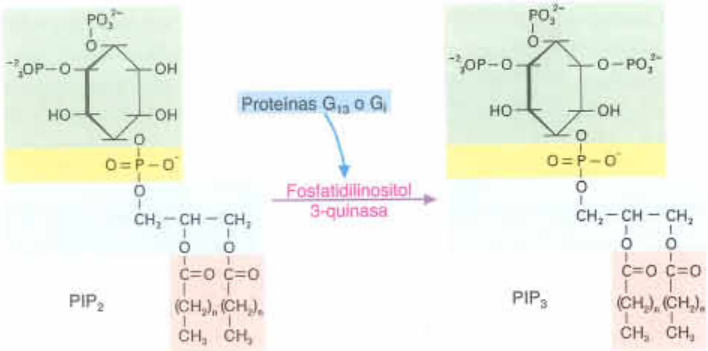


Fig. 11-20. Formación de PIP_3 a partir de PIP_2 cuando actúa la proteína G_{13} o la proteína G_i sobre la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa.

11-19. El DAG activa a la quinasa C

Una vez que el PIP_2 es fraccionado en DAG e IP_3 por la PLC-β o por la PLC-γ, el **DAG** permanece en la monocapa citosólica de la membrana plasmática, como lo estaba el PIP_2 (figs. 11-10 y 11-19).

Simultáneamente, parte del $\mathbf{Ca^{2+}}$ que se libera del REL por acción del IP_3 se combina con una enzima citosólica llamada **quinasa C** (por Ca^{2+}). Luego, el complejo **Ca^{2+}-quinasa C** se dirige a la membrana plasmática y se coloca junto al DAG a fin de que éste active a la quinasa C (figs. 11-10, 11-19, 11-22 y 19-23).

Como se ve, el Ca^{2+} citosólico liberado por el IP_3 hace posible la activación de la quinasa C por medio del DAG, lo que demuestra que el IP_3 y el DAG se relacionan no sólo por su origen —el PIP_2— sino también por la asistencia que el primero le presta al segundo.

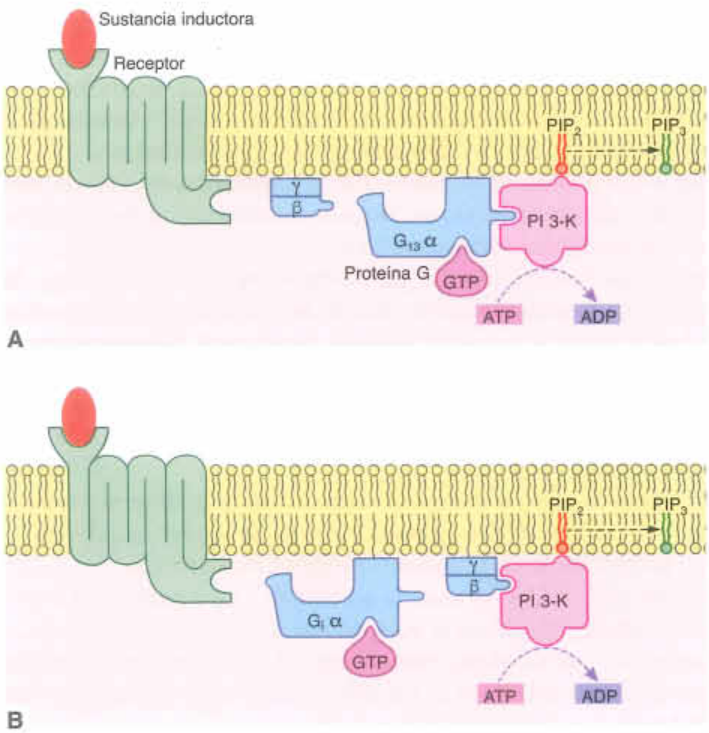


Fig. 11-21. Acción de la subunidad α de la proteína G_{13} (**A**) y del complejo βγ de la proteína G_i (**B**) sobre la fosfatidilinositol 3-quinasa (*PI 3-K*).

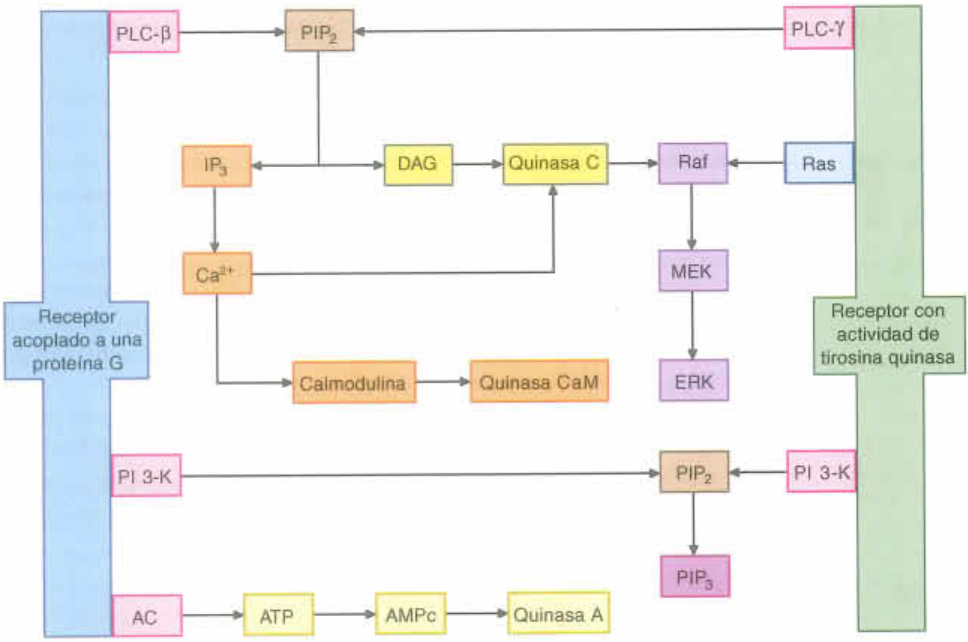


Fig. 11-22. Algunas integraciones de las vías de señales que nacen de receptores con actividad de tirosina quinasa o de receptores acoplados a proteínas G. *PLC-β*, fosfolipasa C-β; *PLC-γ*, fosfolipasa C-γ; *AC*, adenilato ciclasa.

Apenas se activa, la quinasa C fosforila a serinas o a treoninas de proteínas citosólicas y nucleares, las cuales varían en los distintos tipos de células.

Una de las proteínas citosólicas es la glucógeno sintasa, que en la célula hepática es fosforilada no sólo por la quinasa A sino también por la quinasa C. Como se vio en la sección 11-15, el fosfato le impide a la glucógeno sintasa sintetizar glucógeno a partir de moléculas de glucosa (fig. 11-17B).

Otra proteína citosólica que fosforila la quinasa C es la Raf, en cuyo caso la vía de señales deriva en la activación de genes que inducen el crecimiento y la diferenciación celular (sección 11-12) (fig. 11-22).

Otros dos ejemplos en los que la enzima quinasa C fosforila a proteínas citosólicas se dan durante la fecundación, en las etapas mostradas en las figuras 19-22 y 19-23.

Por su parte, las proteínas nucleares que se fosforilan mediante la quinasa C son factores de transcripción que activan o reprimen a un grupo de genes relacionados con la proliferación celular. La importancia de la quinasa C en el control de la proliferación celular se demostró al estudiarse la acción tumorígena de los ***ésteres de forbol***, los cuales poseen estructuras similares a la del DAG y al igual que éste activan a la quinasa C. No obstante, debido a que no se degradan —y, por lo tanto, no se interrumpe la actividad de la quinasa C—, promueven una proliferación celular sostenida, con la consiguiente formación de tumores.

Debe señalarse que en algunas neuronas del cerebro la quinasa C no fosforila a proteínas del citosol ni del núcleo sino a canales iónicos de la membrana plasmática, lo cual los abre, con la consiguiente alteración de la excitabilidad de la membrana.

La quinasa C interrumpe su actividad cuando el DAG se hidroliza. Uno de los productos de esa hidrólisis es el ácido araquidónico, que es un precursor de diversos eicosanoides, entre los que se hallan las ***prostaglandinas***.

11-20. La vía de transmisión de señales que origina la enzima PI 3-K se relaciona con la supervivencia celular

En la sección 11-12 se dijo que existen varias clases de **fosfatidilinositol 3-quinasas (PI 3-K)**, entre ellas una que se activa mediante receptores con actividad de tirosina quinasa y otras que lo hacen mediante receptores acoplados a proteínas G (figs. 11-11, 11-21 y 11-22). Debe agregarse que las segundas se activan a través de la subunidad α de la **proteína G_{13}** o del complejo $\beta\gamma$ de la **proteína G_i** (figs. 11-20 y 11-21).

Las PI 3-K se hallan en el citosol y todas producen los mismos efectos: le añaden un fosfato al fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2) de la membrana plasmática y lo convierten en ***fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato*** (***PIP_3***). Así, el PIP_2 no sólo es fuente de IP_3 y DAG sino también de PIP_3.

Como muestran las figuras 11-20 y 11-21, el PIP_2 se localiza en la monocapa citosólica de la membrana plasmática y es fosforilado en el sitio 3 del inositol.

El estudio de las vías de señales nacidas en las PI 3-K se completa en el capítulo 22-4 debido a que su interrupción conduce a la muerte celular.

BIBLIOGRAFIA

Barridge M.J. (1985) The molecular basis of communication within the cell. Sci Am. 253 (4):124.

Barridge M.J. (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. Annu. Rev. Physiol. 67:1.

Bourne H.R. (1995) Trimeric G proteins: surprise witness tells a tale. Science 270:933.

Casey P.J. (1995) Protein lipidation in cell signaling. Science 268: 221.

Clapham D.E. (1996) The G-protein nanomachine. Nature 379:297.

Druey K.M., Blumer K.J., Hang V.H. and Kehrl J.H. (1996) Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new gene family. Nature 379:742.

Ghosh A. and Greenberg M.E. (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. Science 268: 239.

Hib J. (2009) Histología de Di Fiore. Texto y atlas. 2ª Ed. Editorial Promed, Buenos Aires.

Hofer A.M. et al. (1996) ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. FASEB J. 10:302.

Horne J.H. and Meyer T. (1997) Elementary calcium-release units induced by inositol trisphosphate. Science 276:1690.

Iyengar R. (1996) Gating by ciclic AMP: expanded role for an old signaling pathway. Science 271:461.

Kamenetsky M., Middelhaufe S., Bank E.M. et al. (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. J. Mol. Biol. 362:623.

Kavanaugh W.M. and Williams L.T. (1994) An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. Science 266:1862.

Linder M. and Gilman A. (1992) G proteins. Sci. Am. 267 (1):36.

Luttrell L.M. (2006) Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. Methods Mol. Biol. 332:3.

Michell R.H. (1992) Inositol lipids in cellular signaling mechanisms. TIBS 17:274.

Mochly-Rosen D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. Science 268:247.

Murad F. (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. N. Engl. J. Med. 55:2003.

Nishi R. (1994) Neurotrophic factors: two are better than one. Science 265:1052.

Papin J.A., Hunter T., Palsson B.O. and Subramaniam S. (2005) Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:99.

Pawson T. (1993) Signal transduction. A conserved pathway from the membrane to the nucleus. Develop. Gen. 14:333.

Qi M. and Elion E.A. (2005) MAP kinase pathways. J. Cell Sci. 118:3569.

Rawlings J.S., Rosler K.M. and Harrison D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. J. Cell Sci. 117:1281.

Reiter E. and Lefkowitz R.J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. Trends Endocrinol. Metab. 17:159.

Roush W. (1996) Regulating G protein signaling. Science 271:1056.

Siderovski D.P. et al. (1996) A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? Curr. Biol. 6:211.

Snyder S.H. and Bredt D.S. (1992) Biological roles of nitric oxide. Sci. Am. 266 (5):28.

Taniguchi T. (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. Science 268:251.

Umemori H. et al. (1997) Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the α subunit. Science 276:1878.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Núcleo 12

12-1. El núcleo es uno de los compartimientos esenciales de la célula eucariota

La presencia del núcleo es la principal característica que distingue a las células eucariotas. El núcleo ocupa un 10% del volumen total de la célula y en él se halla confinado el ADN, excepto el de las mitocondrias. Lo delimita la **carioteca** o **envoltura nuclear**, compuesta por dos membranas concéntricas que se continúan con la membrana del RE (fig. 12-1).

La carioteca posee numerosas perforaciones —llamadas **poros**—, que comunican el interior del núcleo con el citosol. Además se encuentra reforzada por dos mallas de filamentos intermedios, una que se apoya sobre la superficie interna de la envoltura —la lámina nuclear vista en el capítulo 5-3— y otra que lo hace sobre la superficie externa (fig. 12-1).

En el compartimiento nuclear se localizan:

1) Cuarenta y seis **cromosomas**, cada uno formado por una sola molécula de ADN combinada con numerosas proteínas.

2) Varias clases de **ARN** (mensajero, ribosómicos, de transferencia, pequeños), que se sintetizan en el núcleo al ser transcriptos sus genes. Estos ARN salen del núcleo por los poros de la envoltura nuclear después de su procesamiento (cap. 15).

3) El **nucléolo**, donde se localizan los genes de los ARNr y los ARNr recién sintetizados.

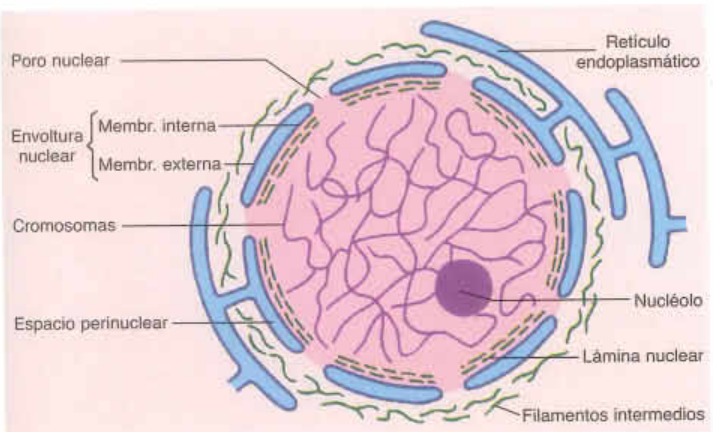


Fig. 12-1. Representación gráfica del núcleo celular. Obsérvese la lámina nuclear (constituida por laminofilamentos) y la envoltura nuclear como parte integrante del sistema de endomembranas.

4) Diversas **proteínas**, como las que regulan la actividad de los genes, las que promueven el procesamiento de los ARN, las que se combinan con los ARNr en el nucléolo, las ADN polimerasas, las ARN polimerasas, etc. Estas proteínas son fabricadas en el citosol e ingresan en el núcleo por los poros de la envoltura nuclear.

5) Los elementos mencionados se hallan dispersos en la **matriz nuclear** o **nucleoplasma**, cuya composición es escasamente conocida.

ENVOLTURA NUCLEAR

12-2. La envoltura nuclear está compuesta por dos membranas concéntricas atravesadas por poros

Hemos dicho que la **envoltura nuclear** o **carioteca** está compuesta por dos membranas concéntricas. Estas se unen a nivel de los poros, los cuales se hallan distribuidos más o menos regularmente por toda la envoltura (figs. 12-1, 12-2 y 23-5).

El espacio entre la membrana externa y la membrana interna —o **espacio perinuclear**— se comunica con la cavidad del RE. La membrana externa se continúa con la membrana del RE y es común que aparezca tachonada de ribosomas (fig. 12-2). Las proteínas que se sintetizan en estos ribosomas se

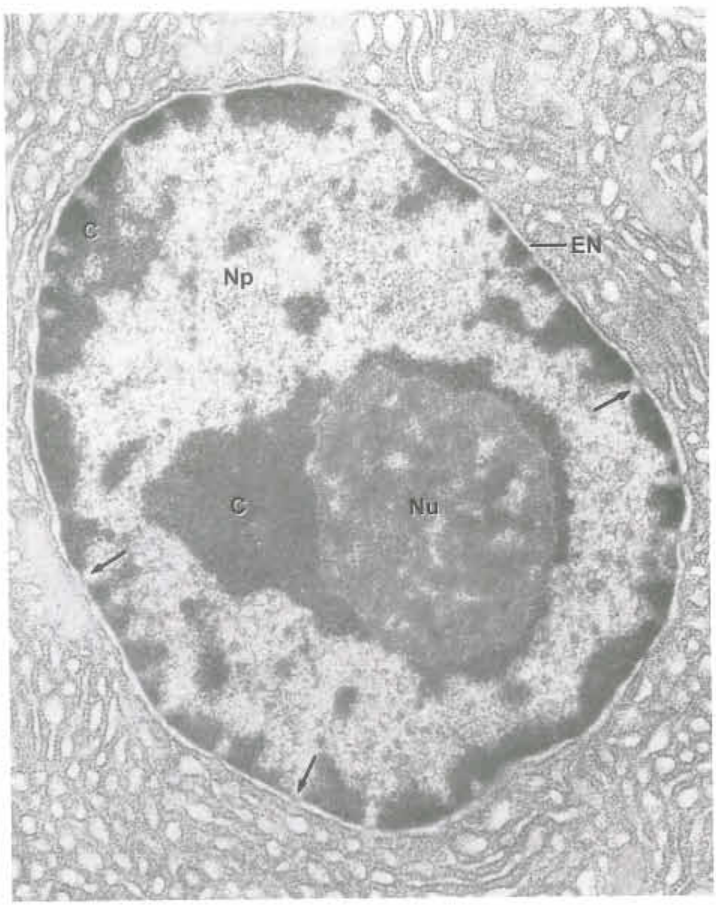


Fig. 12-2. Micrografía electrónica del núcleo de una célula pancreática. *Np*, nucleoplasma. Parte de la cromatina (*C*) se encuentra junto al nucléolo (*Nu*) y parte junto a la cara interna de la envoltura nuclear (*EN*), excepto a nivel de los poros nucleares (*flechas*). Obsérvese la cara externa de la envoltura nuclear cubierta de ribosomas. 24.000×. (Cortesía de J. André.)

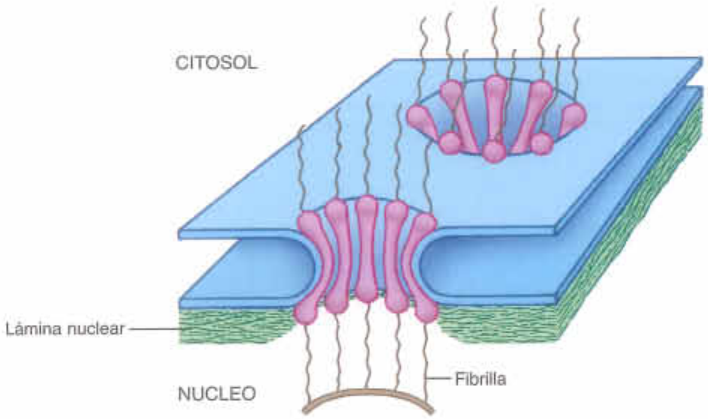


Fig. 12-3. Esquema de la envoltura nuclear, formada por dos membranas que se continúan a nivel de los poros nucleares. Los complejos del poro presentan simetría radial octogonal. La lámina nuclear cubre la cara interna de la envoltura, salvo en los poros.

incorporan a las membranas de la envoltura o se vuelcan en el espacio perinuclear.

La envoltura nuclear es sostenida por la **lámina nuclear** (cap. 5-3), que es un delgado entramado de laminofilamentos adherido a la membrana nuclear interna, excepto a nivel de los poros (figs. 12-1, 12-3 y 12-4). En el capítulo 5-3 se mencionó que los laminofilamentos se componen de tres clases de monómeros, las **laminas A, B** y **C**.

La lámina nuclear se encuentra anclada a la membrana nuclear interna por medio de las laminas B, las cuales contienen —en su extremo carboxilo— un ácido graso insertado en la bicapa lipídica de dicha membrana (cap. 3-4) (fig. 3-10). Este anclaje de la lámina nuclear, si bien es importante, no es suficiente, de ahí que se encuentre reforzado por la unión de las tres laminas tanto a proteínas integrales de la membrana nuclear interna como a proteínas de los poros nucleares.

Durante la interfase la lámina nuclear determina la forma de la carioteca —que por lo general es esférica— y le otorga resistencia mecánica. Además, la lámina posee sitios de unión específicos para que los cromosomas se sujeten a ella, y provee una especie de soporte que posibilita el ordenamiento y la distribución espacial de la mayoría de los componentes nucleares (sección 12-14).

En el capítulo 18-18 se verá que la lámina nuclear se desarma al comienzo de la mitosis como consecuencia de la fosforilación de las laminas, y que reaparece cuando concluye la mitosis, al formarse los núcleos de ambas células hijas.

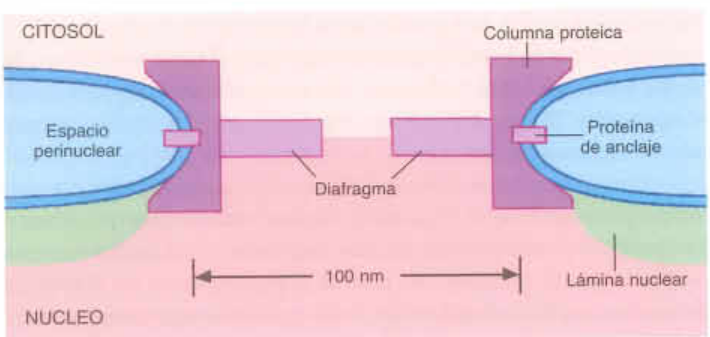


Fig. 12-4. Esquema del complejo del poro con sus distintos componentes.

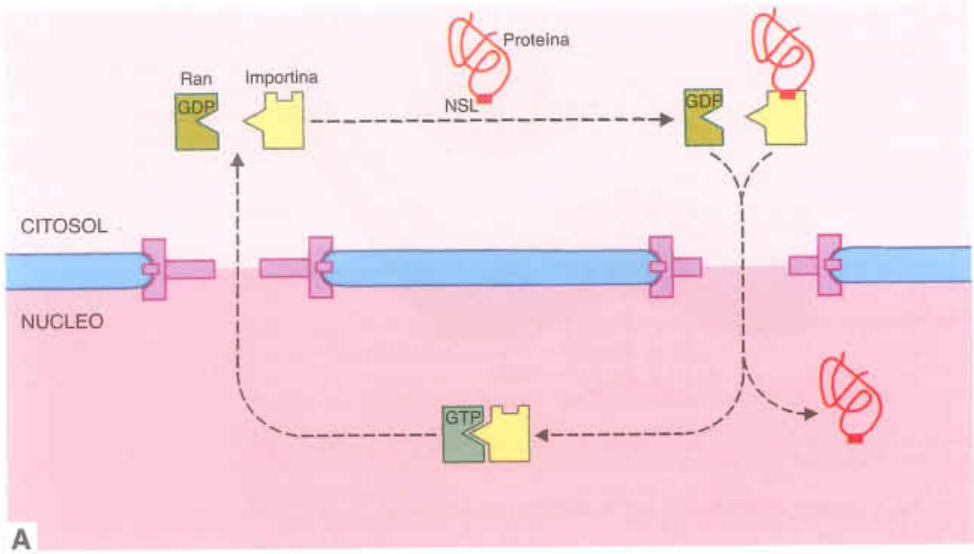


Fig. 12-5. A. Pasaje de proteínas desde el citosol hasta el núcleo a través del complejo del poro.

12-3. Los poros de la envoltura nuclear son estructuras complejas

Los 3.000 a 4.000 **poros** que posee la envoltura nuclear son mucho más que simples canales entre el nucleoplasma y el citosol. En ellos existe un conjunto de proteínas llamadas **nucleoporinas**, las cuales componen una estructura denominada **complejo del poro** que consta de los siguientes elementos (figs. 12-3 y 12-4):

1) **Ocho columnas proteicas** que forman una pared cilíndrica en torno a la cual la membrana externa de la carioteca se continúa con la membrana interna. En el lado citosólico los extremos de las columnas proteicas componen un anillo o boca externa del poro nuclear. En el lado interno ocurre algo similar.

2) **Proteínas de anclaje** que amarran las columnas proteicas a la envoltura nuclear. Cada proteína se liga a una de las columnas, atraviesa la membrana de la envoltura y su extremo sobresale en el espacio perinuclear.

3) **Proteínas radiales** que surgen de las columnas y se orientan hacia el centro del poro. Dado que se acortan y se alargan, convierten al complejo del poro en un ***diafragma***.

4) **Fibrillas proteicas** que nacen de las bocas interna y externa del complejo y se proyectan hacia el nucleoplasma y el citosol, respectivamente. Además, una fibra circular une entre sí los extremos distales de las fibrillas que parten de la boca interna. Más adelante se verá que las fibrillas proteicas intervienen en el pasaje de las proteínas a través del poro (fig. 12-6).

El complejo del poro mide alrededor de 30 nm de altura y 100 nm de diámetro. Sin embargo, las proteínas radiales reducen su orificio, cuyo diámetro fluctúa entre 9 y 25 nm. A través de él pasan iones y moléculas pequeñas y grandes en ambas direcciones.

Generalmente, los iones y las moléculas pequeñas se transfieren en forma pasiva, sin gasto de energía. En cambio, las macromoléculas (proteínas y moléculas de ARN), antes de pasar fuerzan el acortamiento de las proteínas radiales, por lo que el complejo del poro se comporta como un diafragma que adapta su abertura a las dimensiones de las moléculas que deben atravesarlo.

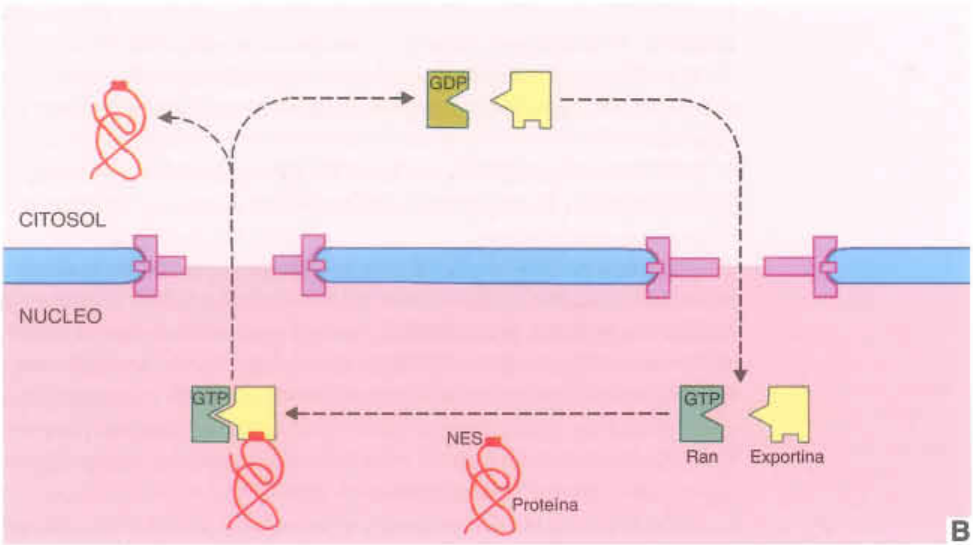


Fig. 12-5. B. Pasaje de proteínas desde el núcleo hasta el citosol a través del complejo del poro.

12-4. El pasaje de macromoléculas a través del complejo del poro es regulado

Las macromoléculas que ingresan en el núcleo son las proteínas reseñadas en la sección 12-1 y unos ARN pequeños que retornan al compartimiento nuclear después de haberlo abandonado temporalmente (cap. 15-12). En cambio, las macromoléculas que salen del núcleo son proteínas envejecidas o que dejaron de funcionar —ya que deben dirigirse al citosol a fin de ser destruidas por proteasomas— y diversos tipos de ARN combinados con proteínas.

Entrada de proteínas en el núcleo. A diferencia de las proteínas destinadas a las mitocondrias y a los peroxisomas —que como se vio en los capítulos 8-28 y 10-5 se pliegan después que ingresaron a esos organoides—, las destinadas al núcleo ingresan estando plegadas, ya que adquieren sus estructuras terciarias y cuaternarias en el citosol, apenas terminan de sintetizarse (cap. 4-5).

La entrada de las proteínas en el núcleo se realiza mediante un mecanismo selectivo que permite el ingreso sólo de las apropiadas, las cuales poseen un **péptido señal** específico que abre el camino para que puedan pasar por el complejo del poro.

Los péptidos señal más estudiados se llaman **NSL** (por *nuclear signal localization*) (cap. 4-4). Como muestra la figura 12-5A, no interactúan directamente con el complejo del poro sino mediante una proteína heterodimérica denominada **importina**. Debido a que existen distintos tipos de NSL para diferentes grupos de proteínas destinadas al núcleo, cada tipo de NSL requiere una importina especial. Por otra parte, existen NSL que se unen a proteínas distintas de las importinas, entre las que se encuentran unas que se volverán a mencionar más adelante, llamadas **transportinas**.

El pasaje de una proteína desde el citosol al núcleo a través del complejo del poro se produce en varias etapas. Son las siguientes y se ilustran en la figura 12-5A:

1) La proteína se une a la importina por medio del NSL y ambas molécu-

las se colocan cerca del complejo del poro. Lo atraviesan previo agrandamiento de su diafragma, cuyo diámetro puede alcanzar los 25 nm.

2) El pasaje requiere que la importina sea guiada por las fibrillas proteicas externas e internas del complejo del poro, de la manera ilustrada en la figura 12-6.

3) Durante el pasaje se gasta un GTP, cuya hidrólisis está a cargo de una proteína llamada **Ran** (por *Ras-related nuclear protein*). Como se ve, se trata de un transporte activo.

4) La Ran pertenece a la familia de GTPasas que actúan asociadas a las proteínas reguladoras GEF y GAP. En los capítulos 7-38 y 11-12 se dijo que cuando son influidas por la **GEF**, estas GTPasas intercambian el GDP incluido en sus moléculas por un GTP, mientras que cuando son influidas por la **GAP** hidrolizan el GTP a GDP y P (fig. 11-9). La GEF y la GAP que se asocian a la Ran se localizan en el núcleo y en el citosol, respectivamente.

5) Como muestra la figura 12-5A, cuando el complejo importina-proteína ingresa en el núcleo lo hace también la Ran-GDP.

6) En el núcleo la GEF promueve el reemplazo del GDP de la Ran por un GTP, tras lo cual la Ran-GTP se une al complejo importina-proteína.

7) Esa unión hace que la importina se independice de la proteína, que queda retenida en el núcleo.

8) En cambio, la importina y la Ran-GTP permanecen unidas, atraviesan el complejo del poro y retornan al citosol.

9) En el citosol la GAP induce a la Ran a que hidrolice el GTP a GDP y P —es aquí donde se gasta el GTP—, de lo que resulta una Ran-GDP y su separación de la importina.

10) Finalmente, la Ran-GDP y la importina libres pueden ser reutilizadas para hacer ingresar nuevas proteínas en el núcleo.

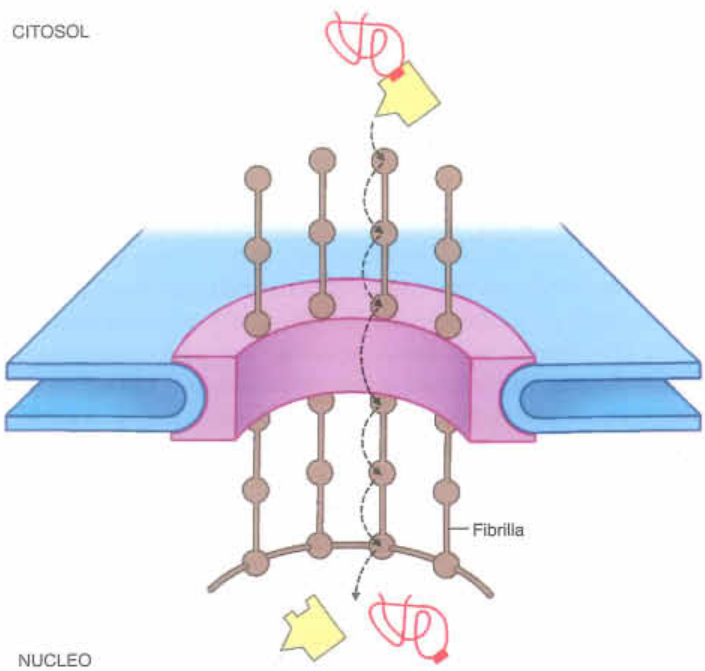


Fig. 12-6. Esquema del complejo del poro en el que se ilustra la función de las fibrillas proteicas que se proyectan hacia el nucleoplasma y el citosol.

Cabe señalar que ciertas proteínas destinadas al núcleo —en particular los receptores de las hormonas esteroideas—, después de sintetizarse permanecen en el citosol hasta la llegada de esas hormonas (fig. 11-2). Como se vio en el capítulo 11-6, los receptores son retenidos porque se les unen chaperonas de la familia hsp90 y adquieren formas que les impiden ingresar en el núcleo. Cuando llegan las hormonas esteroideas, se separan las chaperonas y cambian de forma los receptores, lo que les permite atravesar los poros de la envoltura nuclear (fig. 11-3).

Salida de proteínas y de moléculas de ARN. Las proteínas que salen del núcleo dependen también de la Ran y de señales específicas para poder atravesar los poros de la envoltura nuclear. Los péptidos señal se denominan **NES** (por *nuclear export signal*) y son reconocidos por proteínas equivalentes a las importinas, llamadas **exportinas**. Además existen NES que son reconocidos por transportinas.

El pasaje de una proteína desde el núcleo al citosol a través del complejo del poro se produce en varias etapas. Son las siguientes y se ilustran en la figura 12-5B:

1) La proteína se une a la exportina por medio del NES. Simultáneamente, la GEF remueve el GDP de una Ran-GDP y lo reemplaza por un GTP, de modo que se forma una Ran-GTP.

2) La Ran-GTP se une a la proteína por medio de la exportina.

3) Unidas entre sí, la Ran-GTP, la proteína y la exportina se acercan al poro nuclear y lo atraviesan previo agrandamiento de su diafragma, cuyo diámetro puede alcanzar los 25 nm.

4) Al igual que la importina, durante el pasaje la exportina es guiada por las fibrillas proteicas del complejo del poro.

5) Al cabo del pasaje, inducida por la GAP, la Ran-GTP hidroliza el GTP a GDP y P, de lo que resulta una Ran-GDP.

6) Ello hace que la Ran-GDP se independice de la exportina, la cual, a su vez, se independiza de la proteína.

7) La proteína queda retenida en el citosol. En cambio, la Ran-GDP y la exportina retornan al núcleo separadamente.

8) Finalmente, la Ran-GDP y la exportina libres pueden ser reutilizadas para transferir nuevas proteínas hacia el citosol.

Respecto de las moléculas de ARN, salen del núcleo combinadas con proteínas, aunque están impedidas de hacerlo si no iniciaron o completaron sus procesamientos (capítulo 15). Su pasaje a través de los poros nucleares depende de la Ran y de transportinas que reconocen señales específicas en las proteínas.

CROMOSOMAS

12-5. El material con el que están formados los cromosomas es la cromatina

Cada cromosoma está constituido por una larguísima molécula de **ADN** asociada con diversas proteínas. Según el cromosoma, el ADN contiene entre 50 y 250 millones de pares de bases. Las proteínas asociadas se clasifican en dos grandes grupos: las **histonas** y un conjunto heterogéneo de **proteínas no histónicas**.

El complejo formado por el ADN, las histonas y las proteínas no histónicas se llama **cromatina**. Así, la cromatina es el material con el que están compuestos los cromosomas.

12-6. El cromosoma posee un centrómero, dos telómeros y numerosos orígenes de replicación

En los cromosomas existen estructuras que son imprescindibles para la replicación, es decir, para la duplicación que experimenta el ADN y sus proteínas asociadas antes de la división celular. Son las siguientes (fig. 12-7):

1) El **centrómero** o **constricción primaria**, que participa en el reparto a las células hijas de las dos copias cromosómicas que se generan a consecuencia de la replicación del ADN (cap. 18-9).

2) Los **telómeros**, que corresponden a los extremos de los cromosomas, cuyo ADN se replica de un modo distinto al resto del ADN. En la próxima sección y en el capítulo 17-9 se verá que el ADN telomérico contiene una secuencia de nucleótidos especial, que se repite muchas veces. Además, debido a su ubicación está expuesto a los siguientes riesgos: puede fusionarse con el ADN de otros telómeros o puede ser degradado por una nucleasa. Normalmente estas contingencias no ocurren porque el ADN telomérico se dobla sobre sí mismo (adopta la forma de un lazo) y es protegido por un capuchón de proteínas llamadas **TRF** (por *telomeric repeat binding factor*) (fig. 17-12).

3) En el capítulo 17-4 se verá que la enorme longitud del ADN exige que su replicación se inicie en muchos puntos a la vez a fin de que su duración sea relativamente breve. Estos puntos se denominan **orígenes de replicación** y en ellos el ADN posee secuencias de nucleótidos especiales. Más aún, todos los orígenes de replicación tienen en común secuencias conservadas de alrededor de una docena de nucleótidos llamadas **ARS** (por *autonomous replication sequence*), de las que nos volveremos a ocupar en dicho capítulo.

12-7. Los cromosomas poseen secuencias de ADN únicas y secuencias de ADN repetidas

En las moléculas de ADN se halla depositada la **información genética** de la célula, y todas las células poseen conjuntos virtualmente idénticos de moléculas de ADN. La totalidad de la información genética depositada en el ADN lleva el nombre de **genoma**. Puede decirse que esa información rige la actividad del organismo desde el primer instante del desarrollo embrionario hasta la muerte del individuo. De ella también depende la inmunidad o la predisposición del organismo a determinadas enfermedades.

La capacidad o incapacidad funcional del ADN, es decir, su aptitud o su incompetencia para generar moléculas de ARN (proceso conocido con el nombre de transcripción del ADN), se basa en la secuencia de sus nucleótidos. Así, en algunos sectores el ADN exhibe secuencias de nucleótidos que se transcriben —llamadas **genes**— y en otros presenta secuencias aparentemente prescindibles, al menos a la luz del conocimiento actual.

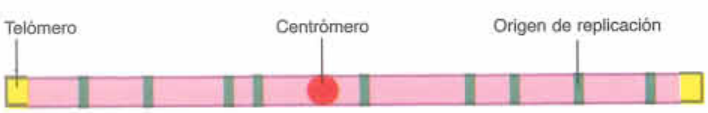


Fig. 12-7. Esquema de un cromosoma, con el centrómero, los telómeros y algunos orígenes de replicación.

Uno de los mayores retos que enfrentan los biólogos moleculares es descifrar las funciones de las secuencias de ADN ajenas a los genes. Estudios recientes sugieren que la mayoría de esas secuencias regulan la expresión genética, de modo que actuarían sobre ciertos genes determinando cómo, cuándo y con qué duración deben expresarse.

Más de la mitad del ADN se halla representado por secuencias de nucleótidos no repetidas (copias únicas) o que se repiten unas pocas veces. La mayoría de los genes se localizan en esta parte del ADN.

El resto del ADN corresponde a secuencias de nucleótidos que se repiten muchas veces. Existen dos clases de este **ADN repetitivo**: el dispuesto en tandas (en el cual el inicio de una repetición se halla inmediatamente después del final de la otra) y el disperso (cuyas copias no se encuentran agrupadas sino dispersas en distintos puntos de los cromosomas).

ADN repetitivo dispuesto en tandas. A esta categoría pertenecen los ADN satélites, los microsatélites y los minisatélites.

En los **ADN satélites** el largo de la secuencia repetida, el número de veces que se repite en cada tanda y el número de tandas varían. El ADN satélite más destacado se localiza en los centrómeros, y por ello se encuentra en todos los cromosomas (fig. 12-17). Incluye una secuencia repetida de 171 pares de bases a la que se le ha dado el nombre de ***secuencia alfoide***, que varía muy poco en los distintos cromosomas. Otros ADN satélites se localizan en el brazo largo del cromosoma Y y en la cromatina aledaña a los centrómeros de los cromosomas 1, 3, 9, 16 y 19 (más adelante se indicará el significado de la numeración de los cromosomas).

Los **microsatélites** poseen secuencias de ADN repetidas mucho más cortas que las de los ADN satélites, e igual que éstos están en todos los cromosomas.

Los **minisatélites** también contienen secuencias de ADN cortas. A esta categoría pertenece el ***ADN repetitivo de los telómeros*** (sección 12-6 y cap. 17-9) (fig. 17-12) y el ***ADN hipervariable***, llamado así porque es distinto en cada individuo. El ADN hipervariable se localiza principalmente en las proximidades de los centrómeros y, debido a que su herencia responde a las leyes mendelianas, la medicina forense recurre a él cuando necesita realizar estudios de paternidad o de identidad de personas.

ADN repetitivo disperso. Existen dos clases de ADN repetitivo disperso, llamadas SINE y LINE (por *short* y *long interspread nuclear elements*).

El ***SINE*** más estudiado corresponde a la familia **Alu**, cuyas copias —repartidas en todos los cromosomas— constituyen el 13% del genoma humano. Cada copia tiene cerca de 300 nucleótidos y un sitio que puede ser cortado por la enzima de restricción ***Alu I*** (de allí el nombre de este ADN). Debido a que las secuencias Alu poseen una extensa homología con la secuencia del gen del ARNpc, se las asocia con este gen (caps. 13-2 , 13-11 y 14-18).

El ***LINE*** más común se conoce con la sigla **L1** (por *LINE-1*), cuyas copias ocupan alrededor del 21% del genoma humano. Su secuencia repetida es relativamente larga y contiene dos genes, uno de los cuales codifica una proteína de unión y el otro una proteína enzimática bifuncional, pues actúa como endonucleasa de restricción y como transcriptasa inversa (cap. 17-25).

Los ADN repetitivos dispersos Alu y L1 volverán a ser mencionados en el capítulo 17-25, dedicado a los transposones.

12-8. Las células somáticas humanas poseen 46 cromosomas

Las células somáticas humanas poseen **46 cromosomas** —y por consiguiente, 46 moléculas de ADN—, divididos en 22 pares de autosomas más un par de cromosomas sexuales (fig. 12-15). En la mujer los dos miembros del par sexual son iguales, pero no en el varón. Así, con excepción del par sexual en el varón, puede decirse que en cada célula existen dos juegos idénticos de **23 cromosomas**, uno aportado por el espermatozoide y el otro por el ovocito en el momento de la fecundación (cap. 19-19). Ello es lo que define a las células somáticas como **células diploides** y a los espermatozoides y los ovocitos como **células haploides**.

Los ADN de los 46 cromosomas contienen en conjunto unos 3×10^9 pares de nucleótidos. Por lo tanto, en promedio, una molécula de ADN de un cromosoma humano, si estuviera completamente extendida, mediría unos 4 cm de largo. Lógicamente, de hallarse extendidas, 46 moléculas de tamaña longitud no podrían ser contenidas en el núcleo, no sólo por el espacio que demandarían sino por los enredos que acarrearían, lo cual afectaría su funcionamiento e incluso su integridad.

La célula ha resuelto el problema haciendo que la molécula de ADN se enrolle sobre sí misma. Antes de analizar el modo como lo hace, debe señalarse que el grado de enrollamiento varía según el momento del ciclo en que se halla la célula: es mínimo durante la interfase (cuando la síntesis de ARN es alta) y máximo cuando la célula se apresta a dividirse. Así, los cromosomas se muestran como estructuras altamente variables. En el capítulo 18-6 se analizará el papel del enrollamiento del ADN durante la división celular.

12-9. Existen cinco clases de histonas comprometidas en el enrollamiento de la cromatina

Las **histonas** desempeñan un papel fundamental en el enrollamiento de la cromatina. Se trata de proteínas básicas que poseen una alta proporción de lisinas y argininas, es decir, de aminoácidos cargados positivamente (cap. 2-8). Ello contribuye a la unión de las histonas con las moléculas de ADN, en las que predominan las cargas negativas.

Existen cinco clases de histonas, llamadas **H1**, **H2A**, **H2B**, **H3** y **H4**. La H1, de la cual existen seis subclases, contiene unos 220 aminoácidos, mientras que las restantes poseen entre 103 y 135 aminoácidos cada una. Las cuatro últimas llevan el nombre de histonas nucleosómicas porque la molécula de ADN se enrolla en torno de ellas para formar los **nucleosomas**, que constituyen las unidades básicas del enrollamiento cromatínico. En cada nucleosoma, las histonas nucleosómicas se asocian y forman una estructura octamérica —el núcleo del nucleosoma—, compuesta por dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4 (fig. 12-8).

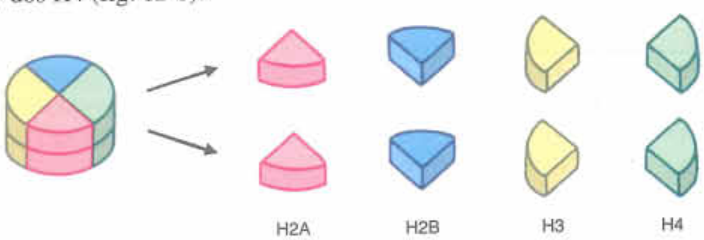


Fig. 12-8. Los cuatro pares de histonas que componen el núcleo del nucleosoma.

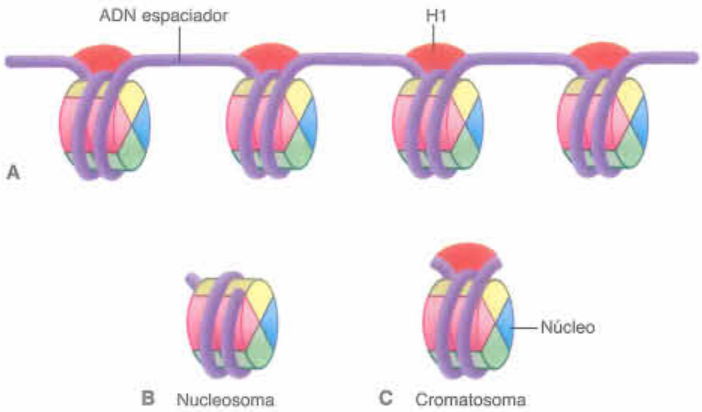


Fig. 12-9. A. Cromatina intacta de 10 nm. **B.** Nucleosoma liberado después de la digestión intensa con una nucleasa, con el núcleo histónico y 146 pares de nucleótidos. **C.** Cromatosoma escindido luego de la digestión moderada con una nucleasa, con el núcleo del nucleosoma, la histona H1 y 166 pares de nucleótidos.

Debe agregarse que los extremos amino —o "colas"— de las histonas se proyectan hacia fuera del nucleosoma, lo cual podrá valorarse en el capítulo 14-12, dedicado al estudio de la regulación de la actividad de los genes.

El octámero de histonas posee la forma de un cilindro bajo de **10 nm** de diámetro y se halla envuelto por un pequeño tramo de ADN que recorre su circunferencia casi dos veces (fig. 12-9B). Cada vuelta equivale a 81 pares de nucleótidos, y en total el segmento de ADN asociado al nucleosoma contiene 146 pares de nucleótidos.

Como muestra la figura 12-9A, las dos vueltas del ADN se fijan al núcleo del nucleosoma merced a la histona H1. El complejo formado por el nucleosoma más la histona H1 recibe el nombre de **cromatosoma** (fig. 12-9C) y el segmento de ADN que se le asocia es de 166 pares de nucleótidos, veinte más que el segmento de ADN del nucleosoma.

En la cromatina existen dos proteínas accesorias —ambas ácidas— que

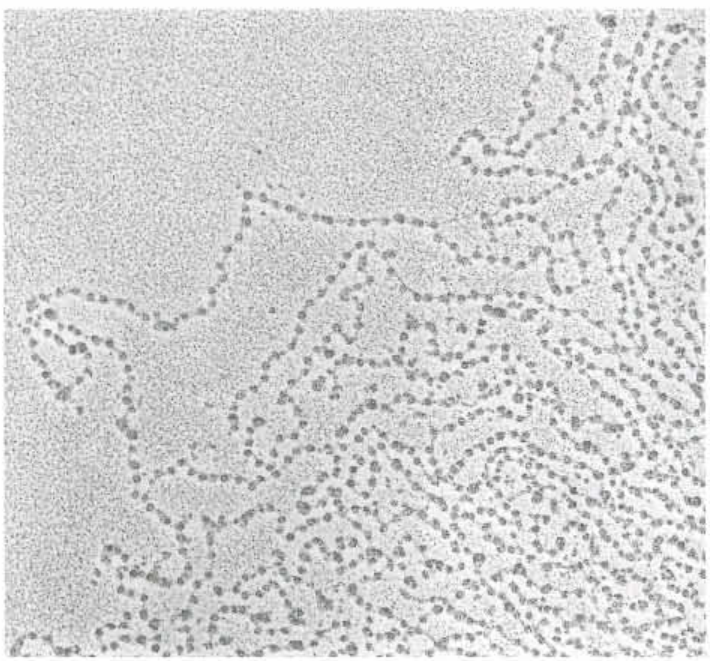


Fig. 12-10. Cromatina extendida para microscopia electrónica, con apariencia de collar de cuentas y un espesor de 10 nm.

asisten a las histonas para que se liguen entre sí. Se denominan **proteína N1** y **nucleoplasmina**. La primera asocia a la H3 con la H4; la segunda, a la H2A con la H2B.

Los nucleosomas se hallan separados por tramos de **ADN espaciadores** de longitud variable, que contienen entre 20 y 60 pares de nucleótidos. Como muestran las figuras 12-9A, 12-10 y 12-12B, la alternancia de los nucleosomas con los segmentos espaciadores le da a la cromatina la apariencia de un collar de cuentas. Puesto que comúnmente un gen contiene unos 10.000 pares de nucleótidos, posee alrededor de 50 nucleosomas separados por otros tantos ADN espaciadores.

El tratamiento de la cromatina con enzimas que digieren el ADN (nucleasas) provoca cortes sólo en los ADN espaciadores. Si el tratamiento es moderado, se independizan los cromatosomas, los cuales permanecen íntegros, tanto sus histonas como el ADN asociado a ellas (fig. 12-9C). Pero cuando la digestión enzimática es intensa se obtienen nucleosomas (fig. 12-9B).

Para que pueda ser contenida en el pequeño espacio que el núcleo le ofrece, la cromatina de cada cromosoma debe experimentar nuevos y sucesivos grados de enrollamiento, cada vez mayores. Estos nuevos enrollamientos son inducidos por un complejo de proteínas nucleares llamadas **condensinas**.

En primer término, los cromatosomas se enrollan sobre sí mismos y dan lugar a una estructura helicoidal llamada **solenoide**, de **30 nm** de diámetro (figs. 12-11 y 12-12C). Como muestra la figura 12-11, este enrollamiento depende de las histonas H1 —dado que se unen entre sí— y cada vuelta del solenoide contiene seis nucleosomas.

Debe señalarse que a intervalos más o menos regulares el enrollamiento

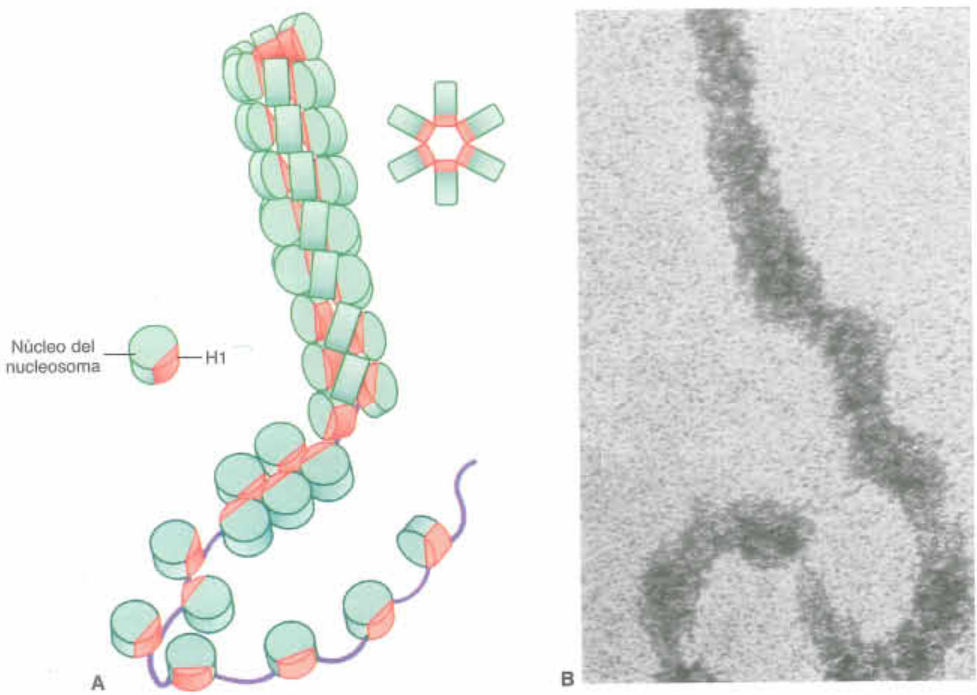


Fig. 12-11. A. Cromatina de 30 nm de diámetro. (De F. Thoma, T. Koller y A. Klug.) **B.** Micrografía electrónica de una fibra de cromatina de 30 nm de diámetro. (Cortesía de J. B. Rattner y B. A. Hamkalo.)

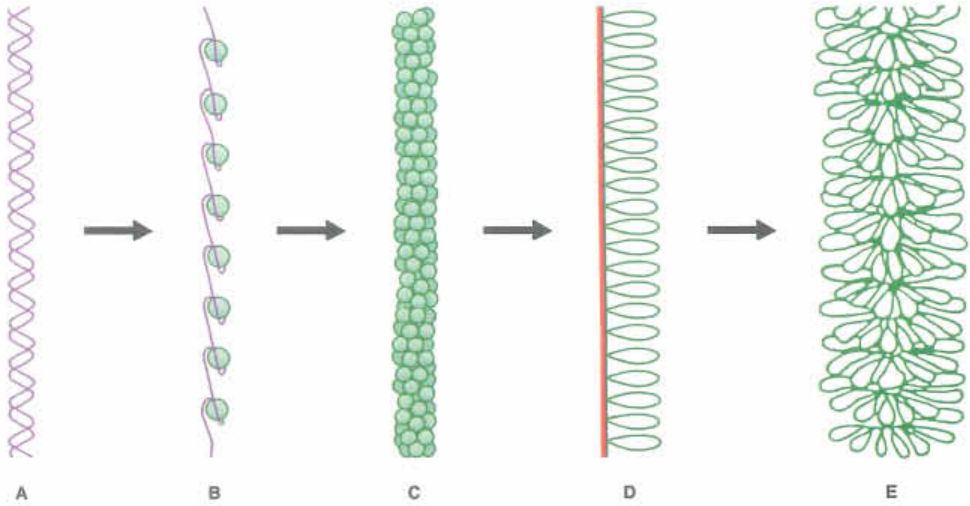


Fig. 12-12. Sucesivos grados de enrollamiento que experimenta la cromatina.

de las fibras de 30 nm se interrumpe, de modo que se observan —entre sectores de 30 nm— tramos de cromatina más delgada. En ellos el ADN se encuentra asociado a proteínas no histónicas, en su mayoría reguladoras de la actividad génica (cap. 14-5).

La cromatina se compacta todavía más. Así, la fibra de 30 nm forma **lazos** de variada longitud, los cuales nacen de un cordón proteico constituido por proteínas no histónicas (figs. 12-12D y 12-13). Dado que el conjunto de cordones proteicos compone una suerte de andamiaje, en los extremos de cada lazo el ADN asociado al cordón proteico lleva el nombre de **SAR** (por *scaffold associated regions*). Los lazos se hallan firmemente unidos al cordón, pero se ignora cómo se sujetan a él las SAR.

Se considera que cada lazo constituiría una unidad de replicación del ADN (cap. 17-3) y, probablemente, una unidad de transcripción, es decir, un gen (cap. 14-12).

12-10. La cromatina puede ser eucromática o heterocromática

En algunos sectores la cromatina experimenta un grado de enrollamiento aún mayor, como se observa en la figura 12-12E. Durante la interfase, la cromatina así condensada recibe el nombre de **heterocromatina**, y se reserva el de **eucromatina** para la menos compactada (fig. 12-2).

Por lo general hay una relación directa entre el grado de enrollamiento y la actividad transcripcional del ADN, ya que la cromatina menos compactada es la que posee el ADN transcripcionalmente activo —es decir, el ADN que origina moléculas de ARN— y la cromatina más condensada es la que contiene el ADN inactivo desde el punto de vista transcripcional. Sin embargo, debe señalarse que existen vastos sectores de ADN pertenecientes a la eucromatina que no se transcriben, y que algunos pertenecientes a la heterocromatina sí lo hacen.

Las regiones eucromáticas experimentan ciclos de contracción y extensión. En el capítulo 14-12 se analizarán los mecanismos que regulan el enrollamiento de la cromatina y el papel que desempeñan en el control de la actividad génica.

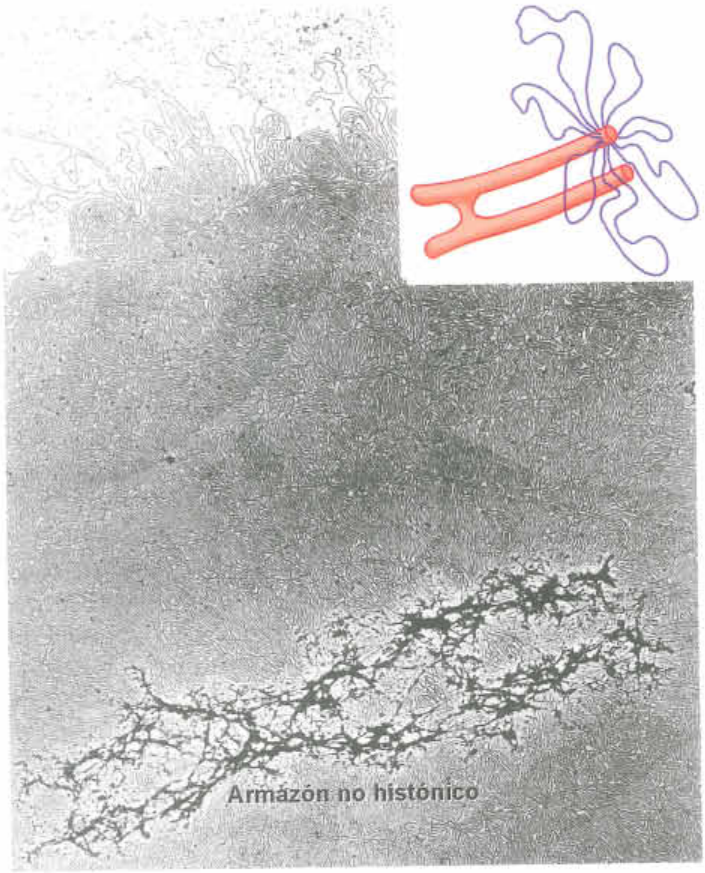


Fig. 12-13. Micrografía electrónica de un cromosoma humano al que se le extrajeron las histonas. Ciertas proteínas no histónicas forman un armazón, del que emergen lazos o bucles de ADN de diferente longitud, como se ilustra en el recuadro superior. (Cortesía de U. Laemmli.)

12-11. La heterocromatina puede ser constitutiva o facultativa

Durante la interfase, recibe el nombre de **heterocromatina constitutiva** la cromatina altamente condensada que se encuentra de manera constante en todos los tipos celulares, es decir, como un componente estable del genoma, no convertible en eucromatina. A esta categoría pertenece la cromatina de los sectores cromosómicos que poseen ADN repetitivo satélite —como el de los centrómeros, el del brazo largo del cromosoma Y, etc. (sección 12-7)—, la cromatina de los telómeros y la mayor parte de la cromatina que forma los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (sección 12-12).

En cambio, se denomina **heterocromatina facultativa** a la que se detecta en localizaciones que varían en los distintos tipos celulares o en las sucesivas diferenciaciones de una célula dada, de modo que sectores que aparecen como heterocromatina en un tipo celular o en una etapa de su diferenciación, en otros tipos celulares y en otras etapas se presentan como eucromatina.

El ejemplo más notorio de heterocromatina facultativa corresponde a uno de los cromosomas X de la mujer, el cual se halla totalmente compactado (salvo en algunos sectores) y se conoce como ***cromatina sexual*** o ***cuerpo de Barr***. Esta heterocromatina se presenta durante toda la vida de la mujer (menos al comienzo del desarrollo embrionario), en todas las células del organismo (excepto en los ovogonios).

12-12. En el cariotipo los cromosomas se ordenan de acuerdo con sus tamaños y las posiciones de sus centrómeros

Como se describirá en los capítulos 18 y 19, durante el ciclo celular, según que la célula esté atravesando la interfase o se esté dividiendo —por mitosis o por meiosis—, los cromosomas pasan de estados de menor a mayor compactación. El grado más alto de enrollamiento se alcanza en la etapa de división llamada ***metafase***, en que la cromatina de los cromosomas muestra un estado de condensación similar al de la heterocromatina interfásica (fig. 12-14).

Tal grado de compactación hace que los cromosomas lleguen a verse como estructuras individuales, las cuales, una vez fijadas y fotografiadas, pueden ser aisladas, clasificadas y ordenadas con relativa facilidad. El conjunto de cromosomas ordenados según un criterio preestablecido recibe el nombre de **cariotipo** (fig. 12-15).

Las 46 unidades normalmente presentes en las células humanas consisten en 23 pares de homólogos. Como vimos, 22 de ellos están presentes tanto en la mujer como en el varón y reciben el nombre de **autosomas**. El par restante —que se conoce como **par sexual**— en la mujer se halla integrado por dos cromosomas idénticos, los cromosomas X, y en el varón por dos cromosomas bastante disímiles, pues uno de ellos es un cromosoma X y el otro es el pequeño cromosoma Y.

Los cromosomas metafásicos presentan una morfología característica. Están integrados por dos componentes filamentosos —las **cromátidas**— unidos por el **centrómero** (o constricción primaria).

Como se verá en el capítulo 18-9, el centrómero desempeña un papel esencial en la separación de las cromátidas hermanas durante la anafase, que sigue a la metafase. A consecuencia de tal separación, una vez segregadas en las respectivas células hijas, cada una de las cromátidas se convierte en un cromosoma.

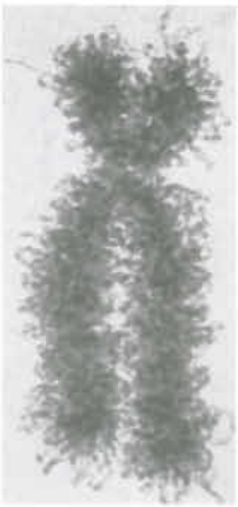


Fig. 12-14. Micrografía electrónica de un cromosoma en metafase. (Cortesía de E. J. Dupraw.)

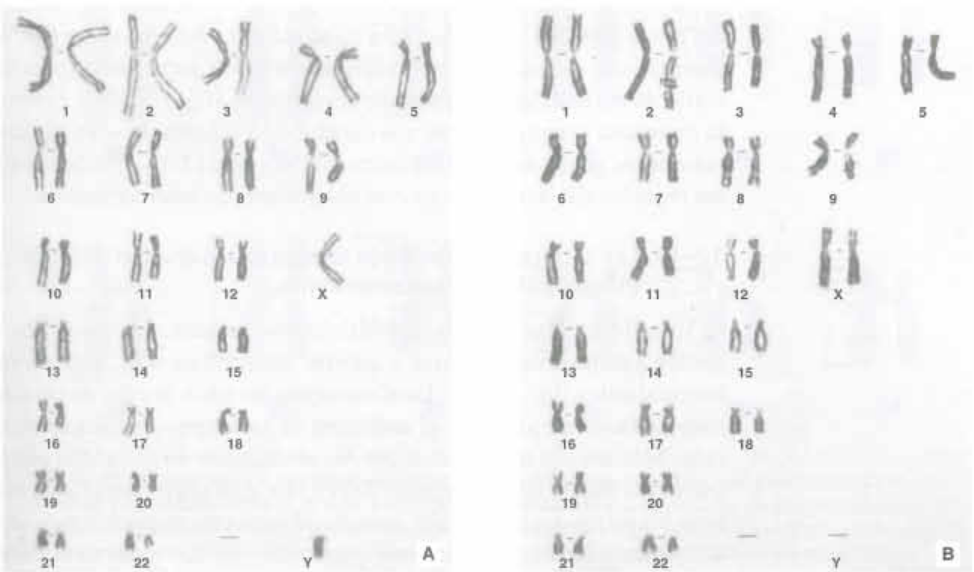


Fig. 12-15. Cariotipos humanos normales. **A.** Masculino. **B.** Femenino. (Cortesía de M. Drets.)

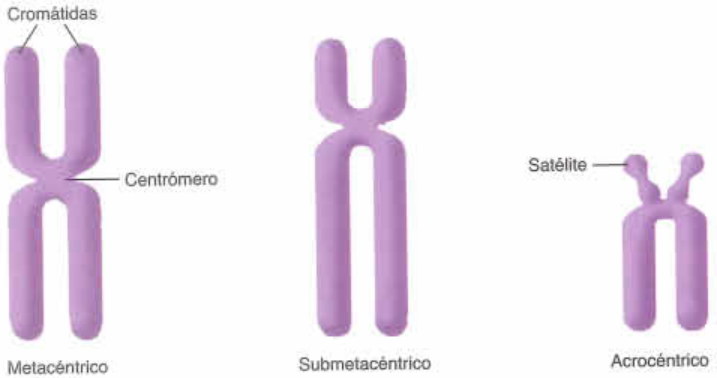


Fig. 12-16. Tipos de cromosomas según la posición del centrómero.

La presencia del centrómero divide a las cromátidas del cromosoma metafásico en dos brazos, por lo general uno más largo que el otro. Al brazo corto se lo identifica con la letra p y al largo con la letra q. Los extremos de los brazos se denominan telómeros. De acuerdo con la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en tres grupos (fig. 12-16):

1) Los **metacéntricos** poseen el centrómero en una posición más o menos central, de modo que existe poca o ninguna diferencia en el largo de los brazos de las cromátidas.

2) En los **submetacéntricos** el centrómero se encuentra alejado del punto central, de modo que las cromátidas poseen un brazo corto y uno largo.

3) En los **acrocéntricos** el centrómero está cerca de uno de los extremos del cromosoma, por lo que los brazos cortos de las cromátidas son muy pequeños.

En la figura 12-15 se muestra un cariotipo humano en el que los cromosomas aparecen ordenados de acuerdo con su tamaño y el largo de sus cromátidas. Los miembros de cada par se identifican con números correlativos.

Los cromosomas acrocéntricos corresponden a los números 13, 14, 15, 21 y 22 (fig. 12-17). Poseen una pequeña masa de cromatina llamada **satélite** —no debe ser confundida con el ADN satélite— ubicada en el extremo libre del brazo corto. El satélite se halla ligado al resto del brazo corto por un delgado tallo de cromatina denominado **constricción secundaria** (para diferenciarlo de la constricción primaria o centrómero) (fig. 12-16). A excepción de la cromatina correspondiente a la constricción secundaria —en la cual se localizan los genes del ARN ribosómico 45S (cap. 13-8)—, el brazo corto de los cromosomas acrocéntricos está compuesto por heterocromatina.

12-13. Las técnicas de bandeado cromosómico revelan detalles estructurales de los cromosomas

Cuando los cromosomas metafásicos son sometidos a ciertas técnicas de tinción exhiben bandas claras y oscuras intercaladas a lo largo de sus ejes longitudinales (fig. 12-17). La distribución de estas bandas es constante en cada cromosoma, lo cual —al analizarse un cariotipo— facilita su identificación. Más aún, en los casos en que las ubicaciones no coinciden con los patrones normales, las bandas constituyen una guía muy valiosa para diagnosticar trastornos genéticos, por ejemplo, deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones cromosómicas (cap. 20-10). Las técnicas de **bandeado cromosómico** más utilizadas son las siguientes:

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

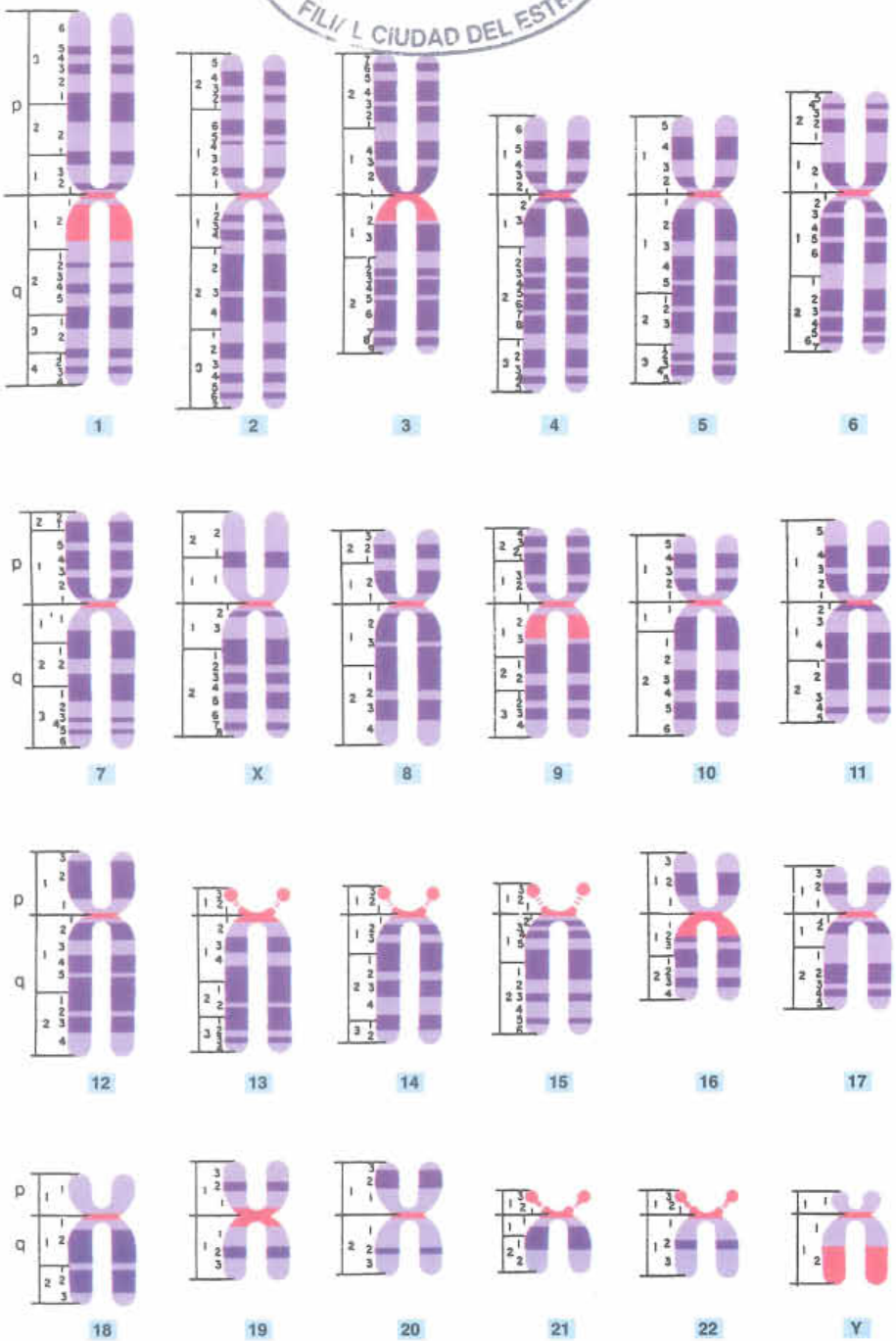


Fig. 12-17. Representación esquemática del cariotipo humano con bandeado, que muestra los 22 autosomas y los cromosomas X e Y. *p*, brazo corto; *q*, brazo largo. Los sectores de heterocromatina constitutiva (incluidos los de los centrómeros) aparecen en color rojo. Los números corresponden a las regiones y las bandas. Los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 contienen satélites y constricciones secundarias. En estas últimas se localizan los genes del ARNr 45S.

Bandeado G. Los cromosomas son tratados con tripsina (para desnaturalizar sus proteínas) y teñidos con el colorante de Giemsa. Las bandas G, que aparecen oscuras, contienen ADN ricos en pares de nucleótidos A-T.

Bandeado Q. Si los cromosomas son tratados con quinacrina desarrollan un patrón específico de bandas oscuras intercaladas con otras brillantes (Q), las cuales se identifican con la ayuda del microscopio de fluorescencia (cap. 23-25). Las bandas Q coinciden casi exactamente con las bandas G, por lo que también son ricas en pares de nucleótidos A-T.

Bandeado R. En este caso los cromosomas reciben calor antes de ser teñidos con el colorante de Giemsa, lo que da un patrón de bandas oscuras (bandas R) y claras inverso al conseguido con los bandeados G y Q. El análisis molecular de las bandas R muestra una mayor proporción de pares de nucleótidos G-C.

Bandeado C. Este método tiñe de manera específica los tramos de cromatina que permanecen condensados en la interfase, por ejemplo, la heterocromatina constitutiva de los centrómeros.

12-14. Los componentes nucleares se encuentran ordenados espacialmente

En el núcleo no existe un sistema de filamentos equivalente al del citosol, diseñado para sostener a los cromosomas y a los restantes componentes nucleares. No obstante, durante la interfase puede observarse que los cromosomas ocupan sitios especiales —denominados **territorios cromosómicos**—, los cuales están separados por áreas llamadas **dominios intercromosómicos**, donde se encuentran moléculas de ARN procesándose o en tránsito hacia los poros nucleares (cap. 15).

Como se mencionó en la sección 12-2, el ordenamiento y la distribución espacial de la mayoría de los elementos que residen en el núcleo son establecidos por la ***lámina nuclear***. Corresponde añadir que el componente de la lámina nuclear que viabiliza ese ordenamiento es la ***lamina A*** (cap. 5-3).

La localización de los genes que codifican los ARN ribosómicos constituye el caso más llamativo de ordenamiento nuclear, pues se agrupan en un sector del núcleo fácilmente identificable, como lo es el nucléolo (capítulo 13-8). En cambio, los patrones de distribución de los centrómeros y de la heterocromatina varían en las distintas clases de células y se modifican a lo largo del ciclo celular, aunque por lo general tienden a congregarse cerca de la envoltura nuclear y del nucléolo.

Los telómeros se localizan invariablemente junto a la envoltura nuclear debido a que están unidos a las laminas A de la lámina nuclear. En el capítulo 17-10 se analizará la importancia que tienen estas uniones en la preservación de los telómeros.

BIBLIOGRAFIA

Akhtar A. and Gasser S.M. (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. Nat. Rev. Genet. 8:507.

Bednenko J., Cingolani G. and Gerace L. (2003) Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. Traffic 4:127.

Bickmore W.A. and Sumner A.T. (1989) Mammalian chromosome banding—an expression of genome organization. Trends Genet. 5:144.

Britten R.J. and Kohne (1968) Repeated sequences in DNA. Science 161:529.

Burlingame R.W. et al. (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolu-

tion of 3.3 Å. Science 228:546.
Cole C.N. and Scarcelli J.J. (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. Curr. Opin. Cell Biol. 18:299.
Cremer T., Cremer M., Dietzel S. et al. (2006) Chromosome territories –a functional nuclear landscape. Curr. Opin. Cell Biol. 118:307.
Dechat T., Pfleghaar K., Sengupta K. et al. (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. Genes Dev 22:832.
DePamphilis M.L. (1993) Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. Curr. Opin. Cell Biol. 5:434.
Dingwall C. and Laskey R. (1992) The nuclear membrane. Science 258:942.
Edmondson D.G. and Roth S.Y. (1996) Chromatin and transcription. FASEB J. 10:1173.
Fahrenkrog B., Koser J. and Aebi U. (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? Trends Biochem. Sci. 29:175.
Featherstone C. (1997) Researchers get the first good look at the nucleosome. Science 277:1763.
Felsenfeld G. (1985) DNA. Sci. Am. 253 (4):58.
Felsenfeld G. and McGhee J.D. (1986) Structure of the 30 nm chromatin fiber. Cell 44:375.
Gall G. (1981) Chromosome structure and C-value paradox. J. Cell Biol. 91:35.
Gasser S.M. (2002) Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. Science 296:1412.
Gerace L. and Burke B. (1988) Functional organization of the nuclear envelope. Annu. Rev. Cell Biol. 4:335.
Goldfarb D.S. (1997) Nuclear transport: proliferating pathways. Curr. Biol. 7:R13.
Görlich D. and Mattaj I.W. (1996) Nucleocytoplasmic transport. Science 271:1513.
Heald R. and McKeon F. (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. Cell 61:579.
Hetzer M.W., Walther T.C. and Mattaj I.W. (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21:347.
Isenberg I. (1979) Histones. Ann. Rev. Biochem. 48:159.
Izaurralde E. and Mattaj I.W. (1992) Transport of RNA between nucleus and cytoplasm. Semin. Cell. Biol. 3:279.
Jeffreys A.J., Wilson V. and Thein S.C. (1985) Individual-specific fingerprints of human DNA. Nature 316:76.
Jenuwein T. (2006) The epigenetic magic of histone lysine methylation. FEBSJ 273:3121.
Jin J., Cai Y., Li B. et al. (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. Trends Biochem. Sci. 30:680.
Kahana J.A. and Cleveland D.W. (2001) Some importin news about spindle assembly. Science 291:1718.
Kitsberg D., Selig S. and Cedar H. (1991) Chromosome structure and eukaryotic gene organization. Curr. Opin. Genet. Dev. 1:534.
Kornberg R.D. and Klug A. (1981) The nucleosome. Sci. Am. 244 (2):52.
Krontiris T.G. (1995) Minisatellites and human disease. Science 269:1682.
Li G., Levitus M., Bustamante C. and Widom J. (2005) Rapids spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. Narure Struct. Mol. Biol. 12:46.
Lohe A.R. and Hilliker A.J. (1995) Return of the H-word (heterochromatin). Curr. Opin. Genet. Dev. 5:746.
Lorch Y., Maier-Davis B. and Kornberg R.D. (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3090.
Manuelidis L. (1990) A view of interphase chromosomes. Science 250:1533.
Martin C. and Zhang Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:838.
Meilone B., Erhardt S. and Karpen G.H. (2006) The ABCs of centromeres. Nature Cell Biol. 8:427.
Moore M.S. (1996) Protein translocation: nuclear export—out of the dark. Curr. Biol. 6:137.
Moore M.J. and Rosbash M. (2001) TAPping into mRNA export. Science 294:1841.
Nagele R., Freeman T., McMorrow L. and Lee H. (1995) Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. Science 270:1831.
Panté N. and Aebi U. (1996) Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import. Science 273:1729.
Peterson C.L. and Laniel M.A. (2004) Histones and histone modifications. Curr. Biol. 14:R546.
Price C.M. (1992) Centromeres and telomeres. Curr. Opin. Cell Biol. 4:379.
Richards S.A., Carey K.L. and Macara I.G. (1997) Requirement of guanosine triphosphate-bound Ran for signal-mediated nuclear protein export. Science 276:1842.
Robinson P.J. and Rhodes R. (2006) Structure of the 30 nm chromatin fibre: A key role for the linker histone. Curr. Opin. Struct. Biol. 16:1.
Ruthenburg A.J., Allis C.D. and Wysocka J. (2007) Methylation of lysine4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. Mol. Cell 25:15.
Saha A., Wittmeyer J. and Cairns B.R. (2006) Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7:437.
Schmid C.W. and Jelinek W.R. (1982) The Alu family of dispersed repetitive sequences. Science 216:1065.
Shahbazian M.D. and Grunstein M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetyilation. Annu. Rev. Biochem. 76:75.
Stewart A. (1990) The functional organization of chromosomes and the nucleus. Trends Genet. 6:377.
Stewart M. and Clarkson D. (1996) Nuclear pores and macromolecular assemblies involved in nucleocytoplasmic transport. Curr. Biol. 6:162.
Sunkel C.E. and Coelho P. (1995) The elusive centromere: sequence divergence and functional conservation. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:756.
Swedlow J.R., Agard D.A. and Sedat J.W. (1993) Chromosome structure inside the nucleus. Curr. Opin. Cell Biol. 5:412.
Tran E.J. and Wente S.R. (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. Cell 125:1041.
Wen W. et al. (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. Cell 82:463.
Wolffe A.P. and Pruss D. (1996) Chromatin: hanging on to histones. Curr. Biol. 6:234.
Woodcock C.L. (2006) Chromain architecture. Curr. Opin. Struct. Biol. 16:213.
Zapp M.L. (1995) The ins and outs of RNA nucleocytoplasmic transport. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:229.
Zlatanova J. and Yaneva J. (1991) Histone H1-DNA interactions and their relation to chromatin structure and function. DNA Cell Biol. 10:239.

13 Genes

13-1. Los genes son los segmentos funcionales del ADN

Según con qué objetivo se realice su estudio, los **genes** pueden analizarse desde tres ángulos diferentes: el molecular, el mendeliano y el poblacional. La biología celular —que lo estudia desde el punto de vista molecular— define al gen como "la secuencia de ADN que contiene la información requerida para fabricar una molécula de ARN y, si ésta corresponde a un ARN mensajero, a partir de él construir una proteína".

Se ha calculado que existen alrededor de 20.000 genes distribuidos en los 46 cromosomas humanos, cifra muy inferior a los 100.000 propuestos antes de los recientes análisis del genoma.

Cada gen se localiza en un sitio particular del cromosoma, llamado ***locus***. En el capítulo 12-9 vimos que cada lazo formado al plegarse la cromatina de 30 nm podría corresponder a un gen. En total los genes abarcan alrededor del 10% del ADN nuclear, y se ignora el significado de la mayor parte del ADN restante.

Los genes no sólo dirigen la síntesis de las moléculas de ARN. Como el resto del ADN, antes que las células somáticas se dividan ellos se replican, es decir, sintetizan moléculas de ADN complementarias que se reparten en las

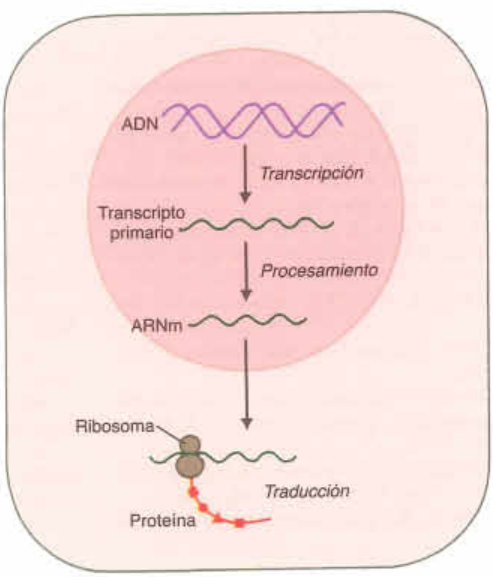


Fig. 13-1. Flujo de información genética en una célula eucariota.

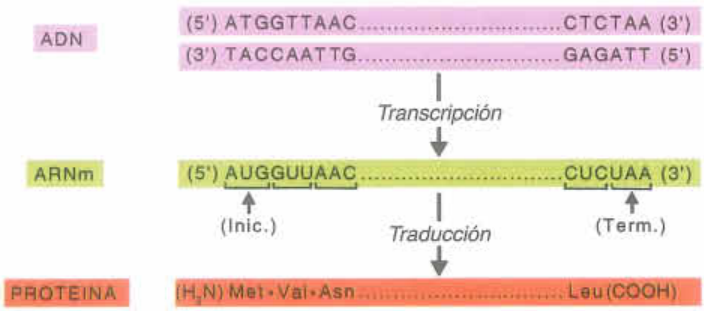


Fig. 13-2. Transferencia de la información genética contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN, que pasa al ARNm (*transcripción*) y de éste a la proteína (*traducción*).

células hijas con el fin de autoperpetuarse. Adicionalmente, por la forma como se replican las moléculas de ADN durante la meiosis y se distribuyen en las células germinativas, los genes constituyen las entidades biológicas a través de las cuales se transmiten los caracteres físicos de padres a hijos. Más aún, las mutaciones que los genes acumulan a lo largo del tiempo pueden resultar beneficiosas para la evolución de la especie.

Puesto que la información genética depositada en las moléculas de ADN se localiza en el núcleo (a excepción del ADN mitocondrial, descrito en el capítulo 8-26), y que la síntesis proteica —basada en dicha información— tiene lugar en el citoplasma, es necesario que esa información sea transferida desde el núcleo al citosol (fig. 13-1). Tal transferencia es un proceso complejo que requiere la intervención de una molécula intermediaria. Se trata del ARN mensajero (ARNm), que copia la información contenida en el ADN y sale al citosol, donde dirige la síntesis de la proteína. Así, en el núcleo el ADN determina la secuencia de los nucleótidos del ARNm y en el citoplasma el ARNm establece el orden de los aminoácidos de la proteína (fig. 13-2).

La síntesis del ARN, que como acabamos de ver usa como molde al ADN, se denomina **transcripción del ADN**, mientras que la síntesis de la proteína, cuyo molde es el ARNm, lleva el nombre de **traducción del ARNm**. Este flujo de información es conocido como el "dogma central" de la biología molecular (fig. 13-3).

Las metáforas utilizadas para definir ambos pasos son bastante justas, ya que transcripción significa "copia o reproducción literal de un original" (el ARN se parece al ADN) y traducción indica "escritura o expresión en un lenguaje de aquello que anteriormente ha sido escrito o expresado en otro" (es lo que ocurre entre la proteína y el ARNm). Respecto del término **replicación del ADN**, significa "copia que reproduce con exactitud el original", que es lo que hace el ADN cuando se duplica (cap. 17-1).

Al definir al gen como una región del ADN que genera un carácter físico heredable, podría entenderse que cada gen da lugar a una sola clase de proteína. Pero no es así, pues si bien algunos genes que producen ARNm se conducen de esa manera, en la mayoría de los casos un único gen es capaz de originar varias clases de proteínas, pudiendo alcanzar la cifra de cinco, seis e incluso más. Los mecanismos que explican cómo un solo gen logra generar más de una clase de proteína se analizan en los capítulos 15-7 y 16-24.

Fig. 13-3. Flujo de información genética.

13-2. La célula produce varias clases de ARN

Existen tres tipos de ARN principales: los ya mencionados **ARN mensajeros** o **ARNm** (en inglés ***mRNA***), que recogen la información de los genes y dirigen la síntesis de las proteínas; los **ARN ribosómicos** o **ARNr** (***rRNA***), que son fundamentalmente estructurales, y los **ARN de transferencia** o **ARNt** (***tRNA***), que actúan como adaptadores.

La síntesis proteica (o traducción del ARNm) tiene lugar en el interior de unas estructuras citosólicas pequeñas llamadas **ribosomas**, que constan de cuatro ARNr diferentes entre sí y numerosas proteínas (fig. 16-5). Bajo la dirección de un ARNm, en los ribosomas se producen las reacciones químicas que ligan a los aminoácidos de cada proteína. La traducción necesita de la participación de los ARNt, de los que existen varios tipos, todos de tamaño pequeño. Se encargan de trasladar a los aminoácidos hacia el ribosoma siguiendo el orden que marca la información genética del ARNm.

Además de estos tres tipos de ARN, existen los siguientes (el primero y el último localizados en el citosol y los restantes en el núcleo):

El **ARN pequeño citosólico** o **ARNpc** (en inglés ***scRNA***, por *small cytosolic RNA*), que como se vio en el capítulo 7-12 pertenece a la partícula PRS.

Los **ARN pequeños nucleares** o **ARNpn** (en inglés ***snRNA***, por *small nuclear RNA*), que forman parte de unas ribonucleoproteínas llamadas RNPpn (en inglés snRNP). Como se verá en el capítulo 15-5, estas moléculas desempeñan funciones salientes durante el procesamiento de los ARNm.

Los **ARN pequeños nucleolares** o **ARNpno** (en inglés ***snoRNA***, por *small nucleolar RNA*), que forman parte de unas ribonucleoproteínas llamadas RNPpno. Como se verá en el capítulo 15-8, estas moléculas intervienen en el procesamiento de los ARNr.

El **ARN de inactivación del cromosoma X** o **ARNxist** (en inglés ***xist-RNA***, por *X-inactivation specific transcript RNA*), cuyas funciones se describen en el capítulo 14-12.

El **ARN de la telomerasa** o **ARNte** (en inglés ***teRNA***, por *telomerase RNA*), que integra un complejo ribonucleoproteico cuyas funciones se analizan en el capítulo 17-9.

Los **miARN** o **microARN** (en inglés ***miRNA*** o ***microRNA***), cuyas funciones se analizan en los capítulos 16-20, 23-44 y 23-45.

13-3. Los transcriptos primarios se procesan en el núcleo

Las moléculas de ARN surgidas de la transcripción del ADN se llaman **transcriptos primarios**. Se convierten en ARN funcionales antes de salir del núcleo, al cabo de varias modificaciones que se analizarán en el capítulo 15, conocidas con el nombre de **procesamiento del ARN**.

El procesamiento más conocido es el de los transcriptos primarios de los ARNm, los cuales contienen segmentos no funcionales intercalados con los segmentos que contienen la información genética que codifica a la proteína. Los primeros se denominan **intrones**; los segundos, **exones** (fig. 15-1).

El procesamiento remueve los intrones y empalma los exones entre sí, dando lugar a un ARNm con información genética continua, apto para dirigir la síntesis de la proteína.

13-4. Cada aminoácido es codificado por un triplete de nucleótidos

Debido a que un gen es un tramo de ADN que contiene la información necesaria para generar un ARN o una proteína, se dice que codifica a estas dos moléculas. Se emplea el término "codifica" porque las instrucciones que se trasladan del ADN al ARN y —en el caso del ARNm— de éste a la proteína, son transmitidas en forma de códigos.

Las características químicas de las moléculas que encarnan los procesos genéticos han sido analizadas en el capítulo 2. Recordemos que tanto los ácidos nucleicos (ADN, ARN) como las proteínas son moléculas formadas por secuencias de monómeros (nucleótidos en los ácidos nucleicos y aminoácidos en las proteínas) dispuestos en línea.

El sistema de códigos se basa en la disposición ordenada de los nucleótidos en el ADN, los cuales determinan el ordenamiento de los nucleótidos en el ARN. A su turno, los nucleótidos del ARNm determinan el ordenamiento de los aminoácidos en la proteína (fig. 13-2).

Debido a que en el proceso de transmisión de la información genética cada nucleótido está representado por una letra (A, G, C o T en el ADN; A, G, C o U en el ARN), el alfabeto contenido en las moléculas de ADN o de ARN —al poseer cuatro letras solamente— no es suficiente para simbolizar los 20 tipos de aminoácidos que pueden hallarse en una proteína.

Las células resuelven el problema utilizando grupos de tres nucleótidos —en distintas combinaciones— para codificar a cada aminoácido. Estos **tripletes** de nucleótidos se denominan **codones**. Dado que hay 4 tipos de nucleótidos, el número de tripletes posible —es decir, de codones— es de 64 ($4^3 = 64$). El conjunto de 64 codones recibe el nombre de **código genético** (fig. 13-4).

Fig. 13-4. Código genético. El codón AUG marca el comienzo de la síntesis proteica (codón de iniciación) y codifica a las restantes metioninas de la proteína.

Primera base	*Segunda base*				*Tercera base*
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Term.	UGA Term.	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Term.	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

13-5. Existen 61 codones para codificar a los 20 tipos de aminoácidos

Dado que se utilizan 61 de los 64 codones para codificar a los 20 tipos de aminoácidos, la mayor parte de ellos pueden ser codificados por más de un codón, condición que ha llevado a decir que existe una ***"degeneración"*** en el código genético. Los codones que codifican a un mismo aminoácido se llaman "sinónimos". Solamente la metionina y el triptófano, que son los aminoácidos menos comunes en las proteínas, son especificados por un solo codón. Los tres codones que no codifican aminoácidos (UAA, UGA y UAG) tienen por mandato —una vez que la cadena polipeptídica ha incorporado el último aminoácido— señalar la conclusión de la síntesis de la molécula proteica; reciben el nombre de **codones de terminación** (fig. 13-4).

En esencia, las instrucciones del código genético emanadas del ADN consisten en una retahíla de tripletes de nucleótidos, cuya secuencia determina la alineación de los codones en el ARN, que son los que especifican el ordenamiento de los aminoácidos en la proteína.

Debido a que en la mayor parte de los transcriptos primarios existen tramos de nucleótidos superfluos que se suprimen, éstos —y por extensión los del ADN— no están representados en el ARN procesado ni en la molécula proteica.

Exceptuando a los tramos superfluos, de lo mencionado hasta aquí se deduce que en cada serie ADN→ARN→proteína las unidades que integran estas moléculas (codones en el ADN y en el ARN, y aminoácidos en la proteína) ***son colineales***, ya que los codones del ADN se corresponden con los del ARN y éstos con los aminoácidos de la proteína.

13-6. El gen posee varias partes funcionales

Hasta ahora, al hablar del gen, nos hemos referido exclusivamente a su **segmento codificador**. Sin embargo, el gen posee otros componentes ajenos a ese segmento. Ellos son:

1) El **promotor**, que inicia la transcripción y señala a partir de qué nucleótido debe transcribirse el gen. Suele localizarse cerca del extremo 5′ del segmento codificador, donde comienza la síntesis del ARN.

2) **Secuencias reguladoras**, que determinan cuándo debe transcribirse el gen y cuántas veces debe hacerlo. En la mayoría de los genes estos segmentos se localizan lejos del codificador. Existen dos tipos de reguladores, los ***amplificadores*** y los ***inhibidores***. Los primeros son más numerosos y, por ello, los más estudiados.

Cada gen posee una combinación particular de varios amplificadores y varios inhibidores. Algunas secuencias amplificadoras e inhibidoras se repiten en genes diferentes, pero nunca dos genes distintos poseen una misma combinación de esas secuencias reguladoras. Se ha comprobado que cuando se elimina una secuencia amplificadora de un gen, la velocidad de transcripción disminuye. Opuestamente, cuando se elimina una secuencia inhibidora, la velocidad aumenta.

3) Finalmente, en las cercanías del extremo 3′ del segmento codificador, el gen posee un tramo de ADN denominado **secuencia de terminación** —no debe confundirse con el codón de terminación del ARNm— que marca la conclusión de la síntesis del ARN.

A continuación analizaremos —separadamente— la composición de los genes que codifican a los distintos tipos de ARN.

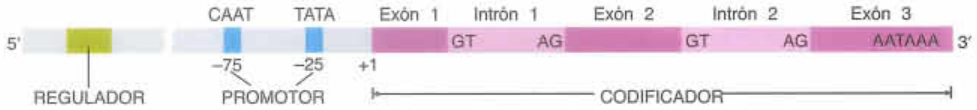


Fig. 13-5. Estructura general de los genes que codifican a los ARN mensajeros, con sus distintos componentes.

COMPOSICION DE LOS GENES

13-7. Estructura de los genes que codifican a los ARN mensajeros

La figura 13-5 muestra los distintos componentes de los genes que codifican a los **ARNm**.

El ***promotor*** suele poseer dos elementos. La combinación más común incluye las secuencias llamadas **TATA** y **CAAT**, situadas cerca del codificador. La caja TATA se localiza unos 25 nucleótidos "corriente arriba" del primer nucleótido del codificador. La caja CAAT se localiza en el mismo lado pero un poco más lejos, a unos 75 nucleótidos, es decir, a 50 nucleótidos de la secuencia TATA.

La secuencia de nucleótidos más común que se encuentra en la caja TATA es la TATAAAA, aunque a menudo dos T reemplazan a las A en las posiciones quinta y séptima. La secuencia de la caja CAAT suele ser GGCCAATCT. Debe advertirse que muchos promotores contienen la secuencia TATA pero no la CAAT. A veces están ausentes las dos, caso en el cual el promotor suele presentar secuencias con una concentración inusualmente alta de citosinas y guaninas, llamadas **regiones CG**.

Los ***reguladores*** —amplificadores e inhibidores— también suelen hallarse "corriente arriba" respecto del extremo 5′ del segmento codificador, aunque muy lejos, frecuentemente a miles de nucleótidos. A diferencia del promotor, en los reguladores la secuencia de nucleótidos —tanto en número como en calidad— es específica, es decir, varía en los distintos genes.

En el ***segmento codificador*** se alternan tramos de ADN utilizables con tramos no funcionales. Como en los transcriptos primarios, se llaman **exones** e

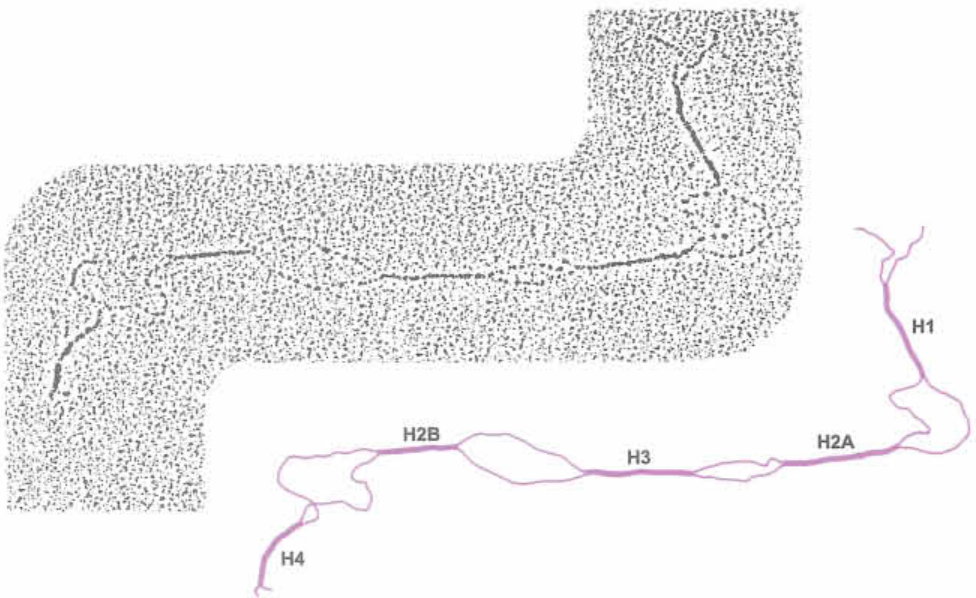


Fig. 13-6. Micrografía electrónica de un tramo de ADN parcialmente desnaturalizado que contiene los cinco genes de las histonas. Estos genes están separados por segmentos espaciadores ricos en A-T. La molécula fue clonada en un plásmido de la *Escherichia coli*. (Cortesía de M. L. Birnstiel y R. Portman.)

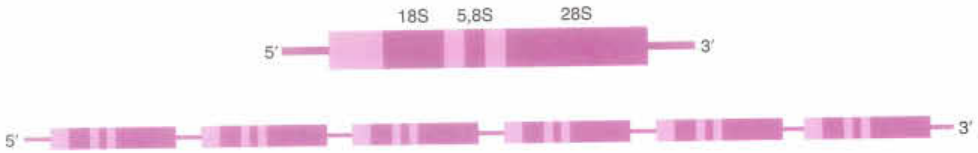


Fig. 13-7. Sucesión de copias del gen del ARNr 45S. Obsérvense los espaciadores que se transcriben *(barras claras)* y los que no lo hacen *(líneas)*.

intrones, respectivamente (sección 13-3). La mayoría de los genes que codifican ARNm contienen entre uno y 60 intrones, y son muy pocos los genes que carecen de esta clase de secuencias.

La ***secuencia de terminación*** no ha podido ser identificada. No obstante, en un sector previo a ella es común la presencia de la secuencia AATAAA, que es necesaria para la conclusión de la síntesis del transcripto primario (cap. 15-4).

La inmensa mayoría de los genes que codifican ARNm están representados por copias únicas (más exactamente por dos copias, dada la condición diploide de las células somáticas). Una de las excepciones corresponde a los genes que codifican a las cinco histonas (cap. 12-9). Los cinco genes se encuentran en el cromosoma alineados uno tras otro, separados entre sí por tramos de ADN que no se transcriben, llamados **ADN espaciadores** (fig. 13-6). De este juego de cinco genes existen entre 20 y 50 copias dispuestas en tándem, separadas entre sí por nuevos ADN espaciadores.

13-8. Estructura del gen que codifica al ARN ribosómico 45S

Los **ribosomas** están formados por ***dos subunidades***, cada una compuesta por **ARN ribosómicos** combinados con **proteínas**. Los ARNr se identifican teniendo en cuenta sus tamaños, expresados como coeficientes de sedimentación (cap. 16-9). Así, existen cuatro tipos de ARNr, llamados **28S**, **18S**, **5,8S** y **5S** (fig. 15-9). Los tres primeros derivan de un transcripto primario común denominado **ARNr 45S** (fig. 15-9). Existen, por lo tanto, dos genes codificadores de ARNr, el correspondiente al ARNr 45S (fig. 13-7) y el que codifica al **ARNr 5S**. Aquí nos ocuparemos del primero.

La célula posee alrededor de 200 copias del gen del ARNr 45S. Se localizan en las constricciones secundarias de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, situadas en el **nucléolo**. En promedio, cada constricción secundaria posee unas 20 copias del gen. Como se observa en las figuras 13-7 y 14-13, las copias del gen del ARNr 45S se hallan alineadas en tándem, separadas entre sí por **secuencias espaciadoras** de ADN que no se transcriben. En cada uno de estos espaciadores se localizan el regulador y la mayor parte del promotor. Veamos los elementos hallados en cada copia del gen (fig. 13-8):

Al igual que los genes de los ARNm, el ***promotor*** del gen del ARNr 45S se encuentra "corriente arriba" respecto del extremo 5' del segmento codificador. Se trata de una secuencia de alrededor de 70 nucleótidos, 20 de los cuales son además los 20 primeros nucleótidos del sector codificador. Por lo tanto, leída en dirección 5'→3', la última parte del promotor es la parte inicial del segmento codificador.

Fig. 13-8. Estructura general del gen que codifica al ARN ribosómico 45S.

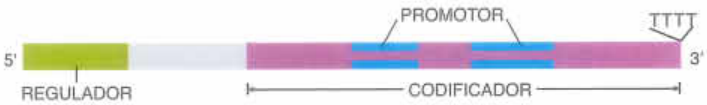


Fig. 13-9. Estructura general del gen que codifica al ARN ribosómico 5S.

El ***regulador***, que actúa como amplificador, es una secuencia de alrededor de 100 nucleótidos. Está ubicado a unos 50 nucleótidos "corriente arriba" del promotor, es decir, a unos 100 nucleótidos del extremo 5′ del segmento codificador.

En el ***segmento codificador***, las secuencias de ADN correspondientes a los ARNr 18S, 5,8S y 28S —en ese orden— se hallan separadas entre sí por **espaciadores**. Estos, a diferencia de las secuencias espaciadoras intercaladas entre las copias del gen del ARNr 45S, se transcriben, de modo que aparecen en el transcripto primario o ARNr 45S (fig. 15-9).

La ***secuencia de terminación***, en el extremo 3′ de cada copia, aparece después del sector que codifica al ARNr 28S. Se caracteriza por contener varias T seguidas.

13-9. Estructura del gen que codifica al ARN ribosómico 5S

Del gen del **ARN 5S** existen —una tras otra— alrededor de 2.000 copias separadas por tramos **espaciadores** de ADN. Todas las copias se localizan en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 1, de modo que no pertenecen al nucléolo.

Cada copia del gen posee dos secuencias especiales de nucleótidos que constituyen el ***promotor***, situadas en el interior del ***segmento codificador***, del que también forman parte (fig. 13-9). Debido a ello, las dos secuencias del promotor se transcriben. Además posee una secuencia situada "corriente arriba" del codificador —es decir, en el espaciador precedente— cuya función parece ser reguladora.

La ***secuencia de terminación***, en el extremo 3′ de cada copia, presenta varias T contiguas, como en el gen del ARNr 45S.

13-10. Estructura de los genes que codifican a los ARN de transferencia

Existen entre 10 y 100 copias de cada uno de los genes que codifican a los distintos **ARNt**, algunos de los cuales se hallan alineados en tándem —copia tras copia— como los genes del ARNr 5S.

El ***promotor*** de estos genes está constituido por dos secuencias de nucleótidos separadas, ambas en el interior del ***segmento codificador***, del que también forman parte (fig. 13-10). Así, tales secuencias, además de cumplir la función de promotor, se transcriben.

Algunos genes de los ARNt presentan un intrón de 4 a 15 nucleótidos en medio del segmento codificador y, por consiguiente, dos exones. No se han descrito secuencias reguladoras.

La ***secuencia de terminación*** es similar a la de las copias de los genes de los ARNr 45S y 5S.

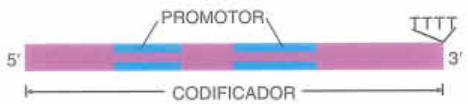


Fig. 13-10. Estructura general de los genes que codifican a los ARN de transferencia.

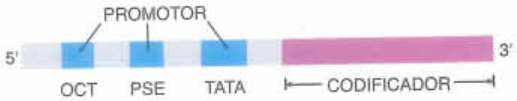


Fig. 13-11. Estructura general de los genes que codifican a los ARN pequeños nucleares.

13-11. Estructura de los genes que codifican a los ARN pequeños

Existen múltiples copias del gen del **ARNpc**, las cuales se hallan dispersas en los cromosomas. Cada copia tendría su propio ***promotor***, aparentemente en medio del ***segmento codificador***. Como se vio en el capítulo 12-7, el gen del ARNpc posee una extensa homología con el ADN repetitivo disperso de la familia Alu.

La mayoría de los **ARNpn** derivan de genes independientes que poseen un ***promotor*** compuesto por tres secuencias separadas, situadas "corriente arriba" respecto del ***segmento codificador*** (fig. 13-11). La secuencia más próxima al segmento codificador es una caja **TATA**, y las otras dos se identifican con las siglas **PSE** (por *proximal sequence element*) y **OCT** (por *octamer sequence*).

El resto de los **ARNpn** y todos los **ARNpno** no derivan de genes convencionales sino de la información contenida en algunos intrones de los genes de varias proteínas ribosómicas (lo cual desmiente la calificación de "ADN no funcional" que se aplica a todos los intrones). Como es obvio, estos intrones son segmentos de ADN sin promotor ni reguladores y se transcriben cuando lo hace el gen al que pertenecen.

13-12. Estructura de los genes que codifican al ARNxist, al ARNte y a los miARN

El gen que codifica al **ARNxist** posee un tamaño relativamente grande y se localiza en el brazo largo del cromosoma X, en una región cercana al centrómero llamada **Xic** (por *X-inactivation center*). Se ha descubierto que contiene numerosas secuencias repetidas dispuestas en tándem, que consta de por lo menos ocho exones y que presenta otras características que lo asemejan a los genes de los ARNm.

Respecto del gen que codifica al **ARNte**, se localiza en el brazo largo del cromosoma 3. Sólo se conoce su ***segmento codificador***, que posee alrededor de 450 nucleótidos.

Los genes que codifican a los **miARN** son alrededor de 500 y diferentes entre sí. La longitud de cada gen supera a la del correspondiente miARN, pues contiene un ***segmento codificador*** de más de cien nucleótidos que incluye, entre otras secuencias, una que da origen al miARN y otra igual (o casi igual), pero invertida (fig. 13-12). Como se verá en el capítulo 17-25, esta característica se halla también en los genes de los transposones (fig. 17-21).

Corresponde agregar que la mayoría los genes de miARN suelen estar agrupados en tándem, poseen ***promotores*** propios y se localizan entre genes de ARNm. En cambio, los restantes, dado que se localizan en intrones de genes de ARNm, se valen de los promotores de estos últimos.

Fig. 13-12. Estructura del gen de un miARN, con sus dos secuencias iguales e invertidas.

BIBLIOGRAFIA

Adhya S. (1989) Multipartite genetic control elements: communication by DNA looping. Annu. Rev. Genet. 23:227.

Allison D., Goh S.H. and Hall B.D. (1983) The promoter sequence of a yeast tRNA-tyr gene. Cell 34:655.

Benzer S. (1962) The fine structure of the gene. Sci. Am. 206 (1):70.

Brown C.J. et al. (1991) Localization of the inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. Nature 349:82.

Brown C.J. et al. (1992) The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Cell 71:527.

Brown D.D. (1984) The role of stable transcription complexes that repress and activate eukaryotic genes. Cell 37:359.

Brown D.D. and Gurdon J.B. (1978) Cloned single repeating units of 5S DNA direct accurate transcription of 5S RNA when injected into *Xenopus* oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2849.

Bucher P. and Trifonov E.N. (1986) Compilation and analysis of eukaryotic Pol II promoter sequences. Nucleic Acids Res. 14:10009.

Crick F.H.C. (1968) The origin of the genetic code. J. Molec. Biol. 38:367.

Crick F. (1979) Split genes and RNA splicing. Science 204:264.

Dreyfuss G., Philipson L. and Mattaj I.W. (1988) Ribonucleoprotein particles in cellular processes. J. Cell Biol. 106:1419.

Dynam W.S. (1986) Promoters for housekeeping genes. Trends Genet. 2:196.

Federoff N. (1979) On spacers. Cell 16:697.

Galli G., Hoefstetter H. and Birnstiel M.L. (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. Nature 294:626.

Gilbert W. (1976) Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: RNA Polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Guthrie C. and Patterson B. (1988) Spliceosomal snRNAs. Annu. Rev. Genet. 22:387.

Hentschel C.C. and Birnstiel M.L. (1981) The organization and expression of histone gene families. Cell 25:301.

Horikoshi M., Hai T., Lin Y.S., Green M.R. and Roeder R.G. (1988) Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. Cell 54:1033.

Karpen G.H., Schaefer J.E. and Laird C.D. (1988) A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. Genes Dev. 2:1745.

Kerppola T.K. and Kane C.M. (1991) RNA polymerase: regulation of transcript elongation and termination. FASEB J. 5:2833.

Lagos-Quintana M. et al. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 294:853.

Lewin B. (2008) Genes, 9th Ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Long E.O. and Dawid I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. Annu. Rev. Biochem. 49:727.

Miller O.L. (1981) The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. J. Cell Biol. 91:15s.

Mitchell P.J. and Tijan R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science 245:371.

Nevins J.R. (1983) The pathway of eukaryotic mRNA formation. Annu. Rev. Biochem. 52:441.

Reddy R. and Busch H. (1981) U snRNA's of nuclear snRNP's. In: The Cell Nucleus. Academic Press, New York.

Reeder R.H. (1984) Enhancers and ribosomal gene spacers. Cell 38: 349.

Sakonju S., Bogenhagen D.F. and Brown D.D. (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription. I: The 5′ border of the region. Cell 19:13.

Serfling E.M., Jasin M. and Schaffner W. (1985) Enhancers and eukaryotic gene transcription. Trends Genet. 1:224.

Terns M.P. and Dahlberg J.E. (1994) Retention and 5′ cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. Science 264:959.

Thompson C.C. and McKnight S.L. (1992) Anatomy of an enhancer. Trends Genet. 8:232.

Tollervey D. (1996) Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. Science 273:1056.

Verrijzer C.P. and Tjian R. (1996) TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. TIBS 21:338.

Wellaurer P.K. and Dawid I.B. (1979) Isolation and sequence organization of human ribosomal DNA. J. Mol. Biol. 128:289.

Worton R.G. et al. (1988) Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5′ end. Science 239: 64.

Yanofsky C. (1967) Gene structure and protein structure. Sci. Am. 216:80.

14 Transcripción del ADN

14-1. Definición

Recibe el nombre de **transcripción** la síntesis de moléculas de ARN sobre la base de moldes de ADN. La síntesis se produce por la unión entre sí de los nucleótidos A, U, C y G, que se alinean siguiendo el orden marcado por los nucleótidos complementarios del ADN. Esa complementariedad determina que las bases A, U, C y G del ARN se apareen, respectivamente, con las bases T, A, G y C del ADN. Como veremos, el apareamiento se logra mediante el establecimiento de uniones transitorias (no covalentes) de las bases del ADN con las bases del ARN en formación, lo cual permite que se produzcan las verdaderas reacciones sintéticas, es decir, la unión de los nucleótidos del ARN entre sí.

El enlace entre dos nucleótidos consecutivos corresponde a una **unión fosfodiéster** (fig. 14-1). Dado que en ella un grupo fosfato liga el C5′ de la ribosa de un nucleótido con el C3′ de la ribosa del nucleótido contiguo, la molécula de ARN siempre resulta polarizada, con un fosfato en su extremo 5′ y un hidroxilo en su extremo 3′. Las uniones fosfodiéster no se producen espontáneamente; son dirigidas y catalizadas por enzimas específicas llamadas **ARN polimerasas**.

14-2. La molécula de ARN se sintetiza por el agregado de un nucleótido por vez

Teóricamente, una molécula de ARN podría construirse a partir de un molde de ADN y de ribonucleótidos libres siguiendo estos cinco pasos. Primero, las dos cadenas del ADN se separarían en toda su extensión. Segundo, los cuatro ribonucleótidos se aparearían con los desoxirribonucleótidos complementarios del ADN, todos simultáneamente. Tercero, cada ribonucleótido se uniría con sus dos vecinos. Cuarto, los ribonucleótidos se separarían de los desoxirribonucleótidos del ADN y se liberaría la molécula de ARN. Quinto, las dos cadenas del ADN volverían a unirse. Dado que en esta hipótesis las dos cadenas del ADN son expuestas por igual, ambas podrían ser transcriptas.

En la célula el ARN se construye de otra manera. En primer lugar, porque se copia sólo una de las dos cadenas del ADN, la que corre en dirección 3′→5′. Esto permite anticipar que el ARN se sintetiza a partir de su extremo 5′ y progresa por su extremo 3′ (fig. 14-1). En segundo lugar, porque los ribonucleótidos se agregan de a uno por vez, lo que hace innecesaria la sepa-

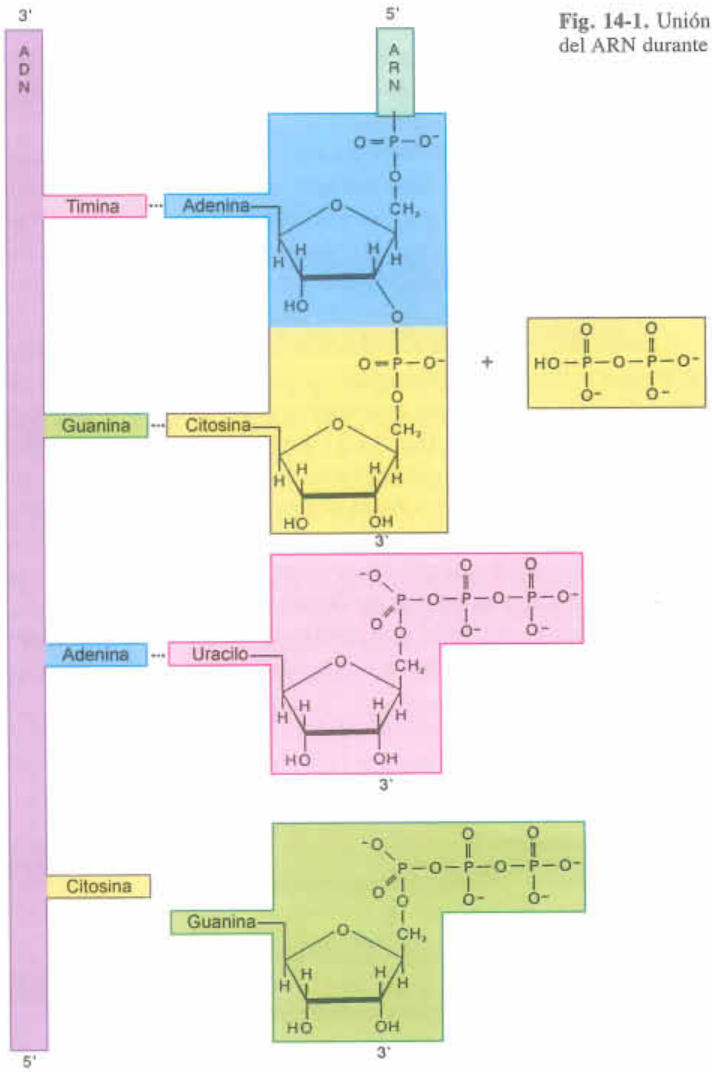


Fig. 14-1. Unión fosfodiéster entre los nucleótidos del ARN durante la transcripción del ADN.

ración de las dos cadenas del ADN en toda su extensión. Sólo se separa un tramo de alrededor de 10 pares de nucleótidos, lo cual, como muestra la figura 14-2, forma en el ADN una **burbuja de transcripción** que se desplaza a medida que se "leen" sus nucleótidos.

Si bien se transcribe la cadena 3′→5′ del gen, convencionalmente se dice que la transcripción avanza en dirección 5′→3′ porque el ARN sintetizado se corresponde —en su polaridad y en la secuencia de sus nucleótidos (sustituyendo el U por la T)— con la cadena no transcripta del ADN. Más aún, la secuencia del gen se define por su cadena 5′→3′ (fig. 14-2).

14-3. Una ARN polimerasa une a los nucleótidos entre sí

Los monómeros con los cuales se construyen las moléculas de ARN se presentan en el nucleoplasma como ribonucleósidos trifosfato (ATP, UTP, CTP y GTP) (fig. 14-1). El comienzo de la transcripción tiene lugar cuando,

a través de su base, uno de estos ribonucleósidos establece una unión transitoria con la base complementaria del primer nucleótido del gen. En este proceso interviene el promotor del gen, luego de ser activado por factores que mencionaremos más adelante.

El promotor se une a la ARN polimerasa y hace que ésta interactúe con el ADN en el sitio en que debe iniciarse la transcripción (el extremo 5′ del segmento codificador del gen), el cual es marcado por el propio promotor. Allí la ARN polimerasa forma una "burbuja", pues determina la separación localizada de las dos cadenas del ADN y deja expuesto —junto con otros pocos— al primer desoxirribonucleótido que va a ser leído (fig. 14-2).

A continuación, frente a este desoxirribonucleótido se acomoda un ribonucleósido trifosfato complementario —será el primer nucleótido de la molécula de ARN—, cuya base establece una unión no covalente con la base del desoxirribonucleótido (fig. 14-2). Luego se arrima un segundo ribonucleósido trifosfato —complementario del segundo desoxirribonucleótido expuesto en el ADN— y sus bases se unen. Pero lo más importante es que los dos ribonucleótidos que concurrieron a la burbuja quedan juntos, lo cual permite que entre ellos se produzca —mediante la ARN polimerasa— una unión fosfodiéster y se genere un dinucleótido (figs. 14-1 y 14-2). Con él se inicia la síntesis del ARN, que prosigue en dirección 5′→3′ a medida que se acercan —y se unen entre sí— los ribonucleósidos trifosfato indicados por el ADN.

El alargamiento progresivo del ARN es conducido por la misma ARN polimerasa. Esta, además de catalizar las uniones fosfodiéster, se desliza sobre

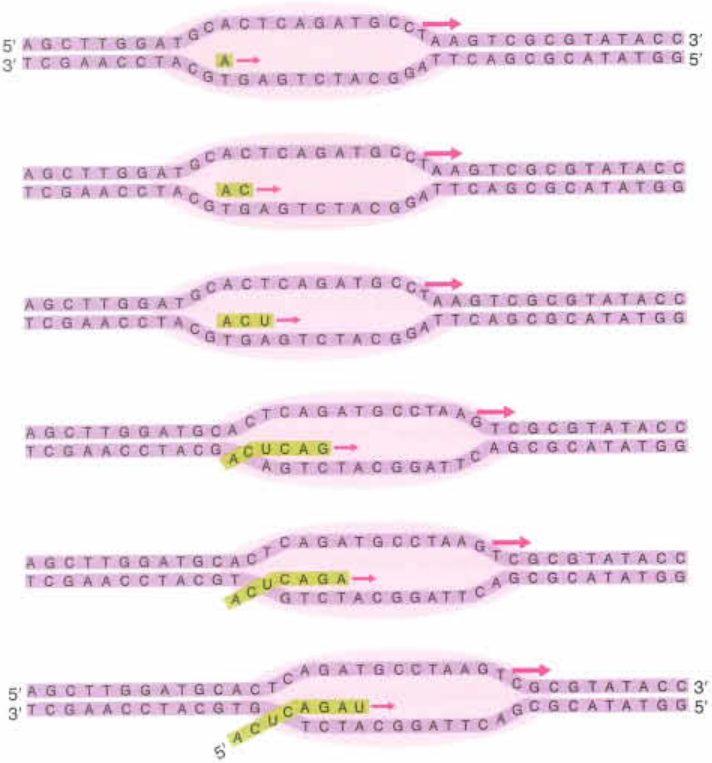


Fig. 14-2. Síntesis de ARN. Puede observarse la ARN polimerasa (*en rojo*) y una "burbuja" de ADN que se desplaza debido a que sus cadenas se van separando en un extremo a medida que se juntan en el otro.

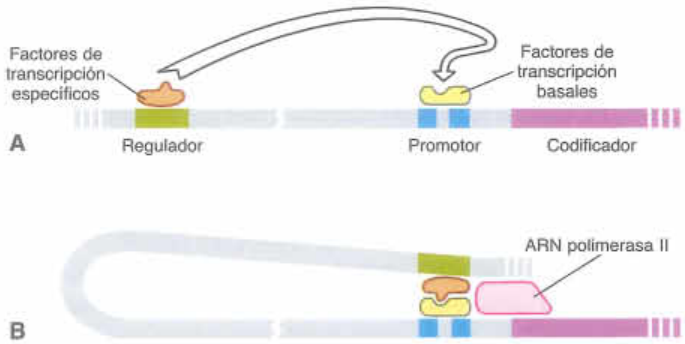


Fig. 14-3. A. Factores de transcripción específicos y basales unidos al regulador y al promotor de gen, respectivamente. **B.** El ADN se dobla sobre sí mismo para que interactúen el regulador y el promotor, lo que estimula la transcripción del sector codificador del gen por la ARN polimerasa II.

el ADN en dirección 5′→3′ y hace avanzar la burbuja. Lo logra porque separa a los nucleótidos en el lado frontal de la burbuja, en tanto que los de la retaguardia se vuelven a unir (fig. 14-2). Esto último es posible porque allí el ADN se desliga de los ribonucleótidos. No obstante, el ARN —cada vez más largo— sigue unido a la cadena molde de ADN por medio de los últimos ribonucleótidos incorporados.

La transcripción concluye cuando la ARN polimerasa alcanza la secuencia de terminación en el extremo 3′ del gen. En ese punto, la enzima se libera. También lo hace el ARN, que adquiere el nombre de **transcripto primario**.

En el extremo 5′, el primer nucleótido del ARN retiene los tres fosfatos, mientras que en el extremo 3′ el último nucleótido presenta un grupo OH libre (fig. 14-1).

14-4. La célula posee tres clases de ARN polimerasas

Existen tres tipos de ARN polimerasas —llamadas I, II y III—, responsables de la síntesis de las distintas clases de ARN. La **ARN polimerasa II** sintetiza los ARNm, los miARN y la mayoría de los ARNpn; la **ARN polimerasa I**, el ARNr 45S; la **ARN polimerasa III**, el ARNr 5S, los ARNt, el ARNpc y unos pocos ARNpn.

Estas polimerasas responden de manera distinta a la acción del veneno producido por el hongo *Amanita phalloides* denominado ***α-amanitina***. Así, la ARN polimerasa II es muy sensible al veneno, la ARN polimerasa III es medianamente sensible y la ARN polimerasa I es insensible.

TRANSCRIPCION DE LOS GENES DE LOS ARN MENSAJEROS

14-5. Los genes que codifican a los ARNm son activados por factores de transcripción

La síntesis de un ARNm dado se produce cuando el gen respectivo, mejor dicho, sus secuencias reguladoras y el promotor, se activan por proteínas especiales, llamadas **factores de transcripción**. Estos se clasifican en específicos y basales.

Los **factores de transcripción específicos** interactúan con el regulador del gen (fig. 14-3) y, según lo hagan con secuencias amplificadoras o inhibidoras del regulador (cap. 13-7), se conocen como ***activadores*** y ***represores***, respectivamente. Las funciones de estos factores de transcripción se analizan en la sección 14-7.

Los **factores de transcripción basales** son requeridos por el promotor, pues se unen a la secuencia TATA para comenzar la síntesis del ARNm (en la sección 14-7 veremos que antes debe activarse el regulador). Debido a su naturaleza inespecífica, los factores basales son más conocidos que los específicos. Existen varios —denominados **TFIID**, **TFIIA**, **TFIIB**, **TFIIF**, **TFIIE**, **TFIIH**, etc.—, los cuales actúan secuencialmente en el orden en que son mencionados. El TFIID se halla integrado por varias subunidades, una llamada **TBP** (por *TATA binding protein*) y las otras, **TAF** (por *TBP-associated factor*).

El proceso se inicia al unirse el TFIID al promotor, por medio de la TBP. Esta unión altera la estructura de la cromatina en el promotor, que abandona su forma rectilínea y se pliega hasta formar un ángulo de unos 100°. El cambio atrae tanto a los restantes factores de transcripción basales como a la ***ARN polimerasa II***, con la cual esos factores se unieron previamente.

Una vez que se ha unido al promotor, la ARN polimerasa II es fosforilada por el TFIIH, que contiene una quinasa. Un ATP dona el fósforo, luego de ser hidrolizado por el TFIIB. A continuación, la ARN polimerasa II fosforilada se desprende de los factores de transcripción y abre la doble hélice del ADN en el sector del gen contiguo al promotor —se forma la burbuja de transcripción—, con lo cual se inicia la síntesis del ARNm.

Para alargar el ARNm, la ARN polimerasa II necesita dos factores adicionales, los **factores de elongación SII** (o **TFIIS**) y **SIII** (o **elongina**). El factor SII es una proteína monomérica de 38 kDa. El factor SIII es un heterotrímero compuesto por las elonginas A, B y C, de 110 kDa, 18 kDa y 15 kDa, respectivamente.

Se estima que durante la fase de alargamiento la ARN polimerasa II le agrega a la molécula de ARN unos 50 nucleótidos por segundo.

Como se señaló, en los genes que codifican ARNm aún no se ha identificado la secuencia de nucleótidos responsable de la terminación de la transcripción (cap. 13-7).

El conjunto de transcriptos primarios de los ARNm se conoce como **ARN heterogéneo nuclear** o **ARNhn**. Estos transcriptos no se encuentran libres en el nucleoplasma sino combinados con diversas proteínas básicas, las cuales se unen a los ARNm a medida que se sintetizan. El conjunto de transcriptos primarios y las proteínas asociadas lleva el nombre de **ribonucleoproteína heterogénea nuclear** o **RNPhn**. Se considera que las proteínas actúan como chaperonas que mantienen a los ARNm desplegados. Ello evita que se formen —en una misma molécula— apareamientos entre secuencias de nucleótidos complementarios.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS GENES QUE CODIFICAN ARN MENSAJEROS

14-6. Los mecanismos más importantes para controlar la actividad de los genes tienen lugar a nivel de la transcripción

Desde que se supo que en los organismos pluricelulares todas las células poseen el mismo genoma, se ha planteado la necesidad de responder a este interrogante: ¿por qué en cada tipo celular ciertos genes son seleccionados para su transcripción y no otros? La respuesta presenta varias facetas, cuyos contenidos se desarrollan en distintos lugares del libro. Así, en el capítulo 11

se analiza cómo responden las células al ser influidas por otras, y en las siguientes secciones del presente capítulo se describen los mecanismos moleculares que llevan a la diferenciación celular. Finalmente, en los capítulos 15, 16 y 21 se agregan datos que completan el panorama.

Los mecanismos celulares que determinan qué proteína ha de sintetizarse, y en qué cantidad, operan en varios niveles, aunque los más importantes son los que controlan la actividad transcripcional de los genes. No obstante, pueden producirse regulaciones después de sintetizado el ARN, durante el procesamiento del transcripto primario. Incluso más tarde, mediante el control de la exportación del ARNm al citoplasma o de su supervivencia en el citosol (fig. 13-1). Finalmente, en algunos casos las regulaciones ocurren durante la traducción de los ARNm en proteínas o a través de la degradación de las segundas. El control de la actividad transcripcional de los genes se analizará en las siguientes secciones de este capítulo, y las regulaciones postranscripcionales se estudiarán en los capítulos 15 y 16.

Es oportuno señalar que el ARN de aproximadamente la mitad de los transcriptos primarios no completa su síntesis. Se ignora si esto se debe a la existencia de alteraciones en los procesos de transcripción o si se trata de un mecanismo generalizado de regulación de la actividad génica que opera abortando la transcripción antes que la polimerasa II arribe a la señal de terminación.

Se conocen muy pocos casos de regulación génica derivados de la conclusión prematura de la transcripción. Como veremos, los mecanismos prevalecientes operan en el comienzo de la síntesis de los ARNm, ya que actúan sobre las secuencias reguladoras de los genes. Estas secuencias son influidas por factores de transcripción específicos, que ingresan en el núcleo para activar o inhibir a los genes.

14-7. Los factores de transcripción específicos desencadenan o frenan la transcripción del ADN

Recordemos que la polimerasa II por sí misma no puede iniciar la transcripción del segmento codificador del gen, pues tiene que ser activada por los factores de transcripción basales unidos al promotor. A su vez, esta unión depende de la activación previa de las secuencias reguladoras por **factores de transcripción específicos**.

Como los factores de transcripción basales son los mismos para casi todos los genes, se dice que son constitutivos. En cambio, los factores de transcripción específicos, al ser particulares para cada gen, se califican como facultativos.

Aunque los factores de transcripción específicos se cuentan por millares, son mucho menos numerosos que las secuencias reguladoras que tienen que controlar. No obstante, logran la especificidad mediante la creación de múltiples combinaciones entre ellos, lo cual aumenta el número de posibilidades en forma extraordinaria. Así, cada clase de célula elabora sólo una selección de esos factores, nada más que los imprescindibles para crear las combinaciones capaces de regular sus propios genes. Debido a que cada gen suele tener varios amplificadores y varios inhibidores, dos o más genes distintos pueden poseer algunos reguladores en común, aunque nunca la misma combinación.

Una vez que los factores específicos se han unido a las secuencias reguladoras, ¿cómo actúan sobre el promotor? (recuérdese que ambas partes del gen suelen estar muy distanciadas). Simplemente, el gen se curva y forma una horquilla, como muestra la figura 14-3. Obsérvese el modo como los factores específicos unidos a las secuencias reguladoras interactúan con los factores basales situados en el promotor. Ello es posible porque los factores específicos cuentan con dos dominios, uno que se conecta con el ADN regulador y otro que lo hace con los factores basales, más precisamente, con las subunidades TAF del factor TFIID.

Cuando el complejo queda integrado, los factores basales activan a la ARN polimerasa II y ésta inicia la transcripción del gen. Por su parte, los factores específicos disponen el número de polimerasas que —una tras otra— harán el trabajo, lo cual regula la cantidad de ARNm que se fabricará.

En las secciones 14-20 a 14-26 se analizan los mecanismos reguladores de la actividad génica en las **células procariotas**.

14-8. La transcripción de los genes de los ARNm puede visualizarse con la ayuda del microscopio electrónico

La microscopia electrónica convencional no muestra cómo se transcriben los genes. Empero, cuando se dispersa el contenido del núcleo sobre una grilla se ponen en evidencia detalles reveladores. Así, si un gen se transcribe a un ritmo acelerado —es decir, se asocia simultáneamente con varias ARN polimerasas II—, puede ser visto junto con muchas cadenas de ARNm que surgen perpendicularmente de su molécula.

El conjunto se asemeja a un **árbol de navidad**, cuyo tronco corresponde al gen y las ramas a los ARNm (fig. 14-4). El alargamiento de las ramas —que son más largas a medida que se alejan de la punta del árbol— indica la dirección de la transcripción. En el punto en que cada rama se une al tronco se localiza una ARN polimerasa II (suele verse en las micrografías) y, por lo tanto, se forma una "burbuja". Si pudiera realizarse una filmación se vería a las burbujas desplazándose desde la punta del árbol hacia el "suelo", cada una con su ARNm, que se desprende del tronco cuando alcanza su máxima longitud.

Los genes que producen ARNm a tan alta velocidad no son muchos, pues la mayoría se transcribe a un ritmo relativamente moderado. Los más lentos inician una nueva transcripción después de concluir la anterior. En estos casos el gen se vería como un tronco con una sola rama —el ARNm—, cuya longitud y posición en el tronco dependerían del instante en que es tomada la microfotografía.

14-9. Se conocen las bases moleculares de la interacción de los factores de transcripción con el ADN de las regiones reguladoras y promotora del gen

Los factores de transcripción y el ADN de los reguladores y del promotor contienen en sus moléculas información suficiente para unirse entre sí en forma específica. Los factores de transcripción establecen contacto con el ADN mediante grupos químicos complementarios, de un lado aportados por los aminoácidos y del otro por las bases de los nucleótidos. Así, la especificidad de la unión depende de la complementariedad estructural entre las partes interactuantes.

Originariamente se creyó que los factores de transcripción abrían la doble

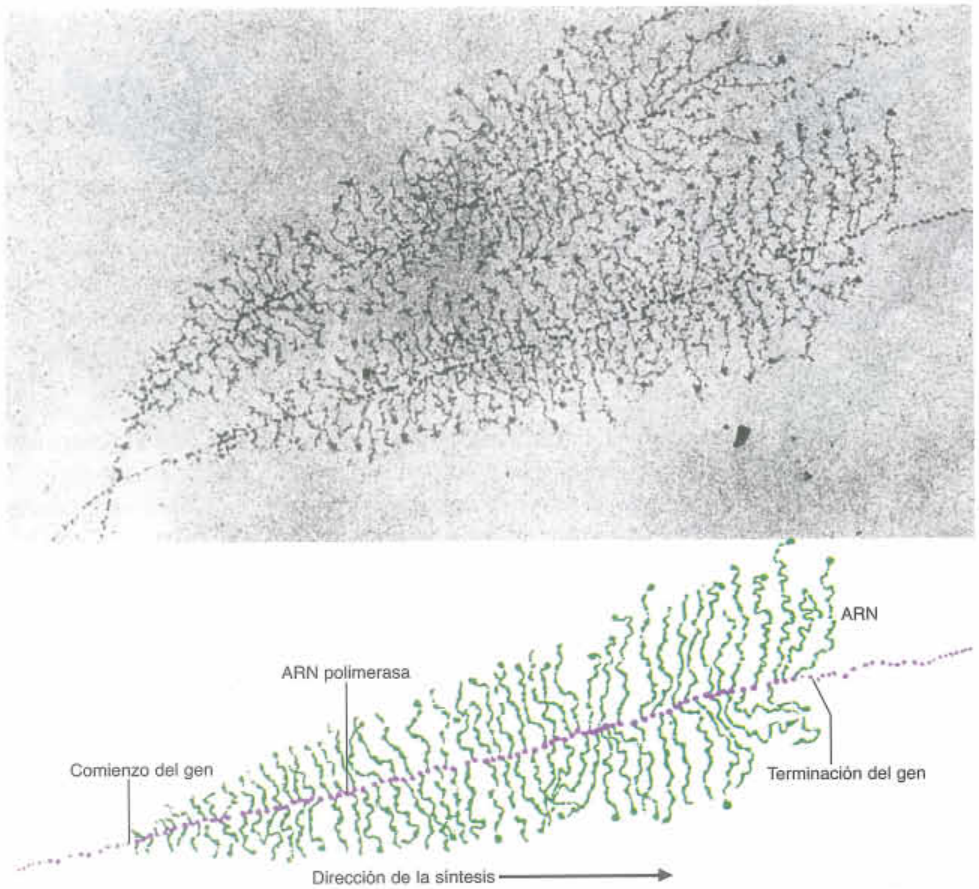


Fig. 14-4. Micrografía electrónica que muestra dos genes transcribiéndose. 35.000×. (Cortesía de O. L. Miller y B. R. Beatty.)

hélice del ADN y reconocían a los grupos químicos que participan en la formación de los puentes de hidrógeno entre las bases de los nucleótidos. Esto ha sido descartado. Si bien se confirmó que los factores de transcripción reconocen al ADN de los promotores y de los reguladores por sus bases, en ellas identifican a grupos químicos localizados en la parte exterior de la doble hélice, a nivel de los surcos mayor y menor. Allí, sin necesidad de romper los puentes de hidrógeno, los aminoácidos de los factores de transcripción interactúan con las bases y se unen a ellas.

14-10. Los factores de transcripción se asocian a los reguladores y al promotor del gen a través de átomos expuestos en los surcos del ADN

Visto desde el **surco mayor** del ADN (fig. 2-4), cada par de nucleótidos —en las cuatro combinaciones posibles (A-T, T-A, G-C y C-G)— muestra un átomo de oxígeno, uno de hidrógeno y uno de nitrógeno (fig. 14-5), que son capaces de establecer uniones no covalentes (como puentes de hidrógeno) con átomos de los aminoácidos de los factores de transcripción. En cada par de bases esos tres átomos se presentan combinados de manera diferente. Por ejemplo, el par A-T muestra la combinación ***N–H–O***, y el par T-A, la combinación ***O–H–N***; como vemos, una es la imagen invertida (en espejo) de la

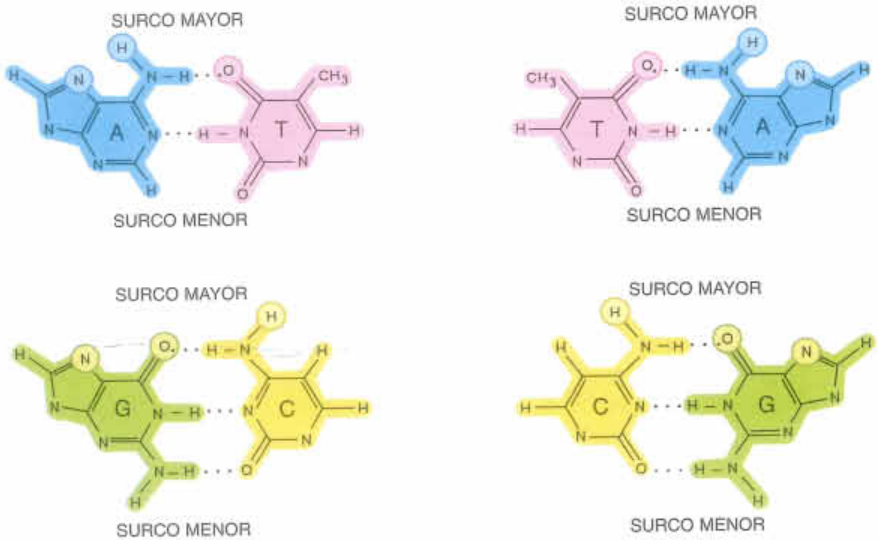


Fig. 14-5. Posiciones y combinaciones de los átomos de oxígeno, hidrógeno y nitrógeno que se hallan expuestos en el surco mayor de la molécula de ADN a nivel de los pares de bases A-T, T-A, G-C y C-G.

otra. Algo semejante ocurre con los pares G-C y C-G, en los cuales los átomos forman las combinaciones ***N–O–H*** y ***H–O–N***, respectivamente.

La información cifrada en el **surco menor** del ADN (fig. 2-4) es menos amplia que la del surco mayor, tal vez porque el menor resulta estrecho para la entrada de algunos aminoácidos.

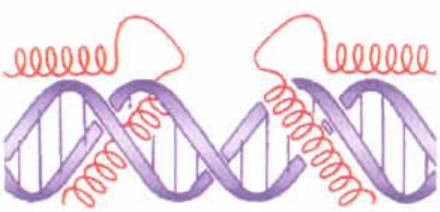
Además de estas asociaciones específicas, entre los factores de transcripción y el ADN se producen uniones inespecíficas; en una de ellas participa el esqueleto de fosfatos del ADN y, si bien no le confiere especificidad a la unión, la estabiliza.

Por lo general cada factor de transcripción entabla unos 20 contactos con el ADN, lo que significa que aproximadamente 20 aminoácidos interactúan con otros tantos pares de nucleótidos, sea en el promotor o en el regulador del gen. Dado que las combinaciones de pares de bases son cuatro (A-T, T-A, G-C, C-G), pueden darse unas 160.000 (20^4) posibilidades de combinaciones teóricas, cantidad desproporcionadamente alta para el número de factores de transcripción que existen en la célula.

14-11. Los factores de transcripción contienen estructuras diméricas especiales

Analizadas las singularidades estructurales del ADN, nos ocuparemos ahora de las que caracterizan a los factores de transcripción. En general, las proteínas de los factores de transcripción contienen **estructuras diméricas simétricas**, las cuales se encastran en los surcos de la doble hélice del ADN. Así, los dímeros ocupan dos vueltas de la doble hélice, con un monómero en cada vuelta. En ese par de vueltas el ADN también presenta simetría, ya que sus dos mitades muestran secuencias de nucleótidos repetidas en palíndromo (término tomado de la lingüística que designa a la palabra o frase que se lee igual de izquierda a derecha o de derecha a izquierda). Cada mitad del palíndromo ocupa una de las vueltas del ADN.

Fig. 14-6. Estructura con forma de hélice-vuelta-hélice.



La dimerización de los factores de transcripción y la si-

metría del ADN son condiciones necesarias para que los aminoácidos de los primeros puedan interactuar con las bases del regulador y del promotor.

Aunque existen miles de factores de transcripción diferentes, los sectores diméricos de sus moléculas forman estructuras secundarias y terciarias con ***diseños comunes***, lo cual permite clasificarlos en un limitado número de familias. Cada factor de transcripción puede tener una, dos o más de esas estructuras, diseñadas para ingresar en los surcos de la doble hélice a nivel del regulador y del promotor del gen.

La denominación de las estructuras se basa en las formas que tienen, de ahí que se las llame hélice-vuelta-hélice, dedos de cinc, cremallera de leucina y hélice-bucle-hélice.

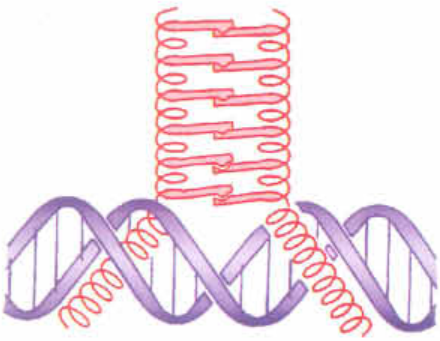


Fig. 14-7. Estructura con forma de cremallera de leucina.

Hélice-vuelta-hélice. Esta estructura consta de dos cadenas de aminoácidos con forma de hélice, separadas por una "vuelta" o cadena más corta (fig. 14-6). Una de las hélices "lee" la secuencia de nucleótidos en el sector regulador del gen —al que se une si lo reconoce— y la otra mantiene la hélice lectora en la posición adecuada. Obviamente, la secuencia de aminoácidos en la hélice lectora (llamada también hélice de reconocimiento) varía en los distintos factores de transcripción.

Cuando una hélice-vuelta-hélice está acompañada por otra simétrica, entre ambas componen un dímero. Las respectivas hélices de reconocimiento se encajan en sendos surcos del ADN, que corresponden a los dos lados del palíndromo.

Se han identificado estructuras hélice-vuelta-hélice en diversos factores de transcripción. Por ejemplo, en algunos factores involucrados en la formación del plan corporal durante el desarrollo embrionario (cap. 21-22), en los factores implicados en la diferenciación de las células musculares, etc.

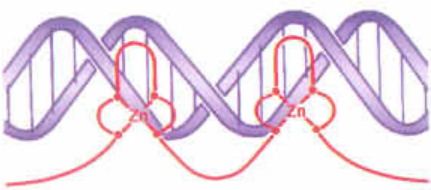
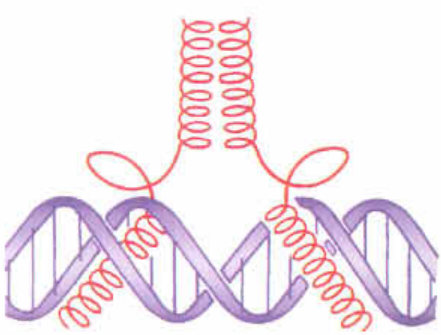


Fig. 14-8. Estructura con forma de dedos de cinc.

Cremallera de leucina. Consta de dos cadenas polipeptídicas dispuestas en paralelo, ambas con forma de hélice. Cada cadena posee dos sectores, uno que se une al ADN y otro que lo hace con su homólogo, con lo cual se forma un dímero (fig. 14-7). Los sectores unidos entre sí presentan, cada siete aminoácidos —que corresponden a dos vueltas de la hélice—, una leucina que da al interior del dímero. Estas leucinas se encastrarían como los dientes de los cierres relámpago, de ahí el nombre de cremallera. Los sectores no dimerizados poseen una alta proporción de aminoácidos básicos, que son los que generan la unión específica del factor de transcripción con el ADN.

Entre otros, poseen cremalleras de leucina los factores de transcripción que regulan la actividad de los protooncogenes myc, fos y jun (cap. 18-31).

Fig. 14-9. Estructura con forma de hélice-bucle-hélice.



Dedos de cinc. Cada dominio del factor de transcripción está compuesto por una secuencia de unos pocos aminoácidos y un átomo de cinc, el cual se liga tetraédricamente a cuatro cisteínas, o a dos cisteínas y dos histidinas (fig. 14-8). Estos dominios se proyectan como dedos, cuyo número y secuencia de aminoácidos varían en los distintos factores de transcripción. Además, los dedos de cinc se asocian de a dos para formar dímeros.

Los dedos de cinc son las estructuras más difundidas en-

tre los factores de transcripción. Se encuentran, por ejemplo, en los receptores citosólicos mencionados en el capítulo 11-6. Estos ingresan en el núcleo y actúan como factores de transcripción específicos cuando se les unen las sustancias inductoras. Otro ejemplo corresponde al TFIIIA, uno de los factores de transcripción del ARNr 5S (sección 14-16).

Hélice-bucle-hélice. Esta estructura tiene una configuración dimérica muy parecida a la cremallera de leucina, pues posee dos cadenas polipeptídicas con dos sectores funcionales en cada una: el específico —reservado para la unión del factor de transcripción con el ADN— y el responsable de la dimerización (fig. 14-9). El primero es rico en aminoácidos básicos. Este diseño se diferencia de la cremallera porque sus partes dimerizadas no se encastran.

14-12. El enrollamiento de la cromatina influye sobre la actividad de los genes

En el capítulo 12-10 se describieron las diferencias entre la eucromatina y la heterocromatina. Se dijo que, durante la interfase, la transcripción tiene lugar en la eucromatina y que el empaquetamiento altamente condensado de la cromatina —es decir, la heterocromatina— suele indicar ausencia de actividad transcripcional. Ello no significa que en la eucromatina se produzca automáticamente la transcripción, por un lado porque una proporción significativa de su ADN carece de genes y por otro porque muchos se hallan inactivos debido a que —como se vio en las secciones dedicadas a los factores de transcripción— solamente se transcriben los genes que reciben el mandato de hacerlo.

En el capítulo 12-9 se analizó el papel que desempeñan las **histonas** en el enrollamiento de la cromatina. Aquí se verá cómo regulan la transcripción de los genes, haciendo que el ADN pase a estar relativamente desenrollado y liberado de las moléculas que obstaculizan el contacto de la ARN polimerasa con el segmento codificador del gen.

Si bien la cromatina de 10 nm es la más apta para que el ADN pueda ser transcripto (fig. 12-10), la ARN polimerasa no puede actuar si no se desenrollan los tramos de ADN que rodean a las histonas de los nucleosomas, al menos durante la transcripción.

Se ha sugerido que los factores de transcripción basales no sólo activan al promotor del gen sino también el desarmado de los nucleosomas en la parte inicial del segmento codificador, lo que permite la separación local de las dos cadenas del ADN para que la ARN polimerasa pueda comenzar la transcripción. Al parecer, los factores de transcripción actúan directa o indirectamente sobre las histonas H4, que se modifican y desencadenan la remoción de las otras histonas, comenzando por las H2A y las H2B.

Luego, a medida que avanza por el segmento codificador del gen, la propia ARN polimerasa sería la responsable de desenrollar el ADN de los nucleosomas, los cuales se rearman conforme la enzima los deja atrás.

Diversos datos revelan que el grado de enrollamiento de la cromatina es regulado por el agregado o por la remoción de grupos acetilo, grupos metilo y grupos fosfato en las "colas" de las histonas, las cuales están expuestas a estos cambios porque se proyectan hacia fuera de los nucleosomas (cap. 12-9).

Por ejemplo, la **acetilación** de algunas lisinas de la histonas H3 y H4 disminuye el enrollamiento de la cromatina, lo que favorece el acceso de

los factores de transcripción basales al promotor del gen, con la consiguiente puesta en marcha de la actividad genética. En cambio, la **desacetilación** provoca el efecto contrario, ya que incrementa el enrollamiento de la cromatina y puede llegar a convertirla en heterocromatina. Debe señalarse que el agregado y la remoción de los grupos acetilo son catalizados, respectivamente, por acetilasas y desacetilasas localizadas en la matriz nuclear.

Respecto de la **metilación** y la **demetilación**, producen efectos opuestos a los de la acetilación y la desacetilación, respectivamente. Así, el agregado de grupos metilo a una de las lisinas de la histona H3 aumenta el enrollamiento de la cromatina, mientras que su remoción lo disminuye.

Por último, la **fosforilación** y la **desfosforilación** de ciertas serinas y treoninas localizadas en la "cola" de la histona H1 también producen efectos opuestos a los de la acetilación y la desacetilación, respectivamente.

En síntesis, la acetilación, la demetilación y la desfosforilación de distintas histonas disminuyen el enrollamiento de la cromatina y propician la actividad de los genes. Contrariamente, la desacetilación, la metilación y la fosforilación aumentan el enrollamiento y bloquean la actividad genética.

Cabe señalar que en diversos tipos celulares los promotores de los genes contienen histonas que presentan —en lo relativo a su número y distribución— una combinación particular de esos cambios químicos, lo que sugiere que algunas combinaciones estimulan y otras silencian la actividad de los genes. Ello ha impulsado a quienes trabajan en este tema a darle el nombre de **código histónico** al conjunto de tales combinaciones.

Debe agregarse que en los tipos celulares diferenciados que se dividen, las células hijas heredan la misma heterocromatina de las células predecesoras, lo cual se repite de generación en generación (cap. 21-21). Esta estabilidad de la heterocromatina se debe a que los factores que la causan se duplican en las células próximas a dividirse y se reparten entre las células hijas.

En algunos casos la actividad génica se inactiva y la cromatina se compacta debido a que intervienen causas adicionales a las citadas, como sucede en el cromosoma X compactado de las células de la mujer, descrito en el capítulo 12-11 con el nombre de ***cromatina sexual*** o ***cuerpo de Barr***. Si bien el cromosoma X se compacta y sus genes se inactivan debido a que se desacetilan sus histonas y se metila su ADN (esta metilación se analiza en la sección 14-13 y no debe ser confundida con la metilación de las histonas), ambos cambios son precedidos por la activación del gen **Xist** (por *X-inactivation specific transcript*), que como se vio en el capítulo 13-12 se localiza en el propio cromosoma X, en una región cercana al centrómero llamada Xic. Cuando se activa, el gen Xist genera múltiples copias de un ARN especial denominado **ARNxist** (cap. 13-2), las cuales, a partir del Xic, se unen al ADN de los dos brazos del cromosoma X e inactivan a casi todos sus genes. Cabe agregar que mediante técnicas especiales las copias del ARNxist aparecen en forma de puntos a lo largo del cromosoma X compactado, lo que sugiere que se asocian con proteínas.

14-13. La metilación del ADN influye sobre la actividad génica

Además de las cuatro bases conocidas (A, T, C y G), en algunos puntos el ADN contiene una quinta, la **metilcitosina** o **mC**, que se genera al agregarse un grupo metilo (CH_3) a la citosina (fig. 14-10). La **metilación del ADN** se

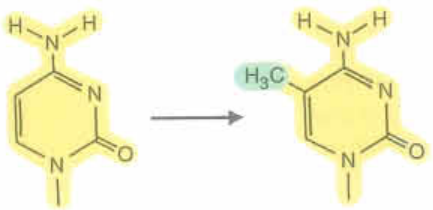


Fig. 14-10. Metilación de la citosina (obsérvese el grupo C_3H en la metilcitosina).

halla restringida a citosinas seguidas por guaninas (no estamos diciendo "apareadas"), de modo que si en un punto una de las cadenas del ADN contiene el dinucleótido mC-G, la opuesta exhibirá el dinucleótido G-mC. Como es obvio, la mC del dinucleótido mC-G se aparea con la G del dinucleótido G-mC, y la G con la mC.

Al igual que con la metilación de las histonas, existe una estrecha correlación entre el grado de metilación de los genes y su inactividad transcripcional. No obstante, en la metilación del ADN influye menos su número que el lugar donde se localizan. En efecto, la metilación del ADN a nivel del promotor puede abolir la actividad de un gen, mientras que muchas metilaciones en su región codificadora suelen no afectarla.

Recordemos que existen genes con promotores que presentan sectores llamados **regiones CG** debido a que contienen una alta proporción de ese dinucleótido (cap. 13-7). Concordantemente, en las células de la mujer, los promotores de numerosos genes inactivos pertenecientes al cromosoma X compactado presentan un alto grado de metilación en los dinucleótidos CG.

Como es lógico, un gen puede estar metilado en un tipo celular pero no en otro. Por ejemplo, el gen de la β-globina se halla metilado en las células que no fabrican esa proteína y no en las células eritropoyéticas, donde la β-globina es producida en grandes cantidades.

En las sucesivas generaciones celulares, las células de los tejidos diferenciados poseen en sus ADN un patrón de citosinas metiladas virtualmente idéntico al de sus predecesoras. La **herencia de las mC** se debe a que durante la replicación, luego de duplicarse las dos cadenas del ADN, las C de las cadenas hijas —las complementarias a las G de los dinucleótidos mC-G y G-mC, exclusivamente— adquieren un grupo metilo. Esta metilación es dirigida por una enzima llamada ***metilasa de mantenimiento***, que actúa apenas se duplica el ADN (fig. 14-11).

Contrariamente, en las células que se diferencian después de dividirse, los patrones de metilación se modifican. Así, los genes inactivos —por lo tanto, muy metilados— pierden parte de su metilación si se activan.

El mecanismo que modula el reemplazo de las mC por C —y viceversa— y el modo como las primeras previenen la transcripción son temas que acucian a los investigadores dedicados al estudio de la diferenciación celular.

14-14. La impronta genómica resulta de la metilación diferente de los alelos de algunos genes, según provengan del padre o de la madre

Un fenómeno muy llamativo relacionado con la metilación del ADN se observa en la denominada **impronta genómica**. Esta involucra a un grupo de genes cuyos dos alelos poseen normalmente patrones de metilación de las citosinas distintos entre sí, al compararse el alelo aportado por el padre con el alelo aportado por la madre. Hasta el momento se han identificado más de 40 genes con esta característica que, resaltamos, es absolutamente normal.

Para que la impronta —o "marca de procedencia" paterna o materna— de esos genes pueda mantenerse de generación en generación, los genes con impronta materna deben perderla en las células germinativas masculinas y ad-

quirir el patrón de metilación de los genes con impronta paterna, los cuales no se modifican. Obviamente, en las células germinativas femeninas debe ocurrir lo contrario. Se ignora cómo en el testículo los genes con impronta materna adquieren el patrón de metilación de sus homólogos paternos, y en el ovario los genes con impronta paterna adquieren el patrón de metilación de sus homólogos maternos.

En el testículo la modificación se produce en la etapa perinatal y tiene lugar en las células predecesoras de los espermatogonios (cap. 19-3). En cambio, en el ovario se produce durante la meiosis I, por lo que tiene lugar en el ovocito I (cap. 19-4).

Debe señalarse que para que la embriogénesis sea normal, por cada par de alelos con impronta se requiere que uno tenga la impronta paterna y el otro la materna. Por consiguiente, si en una célula germinativa de uno de los padres se produce una falla en la reprogramación de la impronta, el embrión formado con la participación de esa célula tendrá una proporción inadecuada de alelos paternos y maternos y se desarrollará defectuosamente.

Reciben el nombre de **disomías uniparentales** las afecciones congénitas que se producen cuando los dos alelos de un gen con impronta poseen la impronta del padre o la impronta de la madre y no cada alelo la impronta de uno de los padres. Por ejemplo, una malformación congénita muy grave, el ***síndrome de Angelman***, se debe a la presencia de dos alelos paternos o a la falta del alelo materno de un gen con impronta perteneciente al cromosoma 15. Su contrapartida es el ***síndrome de Prader-Willi***, en el cual esos alelos son maternos. Debe señalarse que si bien ambos síndromes son consecuencia de la alteración de la impronta del mismo gen —la del alelo materno y la del alelo paterno, respectivamente—, sus cuadros clínicos difieren entre sí.

TRANSCRIPCION DEL GEN DEL ARN RIBOSOMICO 45S

14-15. El ARNr 45S se sintetiza en el nucléolo mediante dos factores de transcripción

En el capítulo 13-8 se señaló que las 200 copias del gen del ARNr 45S se localizan en el **nucléolo**.

La iniciación de la síntesis del ARNr 45S por la ***ARN polimerasa I*** requiere dos factores de transcripción, llamados **SL1** (por *selectivity factor*) y **UBF** (por *upstream binding factor*) (fig. 14-12). Los estudios sobre el SL1 revelaron que contiene tres TAF y una subunidad idéntica al TBP del TFIID (a pesar de que el promotor del gen para el ARNr 45S carece de secuencia TATA).

El SL1 se asocia al promotor del gen y el UBF al regulador (amplificador)

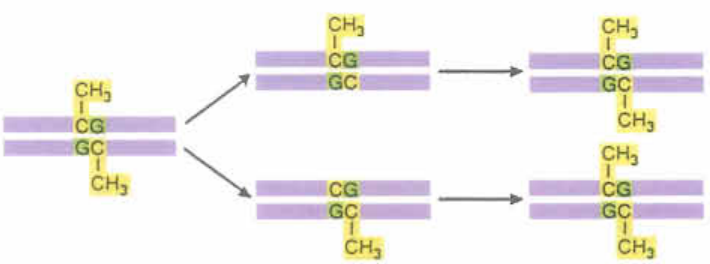


Fig. 14-11. Metilación de citosinas tras la replicación del ADN.

Fig. 14-12. Representación del gen del ARNr 45S asociado a la ARN polimerasa I y a los factores de transcripción UBF y SL1.

(cap. 13-8). Luego el SL1 y el UBF se comunican entre sí —y ambos con la ARN polimerasa I— y forman un complejo cooperativo que da inicio a la transcripción.

La transcripción de cada una de las copias del gen del ARNr 45S concluye al arribar la ARN polimerasa I a la secuencia de terminación, rica en timinas. Dado que varias copias del gen se hallan alineadas en tándem (cap. 13-8) (fig. 13-7), es posible que exista algún tipo de asociación entre la zona de terminación de una copia y el regulador de la copia siguiente, a pesar de estar separadas por un tramo de ADN espaciador que no se transcribe. Abonan esta idea experimentos en los cuales la transcripción de una copia no se inicia si la ubicada precedentemente no finaliza la suya.

El estudio ultramicroscópico del nucléolo, previo extendido de sus componentes, muestra una sucesión de copias del gen del ARNr 45S dispuestas en tándem, cada una asociada a numerosos trascriptos primarios. Se ven imágenes semejantes a **árboles de navidad**, como las producidas por los genes que sintetizan ARNm a alta velocidad (fig. 14-13).

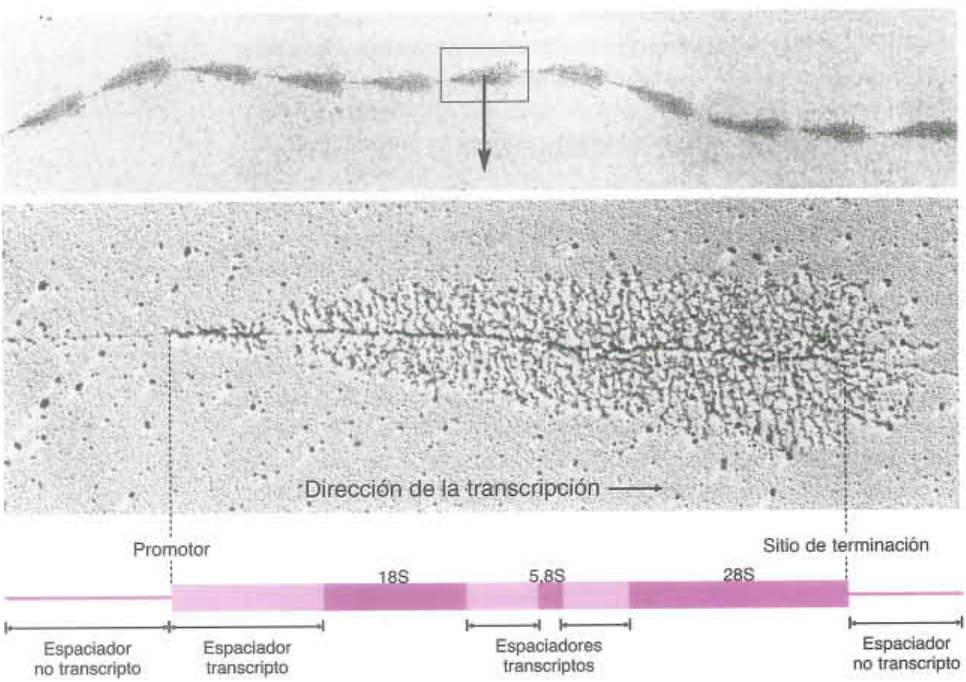


Fig. 14-13. En la parte superior de la figura se observa un extendido con once genes consecutivos del ARNr 45S, separados por segmentos espaciadores que no se transcriben. En la parte media aparece uno de dichos genes con mayor aumento, en pleno proceso de transcripción; contiene múltiples moléculas de ARNr 45S, lo que le otorga un aspecto de "árbol de navidad". En la parte inferior se presenta un esquema del gen, con las partes correspondientes a los ARNr 18S, 28S y 5,8S junto a los segmentos espaciadores que se transcriben. (Cortesía de U. Scheer, M. F. Trendelemburg y W. W. Franke.)

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

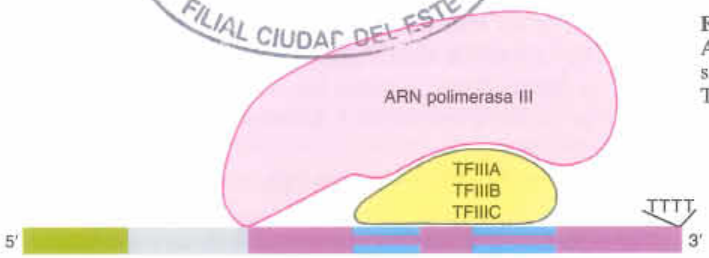


Fig. 14-14. Representación del gen del ARNr 5S asociado a la ARN polimerasa III y a los factores de transcripción TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC.

TRANSCRIPCION DEL GEN DEL ARN RIBOSOMICO 5S

14-16. El gen del ARNr 5S se halla fuera del nucléolo y se activa mediante tres factores de transcripción

Las aproximadamente 2.000 copias del gen que codifica el ARNr 5S se encuentran fuera del nucléolo (cap. 13-9). Su transcripción es dirigida por la ***ARN polimerasa III***, que actúa cuando tres factores de transcripción distintos —llamados **TFIIIA**, **TFIIIB** y **TFIIIC**— se unen al promotor del gen (fig. 14-14). EL TFIIIB contiene varios TAF y la subunidad TBP del TFIID.

La síntesis del ARNr 5S cesa cuando la ARN polimerasa III arriba a la secuencia de terminación, rica en timinas.

TRANSCRIPCION DE LOS GENES DE LOS ARN DE TRANSFERENCIA

14-17. Los genes que codifican a los ARNt se activan mediante dos factores de transcripción

La transcripción de las 10 a 100 copias de cada uno de los genes que codifican a los distintos ARNt (cap. 13-10) es dirigida también por la enzima ***ARN polimerasa III***, la cual requiere que se unan al promotor dos factores de transcripción, los recién nombrados **TFIIIB** y **TFIIIC** (fig. 14-15).

Debido a la presencia de varias timinas consecutivas en el extremo 3′ del gen, la finalización de la síntesis de estos ARN es similar a la de los ARNr 45S y 5S.

TRANSCRIPCION DE LOS GENES DE LOS ARN PEQUEÑOS

14-18. Los factores de transcripción que activan a los genes de los ARN pequeños se conocen parcialmente

La mayor parte de los **ARNpn** son sintetizados por la ***ARN polimerasa II***, y unos pocos por la ***ARN polimerasa III***. Se ha descubierto un factor de transcripción llamado **SNAPc** (por *small nuclear activator protein complex*) que se vincula con ambas polimerasas; posee una subunidad TBP y se une a la secuencia TATA o a la secuencia PSE del promotor (cap. 13-11).

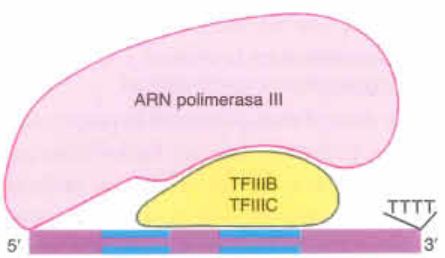


Fig. 14-15. Representación del gen de un ARNt asociado a la ARN polimerasa III y a los factores de transcripción TFIIIB y TFIIIC.

La formación de los restantes **ARNpn** y de los **ARNpno** no depende de polimerasas ni de factores de transcripción propios, ya que está supeditada a la síntesis de los ARNm donde se hallan los intrones que les dan origen (cap. 13-11). Como se vio en la sección 14-5, la síntesis de los ARNm es dirigida por la ARN polimerasa II.

Respecto del gen del **ARNpc**, sus múltiples copias son transcriptas por la ***ARN polimerasa III***. Los factores de transcripción de este gen aún no se conocen.

TRANSCRIPCION DE LOS GENES DEL ARNxist, DEL ARNte Y DE LOS miARN

14-19. No se conoce acabadamente cómo se transcriben los genes del ARNxist, del ARNte y de los miARN

Si bien durante el desarrollo temprano del embrión femenino el gen del **ARNxist** se transcribe en los dos cromosomas X, por causas todavía desconocidas, más tarde lo hace solamente en el cromosoma X compactado (cuerpo de Barr).

Respecto del gen del **ARNte**, existen estudios que sugieren que es transcripto por la ***ARN polimerasa II***.

Los genes de los **miARN** —tanto los intrónicos como los intergénicos (cap. 13-12)— son transcriptos por la ***ARN polimerasa II*** (fig. 15-12). Debido a que los genes intrónicos son segmentos de ADN que carecen de promotores, se transcriben cuando lo hacen los genes de los ARNm a los que pertenecen. En cambio, los genes intergénicos se transcriben cuando sus promotores son activados por factores de transcripción específicos.

TRANSCRIPCION DE LOS GENES EN LAS CELULAS PROCARIOTAS

14-20. La regulación de la expresión de los genes bacterianos puede tener lugar en el comienzo o en la terminación de la transcripción

Las bacterias poseen miles de genes, entre los cuales se encuentran los que codifican a las proteínas enzimáticas, tanto las que participan en la degradación de los alimentos provenientes del medio como las que intervienen en la síntesis de las moléculas que componen la célula bacteriana. En algunos casos, la expresión de tales genes es controlada en el comienzo de la transcripción, y en otros tanto en el comienzo como en la terminación.

14-21. El operón lac es inducido por la lactosa

Puesto que las bacterias obtienen su alimento directamente del medio en que viven, los mecanismos que regulan la actividad de sus genes deben adaptarse rápidamente a los cambios en la calidad y la cantidad de las moléculas (alimentos) en dicho medio.

Un buen ejemplo de control transcripcional lo proporcionan los genes de las enzimas que intervienen cuando la bacteria *Escherichia coli* utiliza la ***lactosa*** como alimento. La síntesis de estas enzimas puede aumentar hasta 1.000 veces si se agrega lactosa al medio de cultivo. Así, la disponibilidad de un sustrato estimula la producción de las enzimas que intervienen en su degrada-

ción. Esta regulación —por **inducción enzimática**— se cumple también en el caso de las enzimas que degradan a otros azúcares y a diversos aminoácidos y lípidos.

Las tres enzimas necesarias para el aprovechamiento de la lactosa como alimento son la β-galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa, cuya codificación corresponde a una unidad genética común denominada **operón lac** (fig. 14-16).

Un operón es un grupo de genes que se encuentran muy próximos entre sí y que son regulados (activados o inhibidos) en forma conjunta por un **operador** (**o**) y un **promotor** (**p**). Además suele intervenir un **gen inhibidor** (**i**), que codifica a una proteína denominada **represor**. Los genes se hallan en el **segmento codificador** y son transcriptos en un solo ARNm, que por eso recibe la denominación de ***ARN policistrónico***. Esto explica por qué las proteínas derivadas de un operón se sintetizan en cantidades equivalentes.

Volviendo al operón lac, su **segmento codificador** posee tres genes —llamados *z*, *y* y *a*—, que codifican a las tres enzimas mencionadas. Es regulado por el **represor lac**, un complejo proteico que posee cuatro subunidades idénticas de 40 kDa, codificadas por el gen inhibidor (fig. 14-16). El represor lac se une al operador, que está situado cerca del comienzo del gen *z* (de la β-galactosidasa).

Como se observa en la figura 14-17, la unión del represor lac con el operador impide la síntesis del ARNm policistrónico. El represor lac se une a una secuencia de 21 pares de bases del operador que tiene regiones con simetría doble (en palíndromo), de modo que algunos sectores ubicados en el lado izquierdo se encuentran también en el lado derecho, pero en la cadena opuesta y dispuestos "en espejo" (fig. 14-18).

Se han encontrado secuencias similares en los operadores de otros operones y en los reguladores de los genes de las células eucariotas (sección 14-11). Las secuencias simétricas representan sitios de reconocimiento para las distintas subunidades del represor.

14-22. La sustancia inductora se une al represor y éste sale del operador

La afinidad del represor por el operador se halla regulada por la **sustancia inductora**, que es una molécula pequeña que se liga al represor. La sustancia inductora natural del operón lac es la ***alolactosa***, un metabolito de la lactosa (en las experiencias de laboratorio se usa el isopropiltiogalactósido o IPTG, que es un inductor mucho más potente que la alolactosa).

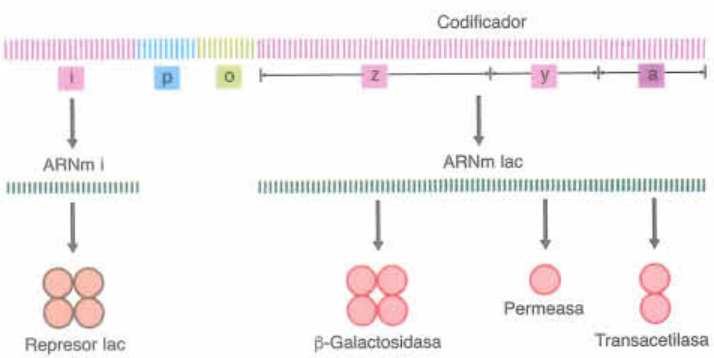


Fig. 14-16. Representación del operón lac, con el gen inhibidor *i* (que codifica al ARNm del represor lac), el promotor (*p*), el operador (*o*) y el segmento codificador compuesto por los genes *z*, *y* y *a*. Estos codifican al ARNm policistrónico lac que da lugar a las proteínas β-galactosidasa, permeasa y transacetilasa.

Cada subunidad del represor tiene un sitio de unión para la sustancia inductora. Esta le provoca un cambio conformacional, y entonces el represor abandona al operador. Como vemos, la presencia de la sustancia inductora hace posible la transcripción del operón. El efecto de la presencia de la lactosa —y, por lo tanto, de la alolactosa— en el medio es espectacular. Mientras que en ausencia de lactosa la *E. coli* contiene en promedio sólo tres moléculas de β-galactosidasa, después de la inducción del operón lac pasa a tener unas 3.000 moléculas, las cuales representan el 3% de sus proteínas. Además esta adaptación es muy rápida, ya que la mayoría de los ARNm bacterianos, si bien se sintetizan a gran velocidad, tienen una vida media de unos pocos minutos.

14-23. La ARN polimerasa se une al promotor cuando el represor sale del operador

El promotor es el segmento del gen donde se coloca la ARN polimerasa cuando se inicia la transcripción. En la figura 14-18 se muestra la secuencia de nucleótidos del promotor en el operón lac. Para la unión de la ARN polimerasa son importantes dos sectores: 1) la secuencia conservada TATGTTG, situada entre 6 y 12 nucleótidos antes del sitio de comienzo de la transcripción, presente en casi todos los promotores, y 2) una secuencia necesaria localizada a 35 nucleótidos de ese sitio, importante porque si muta se inhibe la expresión del operón lac.

La ARN polimerasa se une a una región del gen de aproximadamente 80 nucleótidos, correspondiente al promotor. La presencia del represor en el

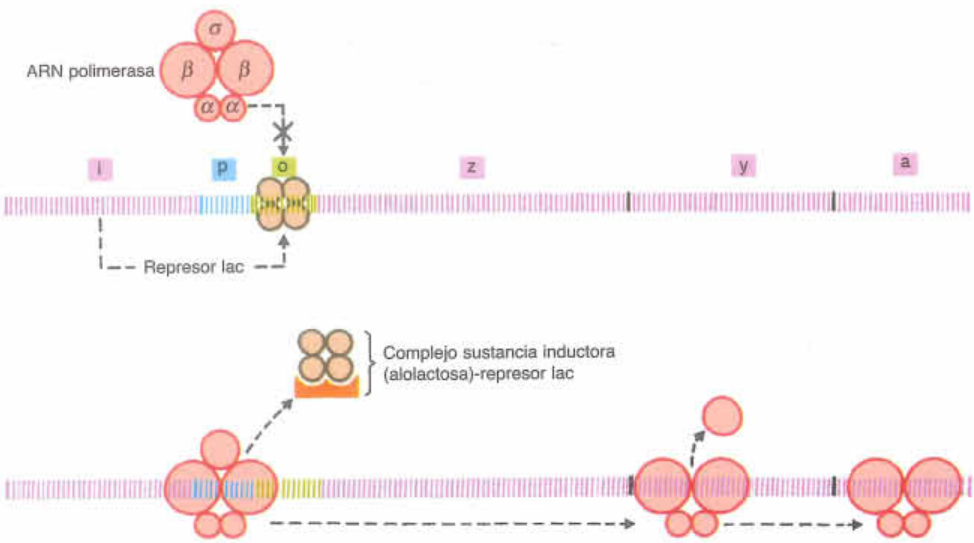
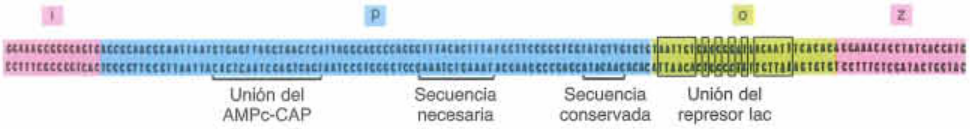


Fig. 14-17. Regulación del operón lac en ausencia y en presencia de una sustancia inductora. En el primer caso el represor lac —que es un tetrámero— se une al operador e interfiere la transcripción de los genes. La unión simultánea de la ARN polimerasa con el promotor y del represor con el operador es imposible, ya que la enzima es incapaz de unirse al promotor cuando el represor ocupa el operador. En el segundo caso la sustancia inductora se une al represor y le produce un cambio conformacional que impide su unión con el operador. De esta manera la ARN polimerasa queda en libertad y puede activar la transcripción de los genes. En la *Escherichia coli* la ARN polimerasa posee cinco subunidades: dos α (de 40 kDa cada una), dos β (de 160 kDa cada una) y una σ (de 95 kDa). Adviértase que una vez iniciada la transcripción la subunidad σ se libera del complejo.



operador bloquea la unión de la ARN polimerasa con el promotor. Así, los represores funcionan de una manera muy simple: al estar unidos al operador impiden la fijación de la ARN polimerasa al promotor.

Fig. 14-18. Secuencia de nucleótidos en el promotor y en el operador del operón lac. En el promotor aparece la secuencia conservada TATGTTG y una secuencia necesaria, cuyas mutaciones afectan la transcripción del gen. (De R. Dickson y col.)

14-24. La transcripción del operón lac está sujeta a un control positivo por parte del AMP cíclico

El **AMP cíclico (AMPc)** participa en la regulación de la transcripción de los operones. Como se verá, su concentración en el protoplasma bacteriano es controlada indirectamente por la glucosa.

La *E. coli* posee una proteína receptora para el AMPc llamada **CAP** (por *catabolite activator protein*). Se trata de una proteína dimérica, que se une al promotor del operón cuando se le asocia el AMPc. Ello hace que la ARN polimerasa también se una al promotor (fig. 14-18). Así, la ARN polimerasa reconoce al promotor siempre que el **complejo AMPc-CAP** se encuentre en él. Como vemos, en el operón lac, además del control negativo ejercido por el represor lac, existe un control positivo mediado por el complejo AMPc-CAP.

El control positivo se registra en la expresión de muchos otros operones, como los que intervienen en la utilización de la maltosa, la galactosa y la arabinosa. Sin embargo, este control no es necesario para la expresión de los genes que actúan durante la utilización de la glucosa como alimento. Ello es importante porque cuando las bacterias crecen en presencia de glucosa tienen menos moléculas de AMPc que cuando lo hacen, por ejemplo, en un medio rico en lactosa, que como se sabe proporciona menos energía que la glucosa. En consecuencia, si la *E. coli* se desarrolla en presencia de glucosa y lactosa, usará sólo la primera. Este mecanismo le permite a la *E. coli* adaptarse a su cambiante hábitat natural, el interior del intestino.

14-25. La transcripción del operón Trp es regulada por dos mecanismos

En la *E. coli* las cinco enzimas que se requieren para sintetizar el aminoácido triptófano son codificadas por el **operón Trp** (fig. 14-19), cuya actividad es controlada por dos mecanismos, conocidos como represión enzimática e interrupción prematura de la transcripción. Enseguida se verá que la actividad del operón Trp depende primordialmente de la concentración del aminoácido en la bacteria y que ambos mecanismos de control hacen que las cinco enzimas se produzcan sólo cuando son necesarias.

En la **represión enzimática** la síntesis del ARNm que codifica a esas enzimas es bloqueada cuando la concentración del triptófano —es decir, del producto de las enzimas— sobrepasa ciertos niveles. Para ello, el **represor Trp** derivado del gen inhibidor ingresa en el operador e impide que la ARN polimerasa se una al promotor, lo cual detiene la transcripción del gen y, por ende, la producción de las enzimas. Debe agregarse que para que el represor ingrese en el operador se requiere que lo active un **correpresor**, que en el caso

del operón Trp es el propio aminoácido triptófano cuando se halla en exceso.

La figura 14-19 muestra cómo obra el operón Trp cuando el triptófano bacteriano es insuficiente. Obsérvese que el represor y el correpresor se separan del operador, que la ARN polimerasa retorna al promotor y que el ARNm que se genera dirige la producción de las cinco enzimas necesarias para sintetizar el aminoácido.

Debe señalarse que mediante el mecanismo de represión enzimática la bacteria controla también la síntesis de otros aminoácidos y de las moléculas precursoras de los ácidos nucleicos.

Como se dijo, la bacteria posee un mecanismo adicional para regular la actividad del operón Trp, basado en la **interrupción prematura de la transcripción**. Así, cuando la concentración de triptófano supera ciertos niveles, el operón Trp interrumpe su transcripción y genera un ARNm corto, incapaz de producir las enzimas que se necesitan para sintetizar el aminoácido. El ARNm resulta corto porque su molécula forma un bucle que pone fin a la transcripción.

Opuestamente, cuando el Trp bacteriano se halla en cantidad insuficiente, ese bucle no se forma, la transcripción no se interrumpe y se genera un ARNm completo.

14-26. También existe un control postranscripcional para regular la síntesis de moléculas

La inducción y la represión enzimáticas proporcionan un control general del metabolismo en los procariotas, al activar o inhibir la síntesis de las enzimas bacterianas de acuerdo con las necesidades (fig. 14-20). Sin embargo, las células poseen mecanismos de regulación más finos, pues controlan la actividad, no la síntesis de las enzimas. Los más comunes son: 1) la **inhibición por retroalimentación**, por la cual el producto final de un ciclo metabólico actúa como inhibidor alostérico de la primera enzima de la cadena, de modo que cuando se ha sintetizado una cantidad suficiente del producto toda la cadena entra en reposo y se evita la acumulación inútil de metabolitos; 2) la **activación por precursor**, en la cual el primer metabolito de la vía sintética actúa como activador alostérico de la última enzima de la cadena (fig. 14-20).

El control genético (por inducción o por represión) es un tipo de regula-

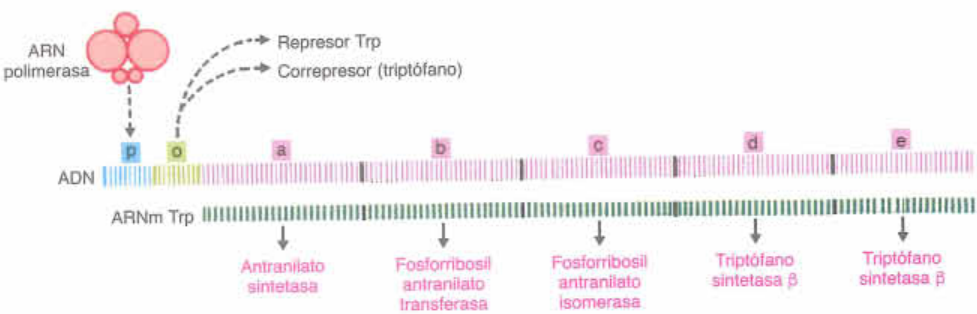


Fig. 14-19. Regulación por represión enzimática de la actividad del operón Trp de la *Escherichia coli*. Cuando la cantidad de triptófano es suficiente, el represor Trp inhibe al operador, por lo que se suspende la síntesis del ARNm policistrónico Trp que codifica a las cinco enzimas requeridas para producir el aminoácido. Debe agregarse que el represor es inducido por el propio triptófano, que cuando se halla en exceso actúa como correpresor. En cambio, cuando la bacteria es privada de triptófano, éste y el represor se separan del operador y se reanuda la síntesis del ARNm Trp. (De K. Bertrand y col.)

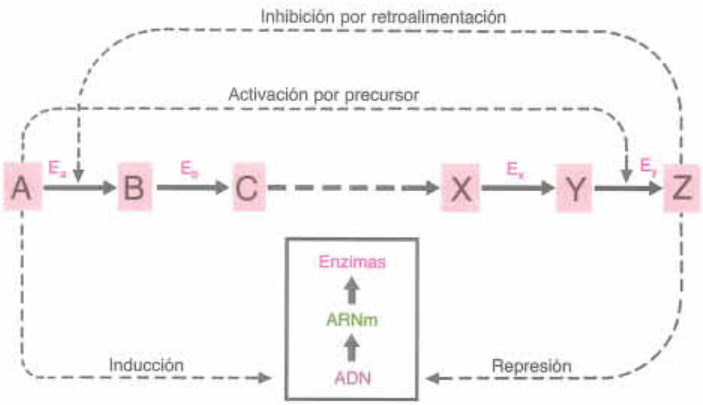


Fig. 14-20. En la inhibición por retroalimentación (*feedback*), el producto final (*Z*) de una cadena metabólica actúa como inhibidor alostérico de la primera enzima de la cadena. En la activación por precursor, el primer producto de la cadena (*A*) actúa como activador alostérico de la última enzima de la cadena.

ción burdo y relativamente lento, mientras que la inhibición por retroalimentación y la activación por precursor son formas más finas y casi instantáneas de regulación. El control genético economiza energía, ya que evita la síntesis de enzimas innecesarias. En cambio, el control de la actividad enzimática permite una adaptación casi instantánea del metabolismo celular.

BIBLIOGRAFIA

Akhtar A. and Gasser S.M. (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. Nat. Rev. Genet. 8:507.

Aso T., Lane W.S., Conaway J.W. and Conaway R.C. (1995) Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. Science 269:1439.

Barlow D.P. (1995) Gametic imprinting in mammals. Science 270:1610.

Beckwith J. and Zipser D. (1968) The Lactose Operon. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Bell S.P., Learned R.M., Jantzen H.M. and Tjian R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human rRNA synthesis. Science 241:11192.

Bird A. (2001) Methylation talk between histones and DNA. Science 294:2113.

Bird A.P. (1993) Genomic imprinting: imprints on islands. Curr. Biol. 3:275.

Bourc'his D. et al. (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science 294:2536.

Brown C.J. et al. (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature 349:38.

Chakalova L., Debrand E., Mitchel J.A. et al. (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. Nature Rev. Genet. 61:669.

Comai L. et al. (1994) Reconstitution of transcription factor SL1: Exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. Science 266:1966.

Conaway J.W. and Conaway R.C. (1991) Initiation of eukaryotic messenger RNA synthesis. J. Biol. Chem. 266:17721.

Delihas N. and Anderson J. (1982) Generalizated structures of the 5S ribosomal RNAs. Nucleic Acids Res. 10:7323.

Drapkin R., Merino A. and Reinberg D. (1993) Regulation of RNA polymerase II transcription. Curr. Opin. Cell Biol. 5:469.

Dynan W.S. and Tjian R. (1985) Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding protein. Nature 316:774.

Edmondson D.G. and Roth S.Y. (1996) Chromatin and transcription. FASEB J. 10:1173.

Garrel J. and Campuzano S. (1991) The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. Bioessays 13:493.

Geiduschek E.P. and Kassavetis G.A. (1992) RNA polymerase III transcription complexes. In: Transcriptional Regula-tion. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Gilbert W. and Müller-Hill B. (1967) The lac operator is DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58:2415.

Grunstein M. (1992) Histones as regulators of genes. Sci. Am. 267 (4):68.

Harrison S.C. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. Nature 353:715.

Harrison S.C. and Aggarwal A.K. (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. Annu. Rev. Biochem. 59: 933.

Heintz N., Sive H.L. and Roeder R.G. (1983) Regulation of histone gene expression. Mol. Cell Biol. 3:539.

Heix J. and Grummt I. (1995) Species specificity of transcription by RNA polimerase I. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:652.

Hernández N. (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor? Genes Dev. 7:1291.

Jackson M.E. (1991) Negative regulation of eukaryotic transcription. J. Cell Sci. 100:1.

Jacob F. and Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Molec. Biol. 3:318.

Jacobson R.H. and Tjian R. (1996) Transcription factor IIA: a structure with multiple functions. Science 272:827.

Kornberg R.D. (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. Trends Biochem. Sci. 30:235.

Kornberg R.D. and Lorch Y. (1992) Chromatin structure and transcription. Annu. Rev. Cell Biol. 8:563.

Lamb P. and McKnight S.L. (1991) Diversity and specificity

in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. TIBS 16:417.
Lykke-Andersen S. and Jensen T.H. (2007) Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. Biochimie 89: 1177.
Lyon M.F. (1999) X-chromosome inactivation. Curr. Biol. 9:R235.
Malik S. and Roeder R.G. (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian mediator complex. Trends Biochem. Sci. 30:256.
Maniatis T. and Ptashne M. (1976) A DNA operator-repressor system. Sci. Am. 234 (1):64.
Martienssen R.A. and Richards E.J. (1995) DNA methylation in eukaryotes. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:234.
McKnight S.L. (1991) Molecular zippers in gene regulation. Sci. Am. 264 (4):54.
Meller J.H. and Reznikoff W.S. (1978) The Operon. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
Nakajima N., Horikoshi M. and Roeder R.G. (1988) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: functional analysis of initiation factors IIA and IID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site. J. Biol. Chem. 262:3322.
Pabo C.O. and Sauer R.T. (1992) Transcriptions factors: structural families and principles of DNA recognition. Annu. Rev. Biochem. 61:1053.
Raj A. and van Oudenaarden A. (2008) Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. Cell 135: 216.
Reeder R.H. (1992) Regulation of transcription by RNA polymerase I. In: Transcriptional Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
Reik W., Dean W. and Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 293:1089.
Reines D., Conaway J.W. and Conaway R.C. (1996) The RNA polymerase II general elongation factors. TIBS 21:351.
Rhodes D. and Klug A. (1993) Zinc fingers. Sci. Am. 268 (2):56.
Rippe K., von Hippel P.H. and Laugowski J. (1995) Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription. TIBS 20: 500.
Roeder R.G. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. TIBS 16:402.
Schleif R. (1992) DNA looping. Annu. Rev. Biochem. 61:199.
Shaffer C.D., Wallrath L.L. and Elgin S.C.R. (1993) Regulating genes by packaging domains: bits of heterochromatin in euchromatin? Trends Genet. 9:35.
Siegfried Z. and Cedar H. (1997) DNA methylation: A molecular lock. Curr. Biol. 7:R305.
Steitz T.A. (1990) Structural studies of protein-nucleic acid interaction: the sources of sequence-specific binding. Q. Rev. Biophys. 23:205.
Sternglanz R. (1996) Histone acetylation: a gateway to transcriptional activation. TIBS 21:357.
Struhl K. (1989) Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. TIBS 14:137.
Struhl K. (1994) Duality of TBP, the universal transcription factor. Science 263:1103.
Surridge C. (1996) The core curriculum. Nature 380:287.
Terns M.P. and Dahlberg J.E. (1994) Retention and 5′ cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. Science 264:959.
Tjian R. (1995) Molecular machines that control genes. Sci. Am. 272 (2):38.
Tollervey D. (1996) Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. Science 273:1056.
Thomas M.C. and Chiang C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. Critical Rev. Biochem. Mol. Biol. 41:105.
Verrijzer C.P. and Tjian R. (1996) TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. TIBS 21:338.
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.
Wolffe A.P. (1996) Histone deacetylase: a regulator of transcription. Science 272:371.
Wolffe A.P. and Pruss D. (1996) Chromatin: hanging on to histones. Curr. Biol. 6:234.
Yanofsky C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature 289:751.

Procesamiento del ARN 15

15-1. Los ARN son procesados en el núcleo

Recibe el nombre de **procesamiento del ARN** el conjunto de modificaciones que experimentan los transcriptos primarios para convertirse en ARN funcionales.

Vimos que algunos transcriptos primarios contienen tramos de ARN sin significado funcional aparente, como los intrones en el ARNm y los espaciadores en el ARNr 45S. Un episodio saliente del procesamiento del ARN es la remoción de esos segmentos no utilizables. Pero los transcriptos primarios experimentan otros cambios. Dado que son diferentes en los distintos tipos de ARN, los estudiaremos separadamente en el ARNm, en los ARNr 45S y 5S, en los ARNt y en los ARN pequeños.

PROCESAMIENTO DE LOS ARN MENSAJEROS

15-2. El procesamiento de los ARNm comprende varios cambios

El procesamiento del ARNm comprende la remoción de los intrones y el agregado de dos estructuras, llamadas cap y poli A, la primera en el extremo 5′ y la segunda en el extremo 3′ de la molécula (fig. 15-1). También se metilan algunas de sus adeninas. Estas modificaciones son necesarias para que los ARNm puedan salir del núcleo y funcionar en el citosol.

15-3. En el extremo 5′ del ARNm se agrega un nucleótido metilado llamado cap

Al nucleósido trifosfato situado en el extremo 5′ del ARNm naciente se le une un nucleótido metilado, la **7-metilguanosina**. Recibe el nombre de **cap** (por *capuchón*) y se agrega al extremo 5′ mediante los siguientes pasos (fig. 15-2):

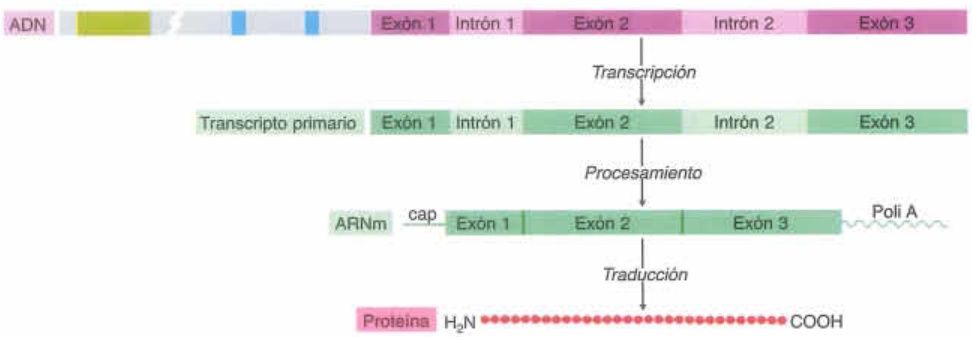


Fig. 15-1. Esquema de los genes que codifican a ARN mensajeros. Se muestran los segmentos correspondientes al regulador, al promotor y al codificador, este último con sus exones e intrones. Obsérvense los cambios que experimenta el ARNm al cabo del procesamiento del transcripto primario.

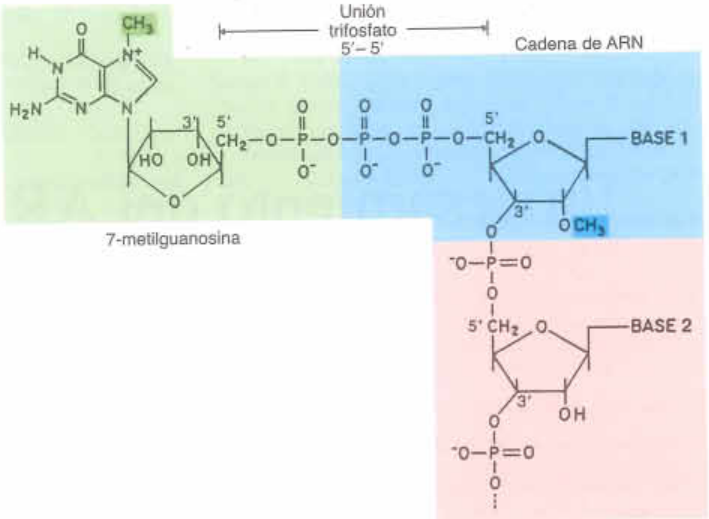


Fig. 15-2. Formación y estructura química del cap (capuchón) en el extremo 5′ del ARNm. Puede observarse que la 7-metilguanosina se liga al primer nucleótido del ARNm mediante una unión 5′-5′ trifosfato.

En primer término, una enzima específica incorpora una guanosina trifosfato (GTP) al extremo 5′ del transcripto. Esta reacción difiere de las generadas por la ARN polimerasa II en tres aspectos: 1) el nucleótido se agrega en el extremo 5′ de la cadena y no en el extremo 3′; 2) entre los nucleótidos se establece una unión trifosfato y no una unión fosfodiéster (uno de los P es aportado por el GTP y los otros dos por el nucleósido trifosfato del ARNm); 3) la unión trifosfato liga el C5′ de una pentosa con el C5′ de otra, y no un C5′ con un C3′ como en la síntesis de los ácidos nucleicos. Además, al quedar el nucleótido del cap invertido, el extremo 5′ del ARNm se convierte en un segundo extremo 3′.

A continuación, otra enzima, la metiltransferasa, toma dos grupos metilo de una molécula donante —la S-adenosilmetionina— y los transfiere al ARNm, uno a la guanina del cap —se forma así la 7-metilguanosina— y el otro al que ha pasado a ser, luego de la incorporación de la guanosina, el segundo nucleótido del ARN mensajero.

Debe señalarse que el cap se une al transcripto primario apenas éste comienza a sintetizarse —cuando su cadena no alcanza los 30 nucleótidos—, por lo que su incorporación no es postranscripcional sino cotranscripcional.

El cap evita la degradación del extremo 5′ del ARNm por fosfatasas o nucleasas y es requerido durante la remoción de los intrones (sección 15-5). También es necesario para conectar el ARNm al ribosoma en el comienzo de la traducción (cap. 16-12).

15-4. El extremo 3′ del ARNm se poliadenila

Lleva el nombre de **poliadenilación** el agregado de una secuencia de aproximadamente 250 adeninas —llamada **poli A**— en el extremo 3′ del ARNm. Dado que en el extremo 3′ de los genes que codifican ARNm no existe una secuencia de terminación de 250 timinas seguidas que genere la poli A, ésta se suma al ARNm de la siguiente manera (fig. 15-3):

Antes que la ARN polimerasa II alcance la secuencia de terminación del gen, varios factores específicos reconocen en el transcripto primario una secuencia

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DE

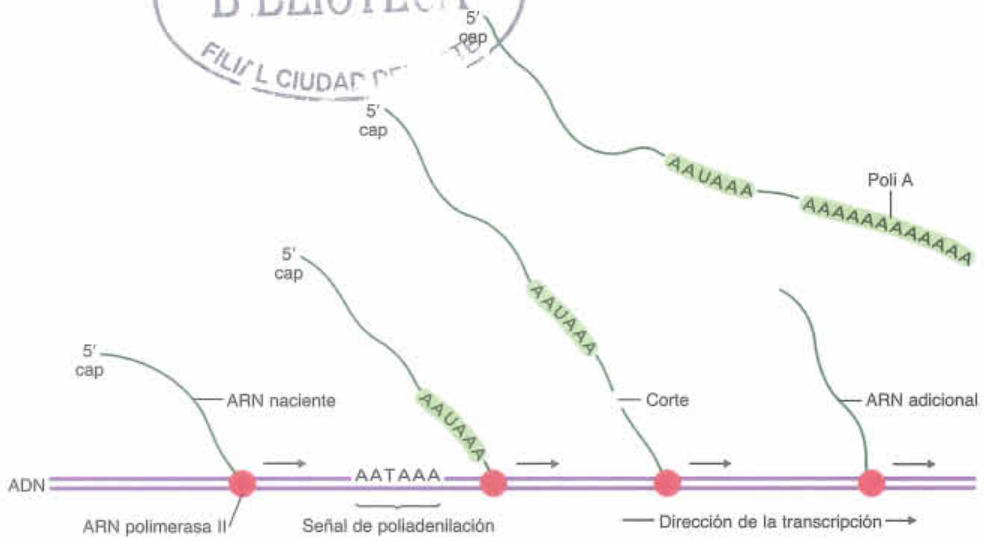


Fig. 15-3. Poliadenilación del extremo 3′ del ARNm antes de que termine la transcripción. Nótese que el extremo 5′ del ARNm ya posee el cap.

llamada **señal de poliadenilación**, formada por los nucleótidos AAUAAA (cap. 13-7). Los factores se llaman **CPSF** (por *cleavage and polyadenylation specificity factor*), **CSTF** (por *cleavage stimulation factor*), **CFI** y **CFII** (por *cleavage factor*). Uno de ellos —no se sabe cuál— corta el ARNm unos 20 nucleótidos después de la señal de poliadenilación, y el transcripto primario se desconecta del ADN.

Llamativamente, el resto del gen se transcribe hasta la secuencia de terminación (como se señaló en el capítulo 13-7, en los genes de los ARNm esta secuencia no se conoce). El tramo adicional de ARNm que resulta de la continuación de la transcripción no tarda en ser degradado por fosfatasas y nucleasas pues su extremo 5′ carece de cap.

Volviendo al transcripto primario, una enzima llamada **poli A polimerasa** agrega las 250 adeninas en su extremo 3′, de a una por vez. Para ello se requiere la presencia del CPSF y de otro factor, el **PABII** (por *poli A-binding protein*). A diferencia de la ARN polimerasa II, la poli A polimerasa no necesita un molde de ADN para realizar su trabajo.

La poli A es necesaria para proteger el extremo 3′ del ARNm de la degradación enzimática, y ayuda al ARNm a salir del núcleo.

El extremo 3′ de los ***ARNm de las histonas*** no se poliadenila. En cambio, desarrolla una estructura que también protege a la molécula, consistente en una secuencia corta de nucleótidos que se pliega y forma un **bucle** (fig. 15-4).

15-5. La molécula de los ARNm experimenta cortes y empalmes

La **remoción de los intrones** del transcripto primario se cumple en dos pasos: en el primero, el ARNm es cortado entre los intrones y los exones; en el segundo, los intrones son expulsados y los exones se empalman entre sí. Antes de analizar estos pasos haremos una breve descripción de los agentes

Fig. 15-4. Formación de un bucle en el extremo 3′ del ARNm de las histonas.

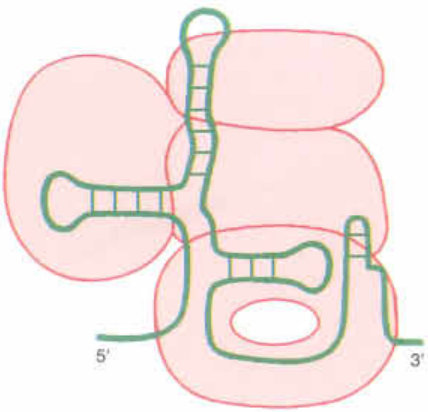


Fig. 15-5. Esquema de una de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPpn), con su ARN pequeño nuclear rico en uridinas unido a varias proteínas.

responsables de su ejecución y de las señales que deben reconocer en el transcripto primario.

Los agentes responsables de los **cortes y empalmes en el ARNm** son las **RNPpn** mencionadas en el capítulo 13-2. Cada una de estas ribonucleoproteínas nucleares posee un ***ARNpn*** rico en uridinas —de 250 nucleótidos o menos— y diversas proteínas (fig. 15-5). Debe señalarse que la actividad enzimática de las RNPpn depende del ARNpn, no de las proteínas (como se vio en el capítulo 2-12, los ARN con propiedades catalíticas se llaman ribozimas).

Existen varias RNPpn. Son diferentes no sólo en su composición sino también en sus funciones, algunas ajenas a los cortes y los empalmes de los transcriptos primarios. Las RNPpn que participan en esos cortes y empalmes son las llamadas **U1, U2, U4, U5** y **U6** (*U* por ser ricas en uridinas), las cuales concurren al sector del transcripto primario que va a ser procesado y forman un complejo macromolecular denominado **espliceosoma** (por *splicing*, empalme).

Entre las RNPpn que no participan en los cortes y empalmes de los transcriptos primarios se halla la **U7**, cuya presencia es necesaria para que se genere el bucle que protege al extremo 3′ de los ARNm de las histonas (sección 15-4).

El transcripto primario contiene una serie de señales que marcan dónde debe cortarse su molécula (figs. 15-1 y 15-6). Así, en el límite entre el extremo 3′ de los exones y el extremo 5′ de los intrones aparece la secuencia G|GU, en la que el dinucleótido **GU** señala el comienzo del intrón. En el otro límite, es decir, entre el extremo 3′ de los intrones y el extremo 5′ de los exones, aparece la secuencia AG|G, en la que el dinucleótido **AG** marca la terminación del intrón.

Dado que dentro y fuera de los intrones suele haber otros dinucleótidos GU y AG, por sí solos no sirven como señales y deben ser complementados por marcas adicionales. Así, cerca del extremo 3′ del intrón existe un tramo rico en pirimidinas y, algo más lejos, los nucleótidos YNYURAY, en el que Y representa a una pirimidina, R a una purina y N a cualquiera de los cuatro nucleótidos. La U y la A se presentan en forma constante. Esta **A** se llama **punto de ramificación** y, como se verá, desempeña un papel central en la remoción de los intrones.

La eliminación de los intrones y el empalme de los exones se produce en dos etapas (fig. 15-7):

En la primera, la U1 se combina con el extremo 5′ del intrón y la U2 con el tramo de ARN que contiene el punto de ramificación. Esta última combinación depende del tramo rico en pirimidinas y consume energía, que es tomada del ATP. La U1 corta al ARN entre el extremo 3′ del exón y el GU del

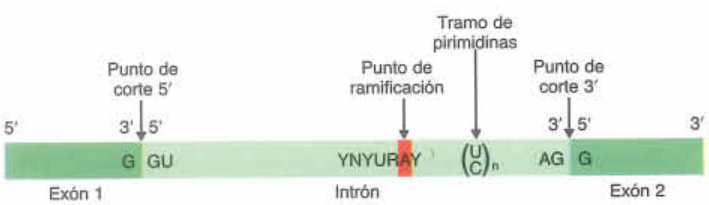


Fig. 15-6. Cortas secuencias de nucleótidos en los intrones y exones, responsables de los cortes y empalmes (*splicing*) en el transcripto primario.

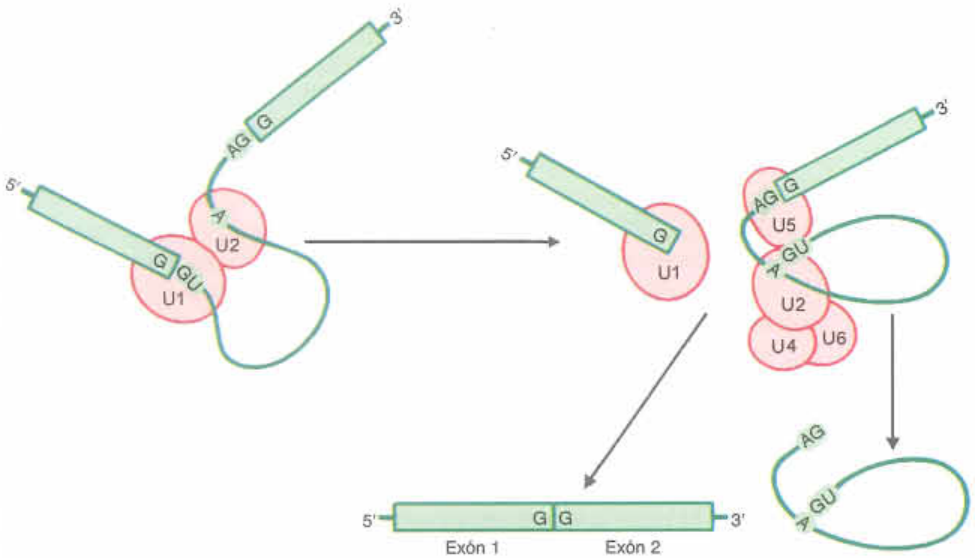


Fig. 15-7. Remoción de un intrón y empalme de los exones vecinos por acción de las RNPpn U1, U2, U4, U5 y U6.

extremo 5′ del intrón. Después del corte, el intrón se dobla sobre sí mismo y forma un lazo.

Ello se debe a que la U6 —asistida por la U4— se combina con el extremo 5′ (libre) del intrón e induce a la G de ese extremo a ligarse con la A del punto de ramificación, previo contacto de la U6 y la U4 con la U2. La U6 cataliza la formación de una unión fosfodiéster inusual, ya que el C5′ de la G no se liga al C3′ de la A sino al C2′.

Dado que la A retiene en sus flancos a las dos uniones fosfodiéster originales, presenta tres de esas uniones y no dos. Por eso se le ha dado el nombre de punto de ramificación. Cuando esta etapa culmina, de un lado queda el primer exón con su extremo 3′ libre y del otro un lazo compuesto por el intrón y el exón siguiente (fig. 15-7).

La segunda etapa es dirigida por la U5 y también requiere energía. Dicha ribonucleoproteína, luego de combinarse con la AG del extremo 3′ del intrón, lo corta en el punto en que se une con el exón y empalma a este último con el exón separado en la etapa anterior. El intrón removido, que persiste como un lazo, es finalmente digerido.

Recientemente se han descubierto intrones que se eliminan en forma similar pero mediante otras RNPpn (excepto la U5, que participa). Estos intrones carecen del tramo rico en pirimidinas y en sus extremos 5′ y 3′ contienen los dinucleótidos **AU** y **AC**, en lugar de los GU y AG de los intrones convencionales.

Las RNPpn que reemplazan a las U1, U2, U4 y U6 se denominan **U11**, **U12**, **U4$_{atac}$** y **U6$_{atac}$**, respectivamente (el subíndice "atac" hace referencia a los dinucleótidos AT y AC en el ADN, que corresponden a los dinucleótidos AU y AC en el ARN).

Para que las RNPpn den lugar a los cortes y empalmes se necesita la presencia del cap en el extremo 5′ del transcripto primario. En cambio, puesto que estas reacciones pueden producirse sin que se haya completado la síntesis del transcripto, no exigen la poliadenilación de su extremo 3′.

En algunos ARNm los cortes y empalmes se completan en segundos, en tanto que en otros tienen una duración de más de 20 minutos. Debe señalar-

se que el ARNm no puede atravesar los poros de la carioteca y salir al citoplasma si no fueron removidos todos sus intrones.

Una de las enfermedades autoinmunes que afectan al hombre —el ***lupus eritematoso***— se genera por la producción de anticuerpos contra varias proteínas de las RNPpn del espliceosoma.

15-6. Algunas adeninas del ARNm se metilan

Antes de abandonar el núcleo, la mayoría de los ARNm se metilan. Los grupos metilo se incorporan al N6′ de algunas adeninas (el 0,1% de éstas). Dado que este tipo de metilación se produce exclusivamente en los exones, es posible que los grupos metilo tengan una función protectora de los segmentos funcionales del transcripto primario.

REGULACION DEL PROCESAMIENTO DE LOS ARN MENSAJEROS Y DE SU SALIDA AL CITOSOL

15-7. El procesamiento de los ARNm es regulado en varios niveles

En el capítulo 14-6 se dijo que el control de la transcripción de los genes —operado a través del promotor y los reguladores— es el mecanismo más importante que utiliza la célula para determinar qué tipos de proteínas debe producir y en qué cantidades. No obstante, el control de la producción de la mayoría de las proteínas depende también de otros mecanismos —ahora postranscripcionales— de no menor importancia.

El más incipiente tiene lugar en el interior del núcleo mediante la regulación del procesamiento del transcripto primario. El que le sigue es menos frecuente y opera a través de la regulación de la salida del ARNm al citoplasma.

De estos dos mecanismos nos ocuparemos de inmediato. Dejamos para el próximo capítulo el análisis de los procesos regulatorios posteriores a dicha salida, es decir, los que ocurren después que los ARNm arriban al citoplasma.

Corte y poliadenilación diferencial del extremo 3′ del transcripto primario. Algunos genes —por ejemplo, los que codifican anticuerpos en los linfocitos B— generan un transcripto primario que puede dar lugar a dos cla-

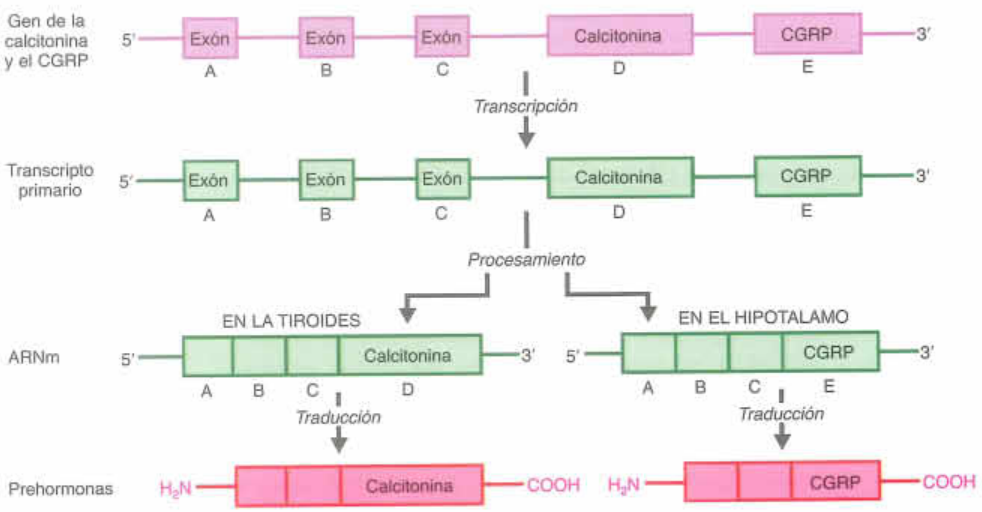


Fig. 15-8. Procesamiento alternativo del transcripto primario del gen de la calcitonina y la proteína CGRP. Se sintetiza uno u otro producto según el tipo celular implicado. (De S. Amara y col.)

ses de proteínas, aunque éstas se diferencian sólo por ser una más larga que la otra. Ello es porque un factor regulatorio determina que el corte del ARN en el extremo 3′ del transcripto primario —y por ende, el agregado de la poli A— se realice en puntos diferentes de la molécula, lo que posibilita la generación de dos ARNm de distinta longitud.

En el ejemplo citado, uno de los ARNm da lugar a una proteína que se segrega (anticuerpo) y el otro a una proteína de mayor longitud, cuya parte suplementaria sirve para anclar el anticuerpo a la membrana plasmática del linfocito B, en la que cumple funciones de receptor (cap. 7-13).

Cortes y empalmes en lugares alternativos del transcripto primario. Los cortes en el transcripto primario deben efectuarse con absoluta precisión, pues bastaría que el punto de incisión se corriera un solo nucleótido para que se alterasen los codones del ARNm y se inutilice su mensaje.

Por otro lado, la presencia de intrones convierte al transcripto primario en una molécula sumamente versátil, que puede ser cortada y empalmada de diferentes maneras, y a raíz de ello pueden crearse diversas clases de ARNm. Este hecho es posible porque —de acuerdo con sus necesidades— las células regulan el procesamiento de cada transcripto primario determinando qué combinación de intrones debe ser removida y cuáles permanecerán como partes de los ARNm definitivos.

Los cortes y empalmes alternativos son muy frecuentes, ya que la mayoría de los transcriptos primarios son cortados y empalmados de manera diferente en los distintos tipos de células. Veamos el siguiente ejemplo:

Las células parafoliculares de la tiroides y un tipo de neuronas del hipotálamo producen, entre otros, un transcripto primario prácticamente idéntico (fig. 15-8). No obstante, los lugares del transcripto en que tienen lugar los cortes y empalmes varían, pues si bien varios exones son removidos en ambas células, no son los mismos. Como resultado, en las células parafoliculares de la tiroides se origina el ARNm de la hormona ***calcitonina***, y en las neuronas hipotalámicas el ARNm de la proteína ***CGRP*** (por *calcitonin generelated product*).

Recientemente se han descubierto seis proteínas, llamadas **ASF** (por *alternative splicing factors*), que intervienen en la selección de los lugares de corte alternativos. Debido a que sus dominios son ricos en serinas y argininas, se conocen también como **proteínas SR** (la figura 2-25 informa que esos aminoácidos se identifican con las letras S y R, respectivamente).

Control de la salida de los ARNm al citosol. Se ha comprobado que ciertos ARNm no pasan al citoplasma porque son previamente degradados en el núcleo o porque es impedido su pasaje por los poros de la envoltura nuclear. Este mecanismo regulatorio se produce en las células que por causas funcionales deben prescindir de tales ARNm —y de sus correspondientes proteínas— después de haberlos sintetizado.

PROCESAMIENTO DEL ARN RIBOSOMICO 45S

15-8. El procesamiento del transcripto primario del ARNr 45S es diferente del experimentado por los ARNm

El transcripto primario del ARNr 45S no forma un cap en su extremo 5′ ni poliadenila su extremo 3′. Su procesamiento —ilustrado en la figura 15-9— tiene lugar en el **nucléolo** y comienza con una serie ordenada de cortes para

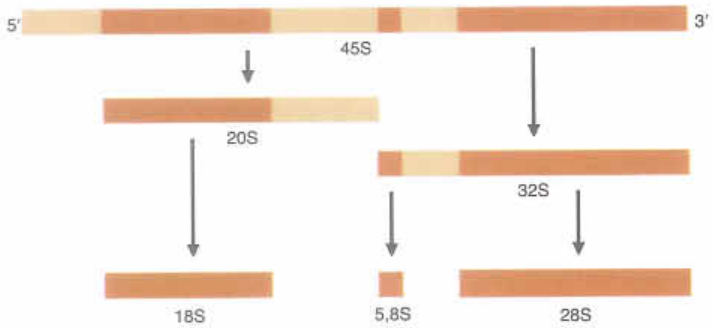


Fig. 15-9. Procesamiento del ARNr 45S, que da lugar a los ARNr 18S, 5,8S y 28S.

eliminar las secuencias espaciadoras de cada ARNr 45S (fig. 14-13) y hacer que los ARNr 28S, 18S y 5,8S queden como unidades independientes. El origen de estos ARNr a partir de un mismo transcripto primario asegura su producción equitativa. Las secuencias espaciadoras del transcripto primario son digeridas por enzimas apenas se separan de las secuencias utilizables.

Debe señalarse que las secuencias de los futuros ARNr 28S, 18S y 5,8S **se metilan** antes de ser cortado el transcripto primario. Por ejemplo, 43 grupos metilo se unen a las bases o a las ribosas de otros tantos nucleótidos del ARNr 18S. Algo semejante ocurre con el ARNr 28S, al que se le unen 74 grupos metilo. Igual que la metilación del ARNm (sección 15-6), es posible que en el ARNr 45S los grupos metilo tengan por función proteger a los sectores utilizables del transcripto primario.

El procesamiento del ARNr 45S incluye la formación de las dos subunidades del ribosoma —la mayor y la menor—, cuya composición se describe en el capítulo 16-9 (fig. 16-5). Para ello, los ARNr 28S, 18S y 5,8S (más el ARNr 5S) **se ensamblan con varias proteínas**. En este proceso intervienen tres **RNPpno** (cap. 13-2) llamadas **U3**, **U8** y **U22**. Se sabe que algunas proteínas ribosómicas se asocian al ARNr 45S mientras éste se sintetiza, es decir, antes de ser cortado y de ser separados sus tres componentes.

Los ARNr desarrollan asas en varios puntos de sus moléculas (fig. 15-11). Esto asegura el establecimiento de sus configuraciones tridimensionales normales, lo cual es imprescindible para que las proteínas ribosómicas se ensamblen correctamente. Las asas se forman porque los ARNr contienen secuencias de nucleótidos complementarios que **se aparean entre sí** (fig. 15-11). Debe agregarse que los tramos apareados forman dobles hélices similares a la del ADN.

Finalmente, un grupo especial de RNPpno hace que algunas A, C, G y U se conviertan en nucleótidos inusuales. Así, varias A, C y G se metilan —es decir, se transforman en ***mA***, ***mC*** y ***mG***— y una parte de las U se convierten en ***seudouridinas*** (ψ).

La enorme cantidad de ribosomas que necesita la célula es abastecida holgadamente por las 200 copias del gen del ARNr 45S (y por las 2.000 copias del gen del ARNr 5S). Además, la síntesis del ARNr 45S se realiza a una velocidad constante, lo que sugiere la existencia de una baja regulación transcripcional. En efecto, se ha comprobado que el número de ribosomas que la célula construye es regulado principalmente mediante el control del procesamiento del ARNr 45S.

15-9. La síntesis y el procesamiento del ARNr 45S tienen lugar en el nucléolo

Tanto la síntesis como el procesamiento del ARNr 45S se producen en el **nucléolo**, cuyo estudio ultramicroscópico muestra una estructura característica, con dos regiones perfectamente distinguibles (fig. 15-10):

1) La ***región fibrilar***, ubicada en la parte central, donde se sintetiza el ARNr 45S y se producen los primeros pasos de su procesamiento. Contiene las 200 copias del gen del ARNr 45S, moléculas de este ARNr, los factores UBF y SL1, la ARN polimerasa I, parte de las RNPpno, etc. A veces muestra zonas aisladas más claras, que corresponden a las copias inactivas del gen.

2) La ***región granular***, ubicada en la periferia, en la que se encuentran las subunidades de los ribosomas en distintos estadios de procesamiento. Esta región —y por lo tanto el nucléolo— no se halla envuelta por membrana alguna.

Como se indicó en el capítulo 13-8, las 200 copias del gen del ARNr 45S están distribuidas en las constricciones secundarias de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (figs. 12-15 y 12-16). Dada la condición diploide de los cromosomas, hay 10 de esas constricciones, por lo que existen en promedio 20 copias del gen en cada una. Los tramos de ADN en que se hallan esos genes emanan como asas de las constricciones secundarias, y en torno de ellas se construye el nucléolo. Cada asa —y, por consiguiente, las copias del gen contenidas en ella— representa una unidad llamada **organizador nucleolar**. El tamaño del nucléolo varía con la necesidad de la célula de generar ribosomas. La varia-

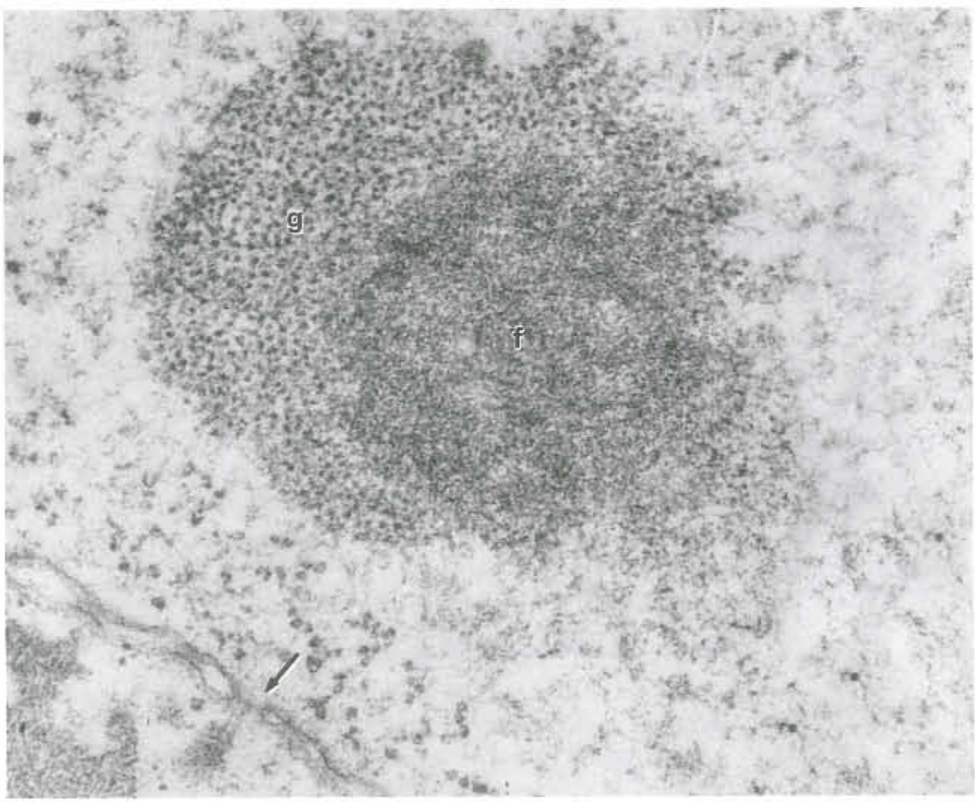


Fig. 15-10. Micrografía electrónica de un nucléolo con sus porciones fibrilar (*f*) y granular (*g*). La flecha señala materiales que salen al citoplasma a través de un poro nuclear. 70.000×. (Cortesía de O. Miller.)

ción depende de la región granular, que se expande o se retrae según el ritmo con que se procesan las subunidades ribosómicas.

Cuando estas subunidades están por terminar su procesamiento, abandonan el nucléolo y pasan al citosol. Salen del núcleo por los poros de la carioteca. Como el diámetro de las subunidades supera el diámetro de los poros, debe producirse un cambio conformacional en una de las dos estructuras —o en ambas— para que el pasaje pueda concretarse.

El procesamiento de las subunidades ribosómicas se completa en el citoplasma. Ello evita la formación de ribosomas completos en el nucleoplasma y el riesgo de que se sinteticen proteínas en el interior del núcleo.

PROCESAMIENTO DEL ARN RIBOSOMICO 5S

15-10. El ARNr 5S ingresa en el nucléolo

Una vez sintetizado, el ARNr 5S ingresa en el nucléolo y se incorpora a la subunidad ribosómica mayor. No se sabe por qué este ARNr se sintetiza en un lugar distinto del de los restantes ARNr.

Como los otros ARN ribosómicos, el ARNr 5S establece su configuración tridimensional merced a **apareamientos** de secuencias complementarias de su propia molécula (fig. 15-11).

PROCESAMIENTO DE LOS ARN DE TRANSFERENCIA

15-11. El procesamiento de los ARNt incluye modificaciones en algunos de sus nucleótidos

Los ARNt contienen entre 74 y 95 nucleótidos. Su procesamiento incluye la **remoción de un intrón**, que se elimina por un mecanismo diferente del utilizado por los ARNm, pues prescinde del espliceosoma.

Además, en cada tipo de ARNt un grupo determinado de nucleótidos experimentan cambios químicos (fig. 16-3). Así, algunas U son transformadas en ***seudouridinas*** (ψ), otras metiladas a ***ribotimidinas*** (***T***) y otras reducidas a ***dihidrouridinas*** (***D***). También es común que algunas A, C y G sean metiladas (***mA***, ***mC*** y ***mG***) y que una o más A sean convertidas en ***inosinas*** (***I***).

Como muestran las figuras 16-3 y 16-4, los ARNt contienen secuencias de nucleótidos complementarios que **se aparean entre sí**, lo que hace que adquieran la forma de una hoja de trébol y luego la forma de la letra L.

El procesamiento culmina con el reemplazo del trinucleótido AAA —presente en el extremo 3′ de los transcriptos primarios de todos los ARNt— por el **trinucleótido CCA**. En el capítulo 16-6 se valorará la importancia de este reemplazo.

PROCESAMIENTO DE LOS ARN PEQUEÑOS

15-12. Los ARN pequeños se asocian con proteínas

Una vez que los **ARNpn** terminan de sintetizarse, los nucleótidos complementarios de sus propias moléculas se aparean entre sí (fig. 15-5). Luego los ARNpn salen al citosol, se trimetilan en el extremo 5′ y se combinan con un complejo de siete proteínas denominadas **Sm** (por *small protein*), que tiene forma de anillo y es igual para todos los ARNpn. Finalmente, los ARNpn uni-

dos a las Sm retornan al núcleo y se asocian con otras proteínas, esta vez específicas para cada tipo de ARNpn. Debe señalarse que lo descrito hasta aquí vale sólo para los ARNpn que intervienen en los cortes y empalmes de los ARNm, pues del procesamiento de los restantes se conoce poco; por ejemplo, que la trimetilación del extremo 5′ de algunos de estos ARNpn no ocurre en el citosol sino en el núcleo.

Antes de salir del núcleo, el **ARNpc** experimenta los siguientes cambios: 1) varias secuencias complementarias de su molécula se aparean entre sí; 2) se asocia con seis proteínas diferentes, lo que da lugar al complejo nucleoproteico **PRS** (cap. 7-12). En la figura 7-10 se indican los pesos moleculares de las seis proteínas y se muestra cómo se asocian con el ARNpc y entre sí.

PROCESAMIENTO DEL ARNxist, DEL ARNte Y DE LOS miARN

15-13. El ARNxist y el ARNte permanecen en el núcleo y los miARN salen al citoplasma

El **ARNxist** permanece en el núcleo, ya que como se dijo en el capítulo 14-12, se une al cromosoma X compactado de las células de la mujer (cuerpo de Barr).

El **ARNte** también permanece en el núcleo. Uno de los pasos salientes de su procesamiento lo asocia con el grupo de proteínas que participan en la formación de la telomerasa (cap. 17-9) (fig. 17-12).

15-14. Los miARN salen al citosol y se unen con el complejo RISC

La transcripción de los genes de los **miARN** origina transcriptos primarios de más de 100 nucleótidos que contienen dos secuencias complementarias e invertidas, derivadas de las repeticiones invertidas de los propios genes

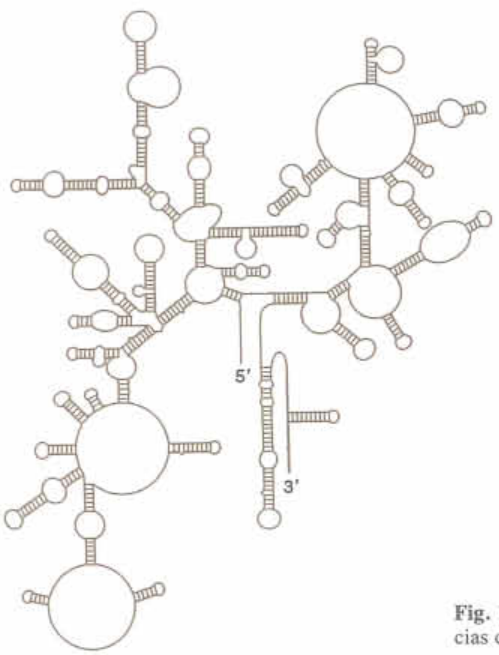


Fig. 15-11. Forma como se aparean las secuencias complementarias en los ARN ribosómicos.

(cap. 13-12) (fig. 13-12). Debido a que esas secuencias se aparean entre sí, los transcriptos primarios —o **pri-miARN**— adquieren la forma de una horquilla (fig. 15-12).

El pri-miARN es procesado en el interior del núcleo por la ribonucleasa **Drosha** (por *Drosophila*). Esta enzima cercena gran parte de los extremos de la horquilla (fig. 15-12) y la convierte en **pre-miARN**, que sale del núcleo con la ayuda de una exportina (cap. 12-4) y se instala en el citosol.

El pre-miARN posee unos 70 nuclétidos y es procesado por la ribonucleasa **Dicer** (por el verbo inglés *to dice*). Esta enzima suprime partes del pre-miARN y genera un **miARN doble** que posee dos o tres nucléotidos libres en

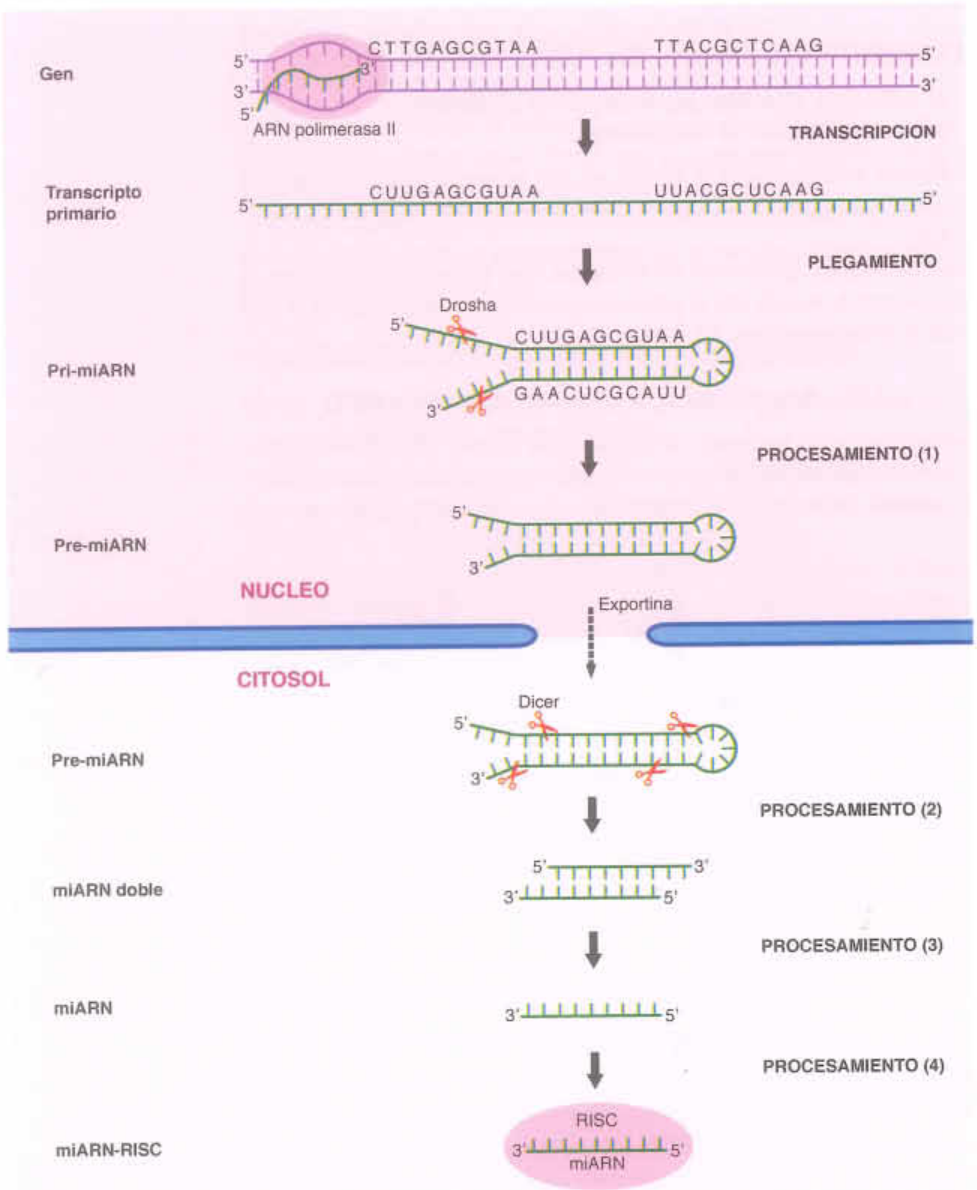


Fig. 15-12. Transcripción del gen de un miARN y procesamiento de su transcripto primario (o pri-miARN).

el extremo 3' de cada cadena (fig. 15-12). Por razones que veremos a continuación, una de las cadenas se llama ***guía*** y la otra, ***pasajera***.

El procesamiento se completa cuando el miARN doble se une al complejo proteico **RISC** (por *RNA-induced silencing complex*), que degrada a la cadena pasajera pero continúa unido a la cadena guía. Esta última —un ARN simple de 21 a 26 nucleótidos de largo— adquiere el nombre de **miARN** y con el RISC compone el complejo ribonucleoproteico **miARN-RISC** (fig. 15-12), cuyas funciones se analizan en los capítulos 16-20, 23-44 y 23-45.

BIBLIOGRAFIA

Anderson K. and Moore M.J. (1997) Bimolecular exon ligation by the human spliceosome. Science 276:1712.

Bachellerie J.P. and Cavaillé J. (1997) Guiding ribose methylation od rRNA. TIBS 22:257.

Breitbart R.E., Andreadis A. and Nadal-Ginard B. (1987) Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Annu. Rev. Biochem. 56:467.

Cech T.R. (2000) The ribosome is a ribozyme. Science 289:878.

Darnell J.E. Jr. (1983) The processing of RNA. Sci. Am. 249:90.

Draper D.E. (1996) Strategies for RNA folding. TIBS 21:145.

Green M.R. (1991) Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. Annu. Rev. Cell Biol. 7:559.

Guo Z. and Sherman F. (1996) 3'-end-forming signals of yeast mRNA. TIBS 21:477.

Guthrie C. and Patterson B. (1988) Spliceosomal snRNAs. Annu. Rev. Genet. 22:387.

Hutvágner G. and Zamore P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science 297:2056.

Izquierdo J.M. and Valcárcel J. (2006) A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing. Genes Dev. 20:1679.

Kreivi J.P. and Lamond A.I. (1996) RNA splicing: unexpect ed spliceosome diversity. Curr. Biol. 6:802.

Lindahl T. et al. (1995) Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. TIBS 20:405.

McDevitt M.A., Gilmartin G.M. and Nevins J.R. (1988) Multiple factors are required for poly(A) addition to a mRNA 3' end. Genes Dev. 2:588.

Nilsen T.W. (1996) A parallel spliceosome. Science 273:1813.

Nishikura K. and De Robertis E.M. (1981) RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes: Sequential of base modifications in a spliced transfer RNA. J. Mol. Biol. 145:405.

Padgett R.A. et al. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. Annu. Rev. Biochem. 55:1119.

Peculis B. (1997) RNA processing: Pocket guides to ribosomal RNA. Curr. Biol. 7:R480.

Pellizzoni L., Yong J. and Dreyfuss G. (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. Science 298:1775.

Query C.C. and Konarska M.M. (2006) Splicing fidelity revisited. Nature Struct. Mol. Biol. 13:472.

Rio D.C. (1992) RNA binding proteins, splice site selection, and alternative pre-mRNA splicing. Gene Express. 2:1.

Rossi J.J. (1999) Ribozymes in the nucleolus. Science 285:1685.

Shatkin A.J. (1976) Capping of eukaryotic mRNAs. Cell 9:645.

Smith J.D. (1976) Transcription and processing of transfer RNA precursor. Prog. Nucleic Acid Res. 16:25.

Terns M.P. and Dahlberg J.E. (1994) Retention and 5' cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. Science 264:959.

Tollervey D. (1996) Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. Science 273:1056.

Valcárcel J. and Green M.R. (1996) The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing. TIBS 21:296.

Wahle E. and Keller W. (1996) The biochemistry of polyadenylation. TIBS 21:247.

Will C.L. et al. (1999) Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes. Science 284:2003.

Wise J.A. (1993) Guides to the heart of the spliceosome. Science 262:1978.

Wu Q. and Krainer A.R. (1996) U1-mediated exon definition interactions between AT-AC and GT-AG introns. Science 274:1005.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

16 Traducción del ARNm

Síntesis de proteínas

16-1. Los ARNt desempeñan un papel central en la síntesis de las proteínas

La síntesis proteica tiene lugar en el **ribosoma**, que se arma en el citosol a partir de dos subunidades ribonucleoproteicas provenientes del nucléolo. En el ribosoma, el **ARN mensajero** (**ARNm**) se traduce en una proteína, para lo cual se requiere también la intervención de los **ARN de transferencia** (**ARNt**). El trabajo de los ARNt consiste en tomar a los aminoácidos del citosol y conducirlos al ribosoma en el orden marcado por los nucleótidos del ARNm, que son los moldes del sistema.

La síntesis de una proteína comienza con la unión entre sí de dos aminoácidos y continúa por el agregado de nuevos aminoácidos —de a uno por vez— en uno de los extremos de la cadena proteica.

Como se vio en el capítulo 13-4, la clave de la traducción reside en el **código genético**, compuesto por combinaciones de tres nucleótidos consecutivos —o **tripletes**— en el ARNm. Los distintos tripletes se relacionan específicamente con los 20 tipos de aminoácidos usados en la síntesis de las proteínas.

Cada triplete constituye un **codón**; existen en total 64 codones, 61 de los cuales sirven para cifrar aminoácidos y 3 para marcar el cese de la traducción. Tal cantidad deriva de una relación matemática simple: los cuatro nucleótidos (A, U, C y G) se combinan de a tres, por lo que pueden generarse 64 (4^3) combinaciones. El código genético, con los 64 tripletes y los aminoácidos que especifican, puede consultarse en la figura 13-4.

Dado que existen más codones (61) que tipos de aminoácidos (20), casi todos pueden ser reconocidos por más de un codón, por lo que algunos tripletes actúan como "sinónimos". Solamente el triptófano y la metionina —dos de los aminoácidos menos frecuentes en las proteínas— son codificados, cada uno, por un solo codón.

Generalmente los codones que representan a un mismo aminoácido se parecen entre sí y es frecuente que difieran solamente en el tercer nucleótido (fig. 13-4). La baja especificidad de este nucleótido ha llevado a decir que existe una ***"degeneración"*** en la tercera base de la mayoría de los codones.

Resta agregar que el número de codones en el ARNm determina la longitud de la proteína.

Fig. 16-1. Los dibujos ilustran cuatro de los seis codones que codifican al aminoácido leucina (*Leu*). Los dos de la izquierda se aparean con un mismo anticodón, al igual que el par de codones de la derecha. Ello es posible porque la tercera base de los codones suele ser "adaptable", es decir, puede establecer uniones con una base no complementaria.

16-2. Existen 31 tipos diferentes de ARNt

Las moléculas intermediarias entre los codones del ARNm y los aminoácidos son los ARNt, los cuales tienen un dominio que se liga específicamente a uno de los 20 aminoácidos y otro que lo hace, específicamente también, con el codón apropiado. El segundo dominio consta de una combinación de tres nucleótidos —llamada **anticodón**— que es complementaria de la del codón (fig. 16-1).

Cada tipo de ARNt lleva antepuesto el nombre del aminoácido que transporta. Por ejemplo, leucinil-ARNt para el aminoacil-ARNt de la leucina, lisinil-ARNt para el de la lisina, fenilalanil-ARNt para el de la fenilalanina, metionil-ARNt para el de la metionina, etcétera.

Por su lado, el ARNt unido al aminoácido compatible con él se designa **aminoacil-ARNt^{AA}**, en el que "AA" corresponde a la sigla del aminoácido. Por ejemplo, leucinil-ARNt^{Leu}, lisinil-ARNt^{Lys}, fenilalanil-ARNt^{Phe}, metionil-ARNt^{Met}, etcétera.

Si bien teóricamente pueden existir 61 tipos de ARNt diferentes, sólo hay 31. El déficit se resuelve por la capacidad que tienen algunos ARNt de reconocer a más de un codón. Lo logran porque sus anticodones suelen poseer la primera base ***"adaptable"***, es decir, que puede unirse con una base no complementaria situada en la tercera posición del codón (recuérdese la "degeneración" de esta base).

Así, la G en la primera posición del anticodón puede aparearse tanto con una C —es lo habitual— como con una U del codón (fig. 16-1). Similarmente, la U en la primera posición del anticodón puede hacerlo con una A —es lo habitual— o con una G. Por otra parte, la inosina (I) —una de las bases inusuales mencionadas en el capítulo 15-11— se encuentra en la primera posición del anticodón en varios ARNt y es capaz de aparearse con cualquier base (excepto con una G) localizada en la tercera posición del codón.

16-3. El codón de iniciación es el triplete AUG

El primer codón que se traduce en los ARNm es siempre el triplete **AUG**, cuya información codifica al aminoácido ***metionina*** (figs. 13-4 y 16-2). Por lo tanto, este codón cumple dos funciones: señala el sitio de comienzo de la traducción —caso en el cual recibe el nombre de **codón de iniciación**—, y cuando se halla en otras localizaciones en el ARNm codifica a las metioninas del interior de la molécula proteica.

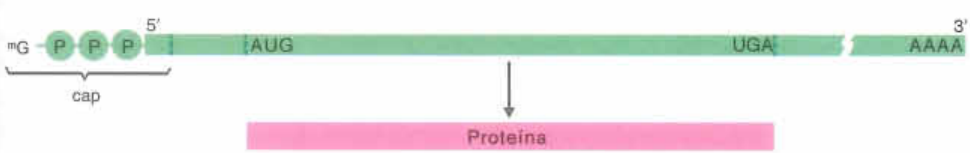


Fig. 16-2. Esquema de un ARN mensajero, con sus distintos componentes.

Al especificar el primer aminoácido de la proteína, el codón AUG de iniciación determina el **encuadre** de los sucesivos tripletes, lo que asegura la síntesis correcta de la molécula. Tómese como ejemplo la secuencia AUGGCCUGUAACGGU. Si el ARNm es traducido a partir del codón AUG, los codones siguientes serán GCC, UGU, AAC y GGU, que codifican, respectivamente, a los aminoácidos alanina, cistina, asparagina y glicina. En cambio, si se omitiera la A del codón de iniciación, el encuadre de los tripletes sería el siguiente: UGG, CCU, GUA y ACG, los cuales se traducen en los aminoácidos triptófano, prolina, valina y treonina, respectivamente. Algo semejante ocurriría si también se omitiera la U, pues resultaría un tercer tipo de encuadre: GGC, CUG, UAA y CGG. En este caso, después de codificar los dos primeros codones a los aminoácidos glicina y leucina, la traducción se detendría, ya que UAA es un codón de terminación.

16-4. Los aminoácidos se ligan por medio de uniones peptídicas

La unión de los aminoácidos entre sí para construir una proteína se produce de modo que el grupo carboxilo de un aminoácido se combina con el grupo amino del aminoácido siguiente, con pérdida de una molécula de H_2O (fig. 2-26). En el capítulo 2-8 vimos que esa combinación se llama **unión peptídica**.

Cualquiera que sea su longitud, la proteína mantiene el carácter anfotérico de los aminoácidos aislados, ya que contiene un grupo amino libre en uno de sus extremos y un grupo carboxilo en el otro extremo. La proteína se sintetiza a partir del extremo que lleva el grupo amino libre. Ello se corresponde con la dirección 5′→3′ usada para la traducción del ARNm, la misma con que el ADN se transcribe (fig. 16-9).

Antes de describir los procesos que dan lugar a la síntesis de las proteínas, analizaremos cómo arriban los ARNm al citoplasma, qué configuración poseen los ARNt y cuál es la estructura de los ribosomas.

16-5. Los ARNm arribados al citoplasma se conectan con ribosomas

Como vimos en el capítulo 14-5, en el núcleo los transcriptos primarios de los ARNm se hallan combinados con diversas proteínas, con las que forman las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares o RNPhn. No obstante, muchas de esas proteínas se desprenden de los ARNm a medida que éstos abandonan el núcleo.

Los ARNm salen hacia el citoplasma por los poros de la envoltura nuclear. Ya en el citosol, cada ARNm se combina con nuevas proteínas y con ribosomas, lo que lo habilita para ejercer su función codificadora durante la síntesis proteica. Entre las proteínas se encuentra la llamada **CBP** (por *cap binding protein*), que se combina con el cap en el extremo 5′ del ARNm. Su papel se analizará en la sección 16-12.

Algunos ARNm se localizan en sitios prefijados en el citoplasma, de modo que las proteínas que codifican se sintetizan y se concentran en esos sitios. Un ejemplo es el ARNm de la actina, que se sitúa en la zona periférica de las células epiteliales, donde se deposita la mayor parte de la actina (cap. 5-20).

El extremo 5′ de los ARNm contiene una secuencia de alrededor de 10 nucleótidos previa al codón de iniciación —entre éste y el cap— que, como es

lógico, no se traduce (fig. 16-2). En algunos ARNm esta secuencia participa en el control de la traducción y en otros regula la estabilidad del ARNm, es decir, su supervivencia.

Otra secuencia especial del ARNm, de hasta miles de nucleótidos, suele hallarse después del codón de terminación, entre éste y la poli A (fig. 16-2). Tiene por función controlar la supervivencia del ARNm.

16-6. Las moléculas de los ARNt adquieren una forma característica

Hemos visto que los codones del ARNm no seleccionan a los aminoácidos directamente. Durante la traducción esa función la cumplen los ARNt, unas moléculas intermediarias diseñadas para discriminar a los codones y a los aminoácidos compatibles con ellos. Así, la función principal de los ARNt es alinear a los aminoácidos siguiendo el orden marcado por los codones del ARNm.

A fin de ejercer sus funciones, los ARNt adquieren una forma característica, primero parecida a una ***hoja de trébol*** y luego a la ***letra L***. Como muestran las figuras 16-3 y 16-4, los cuatro brazos de la hoja de trébol se generan porque los ARNt poseen cuatro pares de secuencias complementarias —de 3 a 6 nucleótidos cada una— que se aparean como lo hacen las dos cadenas del ADN.

Los extremos 5′ y 3′ de los ARNt se hallan juntos en la punta de uno de los brazos, la cual recibe el nombre de **extremo aceptador** debido a que acoge al aminoácido. Este se conecta con el último nucleótido del extremo 3′ del ARNt, es decir, con la adenina del **trinucleótido CCA** formado durante el procesamiento (cap. 15-11) (fig. 16-4).

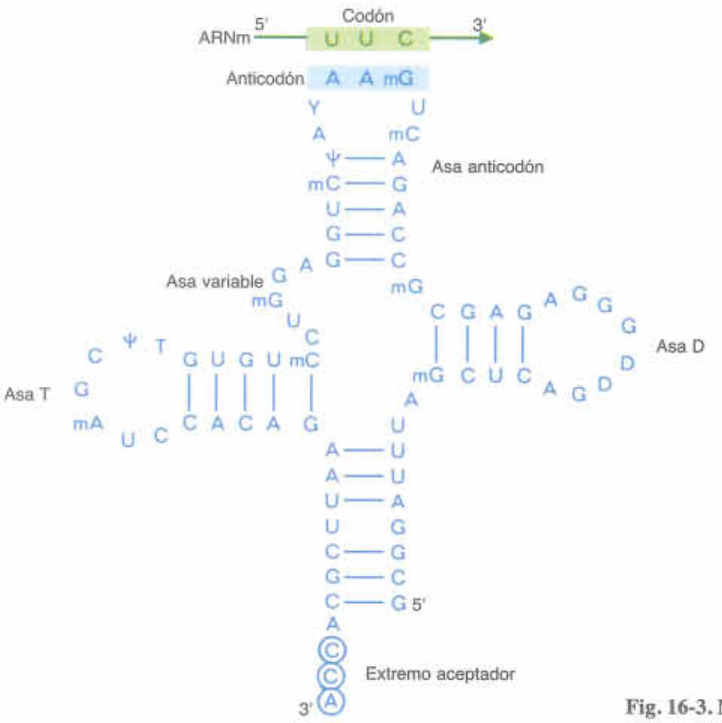


Fig. 16-3. Modelo en hoja de trébol de los ARNt.

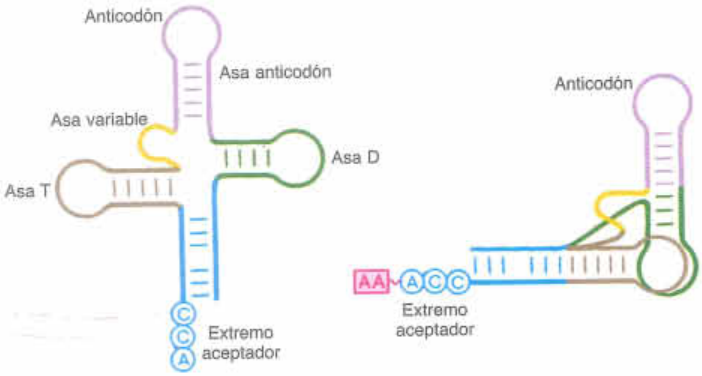


Fig. 16-4. Estructura terciaria de los ARNt, que concluye con una configuración en L. La molécula de la derecha es un aminoacil-ARNt^{AA} porque el extremo aceptador del ARNt posee un aminoácido (*AA*). Obsérvese que éste se halla conectado a la adenina del trinucleótido CCA.

Los otros brazos de la hoja de trébol presentan en sus partes distales secuencias de 7 a 8 nucleótidos no apareados, con forma de asas, cuyas denominaciones derivan de los nucleótidos que las caracterizan. Una de ellas, debido a que posee el trinucleótido TψC, se conoce como **asa T** (en el capítulo 15-11 se dijo que la letra T simboliza a la ribotimidina y la ψ a la seudouridina). Otra, en virtud de que contiene dihidrouridinas (éstas se identifican con la letra D) se denomina **asa D**. La tercera contiene el triplete de nucleótidos del anticodón, por lo que se llama **asa anticodón** (obviamente, su composición varía en los distintos tipos de ARNt).

Existe un asa adicional entre el asa T y el asa anticodón. Debido a que su longitud difiere en cada tipo de ARNt, recibe el nombre de **asa variable**.

El plegamiento ulterior de los ARNt hace que dejen de parecerse a una hoja de trébol y adquieran la forma de la letra L. Se debe a que algunos nucleótidos establecen apareamientos inusuales entre sí, como por ejemplo la combinación de un nucleótido con dos a la vez. La figura 16-4 muestra que al cabo de este plegamiento el asa anticodón se halla en una de las puntas de la L, el extremo aceptador en la otra punta, y las asas D y T quedan juntas en la zona de unión de ambos brazos.

16-7. Una aminoacil-ARNt sintetasa une el aminoácido al ARNt

El aminoácido se liga a su correspondiente ARNt por la acción de una enzima llamada **aminoacil-ARNt sintetasa**, que cataliza la unión en dos pasos.

Durante el primero, el aminoácido se liga a un AMP, con el cual forma un **aminoacil-AMP**. Por ejemplo, leucinil-AMP, lisinil-AMP, fenilalanil-AMP, metionil-AMP, etc. Dado que el AMP deriva de la hidrólisis de un ATP, se libera un pirofosfato (PP) y energía, que también pasa al aminoacil-AMP.

$$AA + ATP \xrightarrow[\text{sintetasa}]{\text{aminoacil}} AA\text{-}AMP + PP$$

En el segundo paso esa energía es utilizada por la aminoacil-ARNt sintetasa para transferir el aminoácido del aminoacil-AMP a la A del extremo aceptador del ARNt compatible, con lo cual se forma una molécula esencial para la síntesis proteica: el **aminoacil-ARNt^{AA}** que reconoce al codón complementario en el ARNm (fig.16-4).

$$AA\text{-}AMP + ARNt \xrightarrow[\text{sintetasa}]{\text{aminoacil}} AA\text{-}ARNt^{AA} + AMP$$

Debe señalarse que la energía del ATP usada en la primera reacción queda depositada en la unión química entre el aminoácido y la A del trinucleótido CCA.

16-8. Existen 20 aminoacil-ARNt sintetasas diferentes

La célula posee 20 aminoacil-ARNt sintetasas diferentes, cada una diseñada para reconocer a un aminoácido y al ARNt compatible con él. Ambos reconocimientos permiten que cada uno de los 31 tipos de ARNt se ligue sólo a uno de los 20 aminoácidos usados en la síntesis proteica. Ello es posible porque cada aminoacil-ARNt sintetasa identifica al ARNt por el anticodón, la parte más específica del ARNt (fig. 16-3). No obstante, en los ARNt existen otras señales que son reconocidas por la enzima, generalmente tramos de nucleótidos cercanos al anticodón.

Como es obvio, la existencia de 11 clases de ARNt en exceso —o redundantes— hace que algunos aminoácidos sean reconocidos por más de un ARNt.

Uno de los ARNt redundantes es el llamado **ARNt iniciador** o **ARNt[i]**, pues transporta a la metionina destinada exclusivamente al codón AUG de iniciación (fig. 16-9). Es muy probable que cerca de ese codón existan señales que diferencien al metionil-ARNt[i]^{Met} —portador de la metionina dirigida a él— de los metionil-ARNt^{Met} comunes, portadores de las metioninas destinadas a los restantes codones AUG del ARNm.

16-9. Los ribosomas están compuestos por dos subunidades

Los mecanismos para alinear a los aminoacil-ARNt^{AA} de acuerdo con el orden de los codones del ARNm son algo complicados. Requieren de los **ribosomas**, cuya primera tarea es localizar al codón AUG de iniciación y acomodarlo correctamente para que el encuadre de ese triplete y el de los siguientes sea el adecuado (sección 16-3).

Luego el ribosoma se desliza hacia el extremo 3′ del ARNm y traduce a los sucesivos tripletes en aminoácidos. Estos son traídos —de a uno por vez— por los respectivos ARNt. Las reacciones que ligan a los aminoácidos entre sí —es decir, las uniones peptídicas— se producen dentro del ribosoma. Finalmente, cuando el ribosoma arriba al codón de terminación —en el extremo 3′ del ARNm— cesa la síntesis proteica y se libera la proteína. Como se ve, los ribosomas constituyen las "fábricas" de las proteínas.

Cada ribosoma está compuesto por dos **subunidades** —una **menor** y otra **mayor**—, que se identifican con las siglas **40S** y **60S**, respectivamente (figs. 7-4 y 16-5). La letra S hace referencia a la unidad *Svedberg* de sedimentación y los números corresponden a los coeficientes de sedimentación de las partículas que se analizan, es decir, a las velocidades con que sedimentan cuando son ultracentrifugadas. Así, de las dos subunidades del ribosoma, la 60S es la que migra más rápidamente hacia el fondo del tubo por acción de la fuerza centrífuga. Juntas, las subunidades 40S y 60S forman la unidad **80S**, que representa al ribosoma completo (los números no se adicionan debido a que los coeficientes de sedimentación no equivalen a los pesos de las partículas).

Cada subunidad ribosómica está integrada por una o más moléculas de

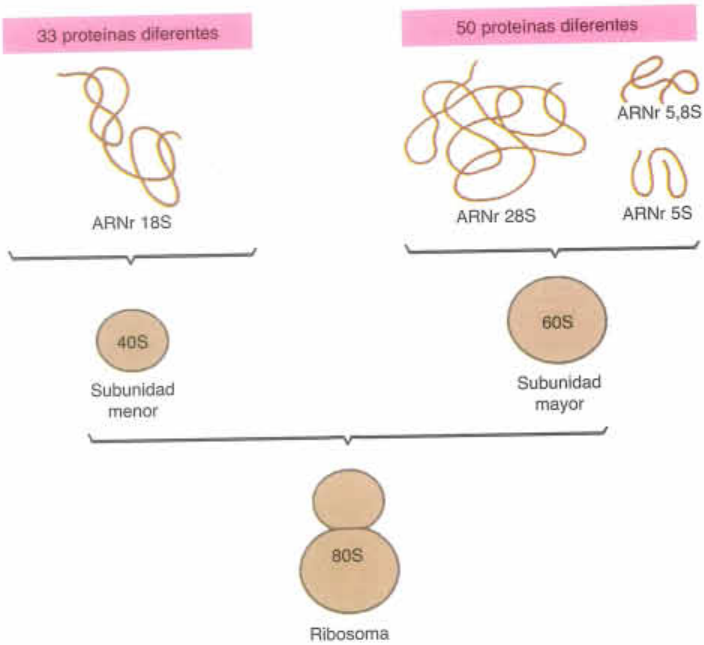


Fig. 16-5. Moléculas que participan en la formación de los ribosomas citosólicos.

ARNr más un determinado número de proteínas. Así, la subunidad mayor contiene los ARNr 28S, 5,8S y 5S más 50 proteínas; la subunidad menor, el ARNr 18S más 33 proteínas (fig. 16-5). Las proteínas de la subunidad mayor se denominan L1, L2, [...] L50 (L por *large*), y las de la subunidad menor, S1, S2, [...] S33 (S por *small*).

Dado que las 83 proteínas ribosómicas se construyen a partir de otros tantos ARNm, puede decirse que los componentes del ribosoma derivan de 85 genes (83 corresponden a las proteínas, uno al ARNr 45S y otro al ARNr 5S).

16-10. Se conocen las estructuras y las funciones de las dos subunidades del ribosoma

La ***subunidad menor*** del ribosoma es de forma muy irregular. En una de sus caras —la que se relaciona con la subunidad mayor— existe un **canal** por el que se desliza el ARNm (fig. 16-6). Junto al canal se observan tres áreas excavadas contiguas —denominadas **sitio A** (por *aminoacil*), **sitio P** (por *peptidil*) y **sitio E** (por *exit*, salida)—, cuyas funciones se analizan en la sección 16-12. La figura 16-9 muestra las ubicaciones relativas de los sitios A, P y E.

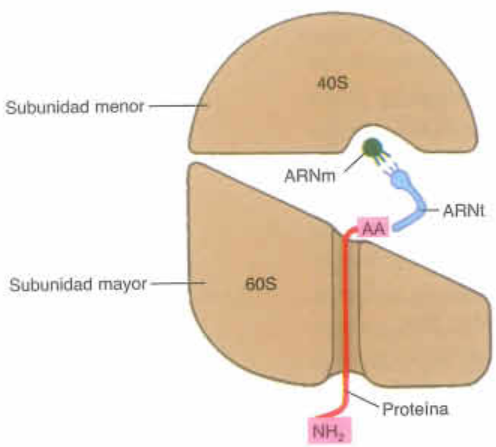


Fig. 16-6. Esquema de las dos subunidades del ribosoma, con las ubicaciones del ARNm (cortado transversalmente) y del ARNt ligado al aminoácido (*AA*). La cadena polipeptídica recorre un túnel situado en la subunidad mayor.

La ***subunidad mayor*** es también muy irregular. De una de sus caras —la que se relaciona con el canal y los sitios A, P y E de la subunidad menor— nace un **túnel** diseñado para que la proteína salga del ribosoma a medida que se sintetiza (fig. 16-6).

Ambas subunidades se reparten el trabajo que realiza el ribosoma. La subunidad menor coloca juntos a los ARNt para que los aminoácidos que transportan se liguen entre sí, es decir, para que se produzcan las uniones pep-

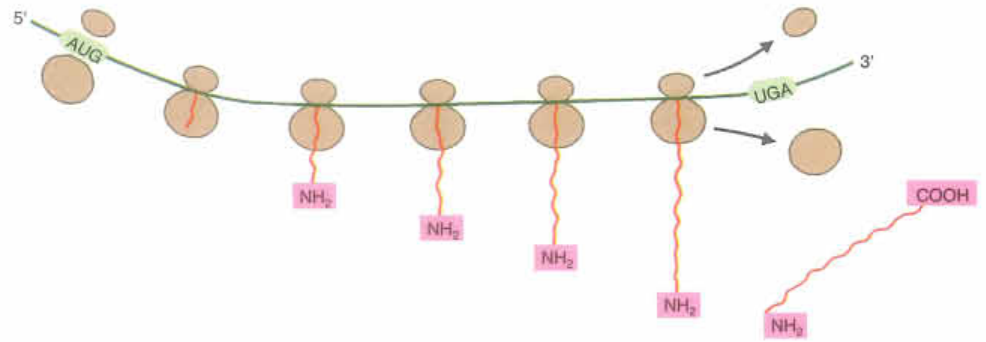


Fig. 16-7. Formación del polirribosoma por la asociación de varios ribosomas a un solo ARNm.

tídicas. En cambio, la subunidad mayor cataliza dichas uniones y asiste a los factores que regulan la síntesis proteica (secciones 16-12 a 16-14). Debe señalarse que la función catalítica de la subunidad mayor no está a cargo de una de sus proteínas sino de uno de sus ARNr, que obra como una ribozima (cap. 2-12).

16-11. Los polirribosomas se forman al asociarse una molécula de ARNm con muchos ribosomas

Cada ARNm suele ser traducido por varios ribosomas simultáneamente, que se deslizan por él en dirección 5′→3′ en fila india, separados entre sí por una distancia de alrededor de 30 codones. Como se describió en el capítulo 7-5, la asociación de un ARNm con varios ribosomas se llama **polisoma** o **polirribosoma** (fig. 16-7). Las figuras 1-10 y 7-3 muestran que es claramente detectable en las imágenes ultramicroscópicas.

Los ribosomas se encuentran libres en el citosol o adosados a la membrana del RE (figs. 1-10, 7-4, 7-6 y 16-8). Los primeros elaboran proteínas destinadas al citosol, al núcleo, a las mitocondrias o a los peroxisomas. Los segundos elaboran proteínas que se insertan en la membrana del RE o se vuelcan en la luz del organoide (cap. 7-13); estas proteínas permanecerán en el RE o se transferirán —mediante vesículas de transporte— al complejo de Golgi, desde donde podrán pasar a los endosomas, a la membrana plasmática, o salir al exterior.

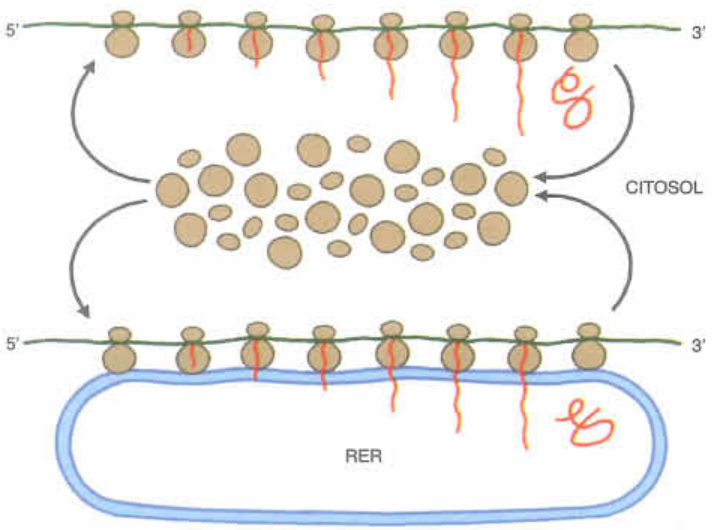


Fig. 16-8. Formación de los polirribosomas libres en el citosol y de los asociados al retículo endoplasmático rugoso.

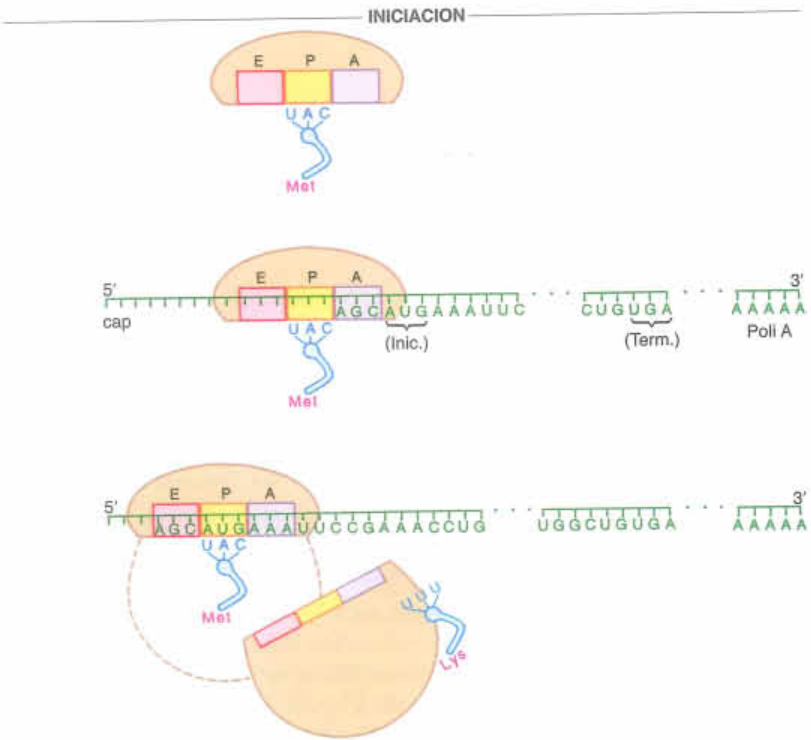


Fig. 16-9. Etapas de iniciación, de alargamiento y de terminación de la síntesis proteica en el ribosoma.

LAS ETAPAS DE LA SINTESIS PROTEICA

La síntesis de las proteínas se divide en tres etapas, llamadas de iniciación, de alargamiento y de terminación (fig. 16-9).

16-12. El comienzo de la síntesis proteica requiere varios factores de iniciación

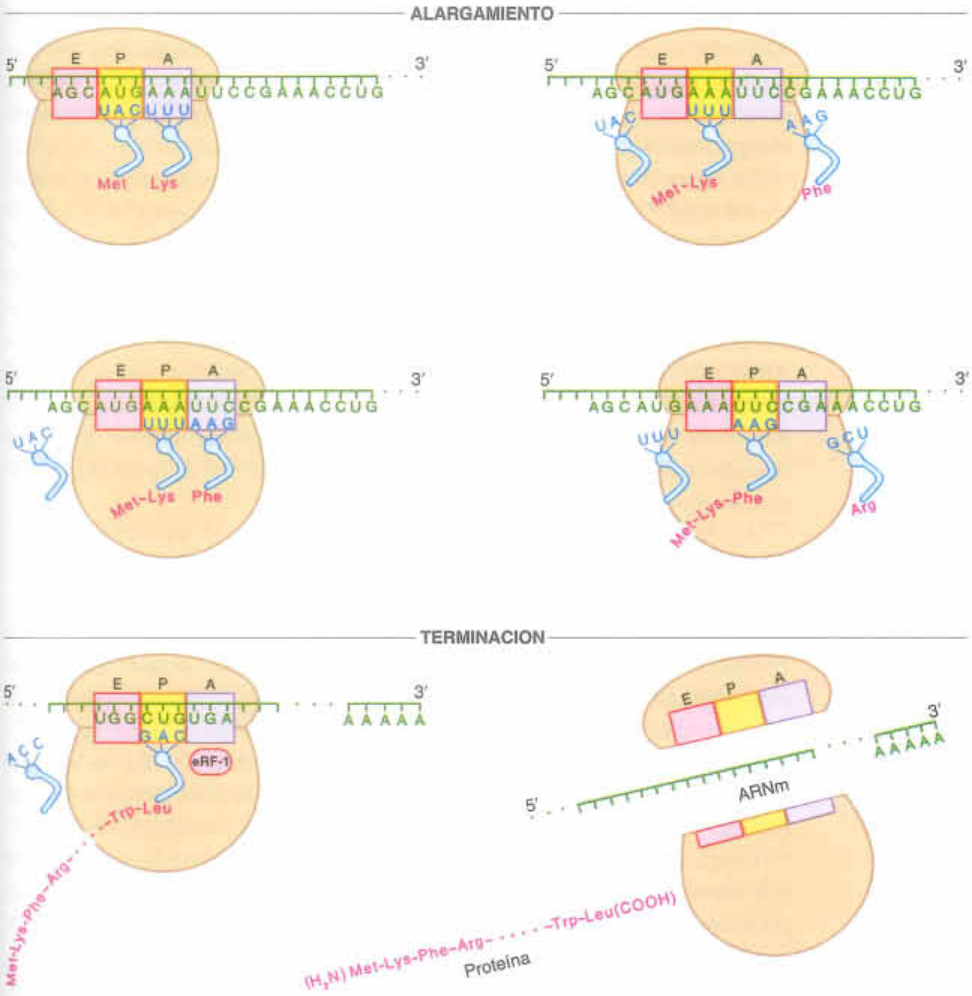
La ***etapa de iniciación*** de la síntesis proteica es regulada por proteínas citosólicas denominadas **factores de iniciación** (**IF**), que provocan dos hechos separados pero concurrentes, uno en el extremo 5′ del ARNm y otro en la subunidad menor del ribosoma.

El primero involucra al cap y a una secuencia de nucleótidos aledaña, localizada entre el cap y el codón de iniciación (sección 16-5). Estas partes del ARNm son reconocidas por el factor **IF-4**, que se liga a ellas si al ARNm se le ha unido la proteína CBP (sección 16-5). La conexión del IF-4 con el ARNm insume energía, que es provista por un ATP.

En el segundo, el metionil-ARNt[i]^{Met} se coloca en el sitio P de la subunidad menor del ribosoma. Esta reacción requiere el factor **IF-2** y gasta la energía de un GTP.

Logrados ambos acondicionamientos, otro factor de iniciación, el **IF-3**, con la ayuda del IF-4 coloca el extremo 5′ del ARNm sobre la cara de la subunidad menor del ribosoma que posee los sitios E, P y A.

De inmediato la subunidad menor se desliza por el ARNm y detecta al codón AUG de iniciación, que se coloca en el sitio P. Como es lógico, el segundo codón del ARNm queda colocado al lado, es decir, en el sitio A.



Entre tanto, el metionil-ARNt[i]^{Met}, ubicado en el sitio P de la subunidad menor, se une al **codón AUG de iniciación** mediante su anticodón CAU (UAC). El acoplamiento correcto entre estos dos tripletes es imprescindible para asegurar el encuadre normal de los siguientes codones del ARNm en los sitios E, P y A de la subunidad menor del ribosoma.

La etapa de iniciación concluye cuando la subunidad mayor se une a la subunidad menor y se forma el ribosoma. En él se encuentran los dos primeros codones del ARNm: en el sitio P, el codón AUG de iniciación —unido al metionil-ARNt[i]^{Met}— y en el sitio A, el codón que le sigue.

La unión entre sí de las dos subunidades ribosómicas se produce a instancias del factor **IF-5**, que actúa después que se desprenden los factores IF-2 e IF-3.

16-13. El alargamiento de la cadena proteica es promovido por factores de elongación

La ***etapa de alargamiento*** de la síntesis proteica es regulada por **factores de elongación (EF)**. Comienza con el ingreso en el ribosoma de un ami-

noacil-ARNt^{AA} cuyo anticodón es complementario del segundo codón del ARNm, el cual, como se mencionó en la sección anterior, se localiza en el sitio A. En seguida el aminoacil-ARNt^{AA} se ubica en ese sitio y su anticodón se conecta con el segundo codón del ARNm. Lo hace mediante el factor de elongación **EF-1** y la energía suministrada por un GTP.

La figura 16-9 muestra que el aminoacil-ARNt^{AA} recién llegado y el metionil-ARNt[i]^{Met} del sitio P quedan uno al lado del otro, al igual que sus aminoácidos. Esta vecindad es necesaria para que ambos aminoácidos puedan ligarse entre sí por medio de una unión peptídica, hecho que ocurrirá en breve tiempo.

Previamente el ribosoma se corre tres nucleótidos en dirección del extremo 3′ del ARNm, a causa de lo cual el codón de iniciación (y el metionil-ARNt[i]^{Met}) se transfiere del sitio P al sitio E, el segundo codón (y el aminoacil-ARNt^{AA}) se transfiere del sitio A al sitio P, y el tercer codón del ARNm se ubica en el sitio A vacante. Este corrimiento, que se denomina **translocación**, depende del factor de elongación **EF-2** y de la energía suministrada por un GTP.

Apenas el metionil-ARNt[i]^{Met} ingresa en el sitio E, su metionina se desacopla del ARNt[i] y se liga —por medio de una unión peptídica— al aminoácido del aminoacil-ARNt^{AA} ubicado en el sitio P. Como es lógico, el dipeptidil-ARNt que se forma reemplaza al aminoacil-ARNt^{AA} en el sitio P.

Después de perder la metionina, el ARNt[i] se desconecta del codón de iniciación, abandona el sitio E y se encamina hacia la salida del ribosoma, lo que determina el fin del primer episodio del alargamiento de la proteína.

El segundo comienza cuando un nuevo aminoacil-ARNt^{AA} ingresa en el ribosoma, se ubica en el sitio A y su anticodón se conecta con el tercer codón del ARNm, otra vez mediante el factor de elongación EF-1 y la energía de un GTP.

Luego, debido a que el ribosoma se vuelve a translocar, el dipeptidil-ARNt y el aminoacil-ARNt^{AA} se trasladan de los sitios P y A a los sitios E y P, respectivamente, y el cuarto codón del ARNm se ubica en el sitio A vacante.

Al cabo de la translocación se produce la segunda unión peptídica, ahora entre el dipéptido del dipeptidil-ARNt y el aminoácido del tercer aminoacil-ARNt^{AA}. Como muestra la figura 16-9, el tripeptidil-ARNt que se forma queda ubicado en el sitio P.

Mientras tanto, el ARNt que cedió el dipéptido abandona el sitio E y se dirige a la salida del ribosoma, lo que determina el fin del segundo episodio del alargamiento de la proteína.

Lo que ocurre durante los dos primeros episodios de la etapa de alargamiento de la síntesis proteica se repite en los siguientes. Por consecuencia, durante el tercer episodio se forma un tetrapeptidil-ARNt, y luego peptidil-ARNt cada vez más largos, cuyas localizaciones alternan entre los sitios P y E a medida que se producen las translocaciones y se suceden las uniones peptídicas. Se calcula que por segundo se agregan a la cadena peptídica unos cinco aminoácidos.

La energía que se gasta durante la formación de cada unión peptídica proviene de la ruptura de la unión química entre el ARNt ubicado en el sitio E y su aminoácido. En la sección 16-7 se dijo que al formarse cada aminoacil-ARNt^{AA}, la unión del aminoácido con el extremo aceptador del ARNt —más precisamente con su última adenina— consume la energía suministrada por un

ATP. Por lo tanto, la energía que emplea la subunidad mayor del ribosoma para unir a los aminoácidos es aportada, en última instancia, por ese ATP.

El cálculo de la energía que se gasta por cada aminoácido que se incorpora a una proteína en formación muestra que la síntesis proteica es un proceso muy costoso, ya que se requiere no sólo el ATP recién mencionado sino también los dos GTP citados con anterioridad: el que se consume en el sitio A para que el aminoacil-ARNt^{AA} se conecte con el ARNm y el que se gasta en la translocación.

Como se dijo, con cada translocación el ribosoma se aleja del extremo 5′ del ARNm y se acerca al extremo 3′. Cabe agregar que cuando el ribosoma se halla a unos 30 codones del codón de iniciación, éste es abordado por un segundo ribosoma y comienza la síntesis de una nueva copia de la proteína. Puesto que ello se repite muchas veces, al cabo de un tiempo se encuentran múltiples ribosomas a lo largo de todo el ARNm, separados entre sí por períodos de 30 codones (figs. 1-10, 7-4, 7-6, 16-7 y 16-8). En la sección 16-11 se dijo que esa asociación recibe el nombre de polirribosoma.

16-14. La síntesis proteica concluye cuando el ribosoma alcanza el codón de terminación

La ***etapa de terminación*** de la síntesis proteica es regulada por **factores de terminación** —identificados con la sigla **eRF** (por *eukaryotic releasing factor*)— y tiene lugar tras la última translocación, es decir, cuando el **codón de terminación** del ARNm (**UAA**, **UGA** o **UAG**, indistintamente) llega al sitio A del ribosoma. Debido a que ello deja al sitio A sin el esperado aminoacil-ARNt^{AA}, lo ocupa el factor **eRF-1**, que es capaz de reconocer a los tres codones de terminación (fig. 16-9).

Ante la ausencia de un nuevo aminoacil-ARNt^{AA}, el polipéptido del peptidil-ARNt —ubicado en el sitio P— se desliga del último ARNt y se independiza del ARNm y del ribosoma. El desprendimiento del polipéptido depende del factor **eRF-3**. Además requiere energía, que es tomada de un GTP.

De inmediato las subunidades menor y mayor del ribosoma se separan del ARNm. En el citosol integran un fondo común que abastece de subunidades ribosómicas para la formación de nuevos ribosomas en el mismo ARNm o en otros que se están traduciendo o que van a comenzar a hacerlo (fig. 16-8).

El número de ribosomas en el polirribosoma, es decir, la suma de sitios en los que tiene lugar la síntesis de una proteína, se mantiene en forma relativamente constante. Es que cuando un ribosoma abandona el extremo 3′ del ARNm, se ensambla otro en el extremo 5′ (fig. 16-8).

Como se verá en las secciones 16-20 a 16-22, esta síntesis continuada de una proteína a partir de un mismo ARNm —por el trabajo simultáneo de varios ribosomas— es interrumpida, en el momento que corresponde, por la acción de factores reguladores.

16-15. Dos temas médicos vinculados con la actividad de los ribosomas

Al ser invadidas por bacterias, las células de algunos organismos inferiores elaboran sustancias llamadas **antibióticos** para defenderse de la infección. En muchos casos los antibióticos logran sus objetivos interfiriendo la síntesis proteica en los ribosomas de las bacterias, lo que las mata. Por ejem-

plo, el ***cloranfenicol*** impide las uniones peptídicas, la ***tetraciclina*** no permite que los aminoacil-ARNt^{AA} ingresen en el sitio A, la ***kirromicina*** inhibe la actividad de los factores de elongación, la ***estreptomicina*** afecta el inicio de la traducción y distorsiona la fidelidad de la síntesis, la ***eritromicina*** bloquea la translocación del ARNm y la ***puromicina*** usurpa el sitio A del ribosoma, de modo que la cadena peptídica se liga al antibiótico y no a un aminoacil-ARNt^{AA}, lo que interrumpe su síntesis.

La medicina ha trasladado estos efectos a otros escenarios biológicos, particularmente al organismo humano. Así, cuando determinadas bacterias lo infectan, éstas pueden ser destruidas mediante la administración de antibióticos.

Debe advertirse que la puromicina afecta también a los ribosomas de las células eucariotas, y por ese motivo su uso farmacológico es muy restringido. Por su parte, el cloranfenicol, la eritromicina, la tetraciclina y la kirromicina, si bien interfieren levemente la síntesis proteica en los ribosomas eucarióticos citosólicos, afectan mucho más la de los ribosomas de las mitocondrias, lo cual refleja el posible origen procariótico de estos organoides (caps. 8-26 y 8-29).

Otro tema médico vinculado con los ribosomas corresponde al mecanismo de acción de la ***toxina diftérica***, que ingresa en la célula por endocitosis y ribosila al factor de elongación EF-2, lo cual lo anula. Ello conduce en poco tiempo a la muerte celular.

16-16. La metionina situada en el extremo amino de la proteína suele ser removida

Varias veces señalamos que la traducción del ARNm se produce en dirección 5′→3′ y que el aminoácido cifrado por el codón de iniciación, en el extremo 5′ del ARNm, es una metionina. Por lo tanto, a ella pertenece el grupo amino libre de la cadena proteica en formación. Esta metionina usualmente es removida, de manera que el segundo aminoácido pasa a la primera posición.

En el extremo opuesto de la proteína se encuentra el aminoácido que lleva el grupo carboxilo libre de la cadena proteica, determinado por el triplete previo al codón de terminación.

De estos datos se deduce que en cada unión peptídica que tiene lugar en el ribosoma, el grupo carboxilo es aportado por el último aminoácido de la cadena peptídica en crecimiento (ubicada en el sitio P) y el grupo amino es cedido por el aminoácido del aminoacil-ARNt^{AA} (ubicado en el sitio A).

16-17. Las proteínas emanadas de los ribosomas portan señales que las conducen hacia sus lugares de residencia

Una célula de mamífero contiene alrededor de 10 mil millones (10^{10}) de proteínas, aunque se considera que existen sólo unas 10.000 clases de proteínas distintas. Emanadas de los ribosomas, las proteínas pueden permanecer en el citosol, o tener como destino el núcleo, las mitocondrias, los peroxisomas o el retículo endoplasmático.

Por ejemplo, las tubulinas y las enzimas de la glucólisis permanecen en el citosol, las histonas y las proteínas ribosómicas cruzan los poros nucleares e ingresan en el núcleo, las enzimas del ciclo de Krebs atraviesan las dos membranas de la mitocondria y alcanzan la matriz mitocondrial, la catalasa pasa a través de la membrana del peroxisoma y arriba a su matriz, etc. Las proteí-

nas destinadas al retículo endoplasmático se sitúan en la membrana o en el interior del organoide luego de que los ribosomas establecen una íntima relación con él en el sector del RE llamado rugoso (cap. 7-5).

Un tráfico tan selectivo obliga a las proteínas surgidas de los ribosomas —excepto las que quedarán en el citosol— a portar señales que las conduzcan a los organoides apropiados, y éstos deben poseer receptores específicos que reconozcan esas señales. En las proteínas las señales están representadas por unas secuencias cortas de aminoácidos denominadas **péptidos señal** (tabla 4-1).

16-18. La existencia de chaperonas asegura la correcta formación de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas

Apenas los polipéptidos emergen de los ribosomas, sus átomos tienden a establecer las combinaciones químicas que dan lugar a la formación de las estructuras terciarias y cuaternarias que caracterizan a las proteínas (cap. 2-9). Estos procesos son controlados por las proteínas **chaperonas** que fueron mencionadas en los capítulos 4-5, 7-15, 8-28 y 10-5.

REGULACION DE LA TRADUCCION DE LOS ARN MENSAJEROS Y DE LA DEGRADACION DE LAS PROTEINAS

16-19. Tanto la traducción y la supervivencia de los ARNm como la degradación de las proteínas se regulan en el citosol

En los capítulos 14-6 y 15-7 se vio que los principales mecanismos de regulación que deciden qué proteínas debe sintetizar una célula operan en el núcleo, a nivel de la transcripción del ADN y del procesamiento del ARNm.

No obstante, después de su salida al citosol el ARNm puede experimentar otras clases de regulaciones: 1) para impedir su traducción y por lo tanto evitar que se sintetice la correspondiente proteína; 2) para controlar las veces que debe traducirse y a qué velocidad, o 3) para disponer cuándo debe destruirse.

Por otra parte, en el citosol también se establece a partir de qué momento una proteína —después de haber sido sintetizada— debe degradarse.

En las próximas secciones se analizarán los ejemplos más comunes de estas formas de ***regulaciones genéticas postranscripcionales***.

16-20. Los miARN bloquean la traducción de ciertos ARNm

Existe un control celular que —al cabo de la transcripción del ADN y del procesamiento del ARNm— decide si este ARNm debe o no traducirse, es decir, si la proteína correspondiente debe o no sintetizarse.

Si bien se ignoran las causas que llevan a la célula a transcribir un gen y a "arrepentirse" de traducir el ARNm después que éste arriba al citosol —lo que provoca el mismo efecto que acarrearía la falta de transcripción del gen—, sí se conoce el mecanismo de regulación genética postranscripcional que impide la traducción.

Un avance notable en el campo de la biología molecular ha sido el descubrimiento de los **miARN**, cuyos genes, la transcripción de los mismos y el procesamiento de los respectivos transcriptos primarios se analizaron en los capítulos 13-12, 14-19 y 15-14.

Fig. 16-10. Apareamiento imperfecto del miARN con la secuencia complementaria del ARNm.

La figura 15-12 muestra cómo, al cabo del procesamiento del miARN en el citosol, éste se asocia con el RISC y ambos componen el complejo ribonucleoproteico **miARN-RISC**.

Cada miARN-RISC tiene la capacidad de bloquear la traducción de un determinado ARNm. Dicho en otros términos, es capaz de reprimir la producción de la proteína particular que iba a ser sintetizada en base a la información aportada por ese ARNm. Lo logra porque el miARN se aparea con un tramo complementario del ARNm, lo cual le permite al RISC detener la traducción. Como muestra la figura 16-10, la complementariedad entre el miARN y el ARNm es amplia pero no total.

Se ha comprobado que distintos miARN tienen la capacidad de bloquear la traducción de un mismo ARNm, y que un único miARN puede bloquear la traducción de distintos ARNm.

Debe agregarse que el bloqueo de la traducción de los ARNm mediante miARN es un fenómeno celular corriente. Más aún, forma parte de un mecanismo biológico muy extendido —denominado **ARNi** o **interferencia del ARN** (en inglés, ***RNAi*** o ***RNA interference***)— que ocurre en las células de prácticamente todas las especies.

Como se verá en los capítulos 23-44, 23-45 y 23-46, los principios de la ARNi han inspirado el desarrollo de una técnica experimental que permite —entre otras aplicaciones— averiguar la función de cada gen individual, es decir, conocer qué proteína codifica.

16-21. Existen mecanismos que controlan las veces que un mismo ARNm debe traducirse y a qué velocidad debe hacerlo

Las células han desarrollado mecanismos de regulación que controlan las veces que los ARNm deben traducirse y la velocidad con que deben hacerlo.

Un ejemplo concluyente lo ofrecen las células en mitosis, ya que dejan de sintetizar ARNm debido a la compactación de la cromatina (cap. 18-19). El microscopio electrónico revela los cambios cuantitativos que ocurren en la traducción de los ARNm durante la división celular, en el curso de la cual la producción de proteínas cae abruptamente (cap. 18-19). Indicativo de esta caída es el aspecto que adquieren los polirribosomas, cuyos ribosomas aparecen mucho más espaciados en la mitosis que en la interfase.

Existe un control general o inespecífico de la traducción y otro particular o específico. Ambos actúan en el momento en que se inicia la traducción.

El control general parece depender del factor de iniciación IF-2, cuya fosforilación por una quinasa específica lo haría inoperable. Como consecuencia, decae la producción de todas las proteínas celulares.

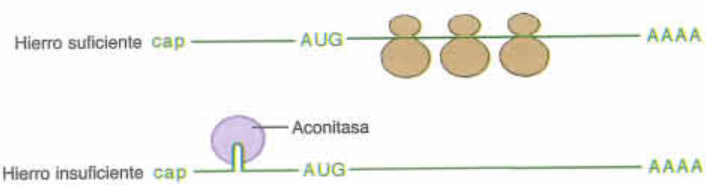


Fig. 16-11. Regulación de la traducción del ARNm de la ferritina.

El control particular opera de otra manera, pues depende de sustancias reguladoras que suelen modificar la configuración de un tramo de nucleótidos no traducibles, localizados entre el cap y el codón de iniciación (sección 16-5).

Un ejemplo de este tipo de control lo ofrece la ***ferritina***, una proteína citosólica que se une al hierro y que constituye el sitio de depósito del metal. La concentración de ferritina varía con la cantidad de hierro en el citosol, y su síntesis es regulada por el propio hierro. Así, cuando cae la cantidad de hierro, una proteína llamada **aconitasa** o **IRF** (por *iron responding factor*) se une a la secuencia no traducible del extremo 5′ del ARNm de la ferritina y le forma un bucle, lo cual bloquea su traducción (fig. 16-11).

16-22. La degradación de los ARNm suele ser regulada por mecanismos que actúan en el extremo 3′ o en el extremo 5′ de sus moléculas

Otra estrategia utilizada por la célula para controlar la cantidad de proteína que va a sintetizar opera sobre el tiempo de supervivencia de los ARNm en el citosol.

Los mecanismos que regulan la degradación de los ARNm son muy variados. En la mayoría de los casos se relacionan con secuencias de nucleótidos cercanas al extremo 3′ de los ARNm, localizadas entre el codón de terminación y la poli A (sección 16-5). Menos frecuentes son los casos en que los mecanismos de regulación actúan sobre sectores cercanos al extremo 5′ del ARNm. En el ejemplo que se analiza a continuación, si bien se ignora el sector del ARNm donde actúa el mecanismo regulatorio, se conoce la sustancia que lo induce.

La ***caseína*** es una proteína de la leche producida por las células de la glándula mamaria en respuesta a ciertas hormonas, principalmente la prolactina. Se ha observado que la concentración del ARNm de la caseína crece considerablemente en el citosol ante la presencia de esa hormona, no porque se incremente su síntesis en el núcleo sino porque aumenta su estabilidad en el citoplasma. Contrariamente, cuando desaparece la prolactina se acelera la degradación del ARNm de la caseína. No se conocen los mecanismos moleculares que producen estos efectos.

Es interesante el modo como se regula la degradación de los ARNm de la ***tubulina*** dimérica, ya que se basa en la concentración de sus productos proteicos, es decir, de sus subunidades α y β (cap. 5-6). Cuando en el citosol el nivel de estas proteínas es suficiente, una parte de la tubulina —probablemente un dímero αβ— se une a los primeros aminoácidos de las cadenas proteicas que emanan de los ribosomas, lo cual activa a una nucleasa específica que degrada al ARNm (fig. 16-12). Como vemos, se trata de un mecanismo

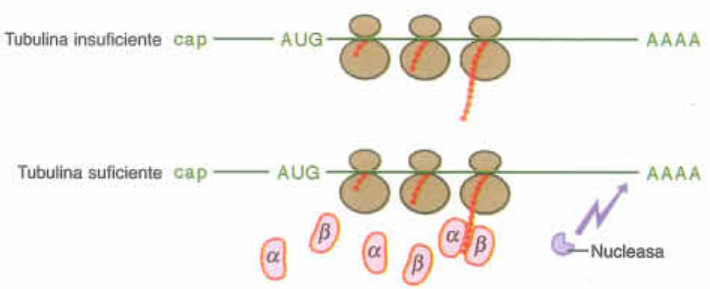


Fig. 16-12. Regulación de la estabilidad del ARNm de la tubulina.

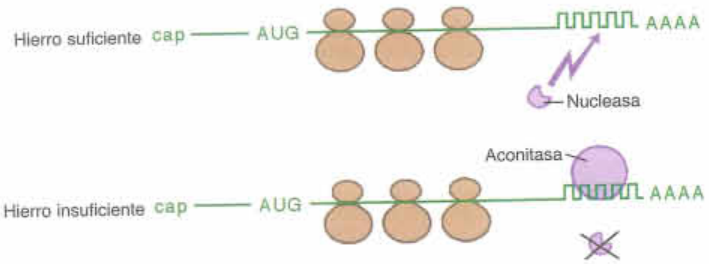


Fig. 16-13. Regulación de la estabilidad del ARNm de la proteína receptora de la transferrina.

autorregulatorio. La zona receptora de la señal de saturación abarca a los primeros nucleótidos del ARNm y a una pequeña secuencia no traducible previa al codón de iniciación.

En la sangre el hierro es transportado por una proteína llamada transferrina. Esta, junto con el hierro, ingresa en el citoplasma por endocitosis previa interacción con el ***receptor de la transferrina***, localizado en la membrana plasmática. Cuando la concentración de hierro aumenta en el citosol, el número de receptores para la transferrina disminuye. Los receptores caen debido a que el ARNm que los codifica es degradado por una nucleasa específica (fig. 16-13). En este mecanismo regulatorio también interviene la **aconitasa**, pero lo hace no cuando aumenta sino cuando desciende la concentración de hierro. En este caso la aconitasa se une a un sector del extremo 3′ del ARNm —consistente en cinco bucles de ARN con una secuencia CAGUG en cada uno— e impide la acción de la nucleasa (fig. 16-13).

Como vemos, al disminuir el hierro en el citosol actúan dos mecanismos regulatorios simultáneos, uno que baja la concentración de la ferritina (sección 16-21) y otro que aumenta el número de receptores para la transferrina. En el primero se bloquea la traducción de un ARNm y en el segundo se impide la degradación de otro. En ambos interviene una misma molécula —la aconitasa—, aunque en sectores diferentes de los respectivos ARNm.

La corta supervivencia de los ARNm de muchas proteínas —por ejemplo, algunos ***factores de crecimiento*** (cap. 18-28)—, que no supera los 30 minutos, se debe a la presencia en su extremo 3′ de secuencias de unos 50 nucleótidos ricas en A y U, localizadas entre el codón de terminación y la poli A (sección 16-5). Se ha sugerido que estas secuencias atraen a ciertas nucleasas, las cuales, mediante la remoción gradual de las A de la poli A, desestabilizan al ARNm, lo cual propicia su degradación por otras nucleasas (fig. 16-14).

La vida media del ARNm de la ***β-globina***, que es de unas 10 horas, depende de la integridad de su poli A. Diversas experiencias han demostrado que el acortamiento gradual de esta secuencia mediante nucleasas reduce el tiempo de vida del ARN mensajero.

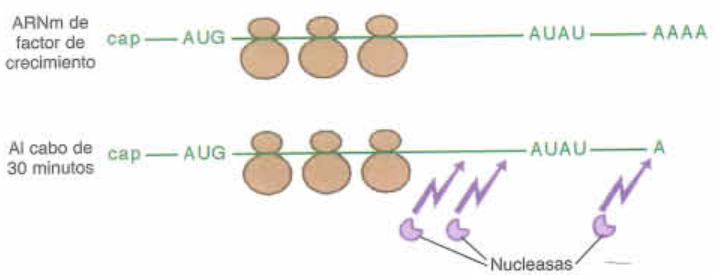


Fig. 16-14. Regulación de la estabilidad de los ARNm de los factores de crecimiento.

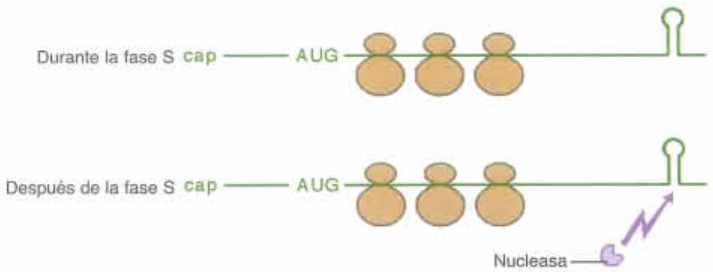


Fig. 16-15. Regulación de la estabilidad del ARNm de las proteínas histónicas.

La supervivencia de los ARNm que codifican a las ***histonas*** depende del momento del ciclo en que se halla la célula (fig. 16-15). En la fase S la vida media de estos ARNm es de una hora, pero cuando concluye la replicación del ADN se reduce a unos pocos minutos. No se conoce el mecanismo por el cual la replicación del ADN se vincula con la menor velocidad de la degradación de estos ARNm. Sólo se sabe que su estabilidad es influida por una corta secuencia de nucleótidos que forma un bucle en su extremo 3′ (cap. 15-5) (fig. 15-4).

16-23. La degradación de las proteínas también es regulada

La supervivencia de ciertas proteínas de vida breve depende de señales presentes en sus moléculas. Hasta hace poco se creía que el tiempo de vida de esas proteínas estaba vinculado con la identidad del primer aminoácido del extremo amino (en la sección 16-16 se indicó que en todas las proteínas esa posición es inicialmente ocupada por una metionina y que cuando ésta es removida toma su lugar el segundo aminoácido de la cadena proteica). Hoy se sabe que las señales utilizadas para degradar muchas proteínas de vida corta son secuencias de aminoácidos llamadas **PEST**, ricas en prolina (*P*), ácido glutámico (*E*), serina (*S*) y treonina (*T*) (las letras entre paréntesis identifican a esos aminoácidos, según se informa en la figura 2-25). Estas señales son reconocidas por la ubiquitina, cuya intervención es imprescindible para que se degraden las proteínas en los proteasomas (cap. 4-6).

REGULACION DEL PROCESAMIENTO DE LAS POLIPROTEINAS

16-24. Una misma poliproteína se procesa de manera distinta según el tipo celular que la produce

Entre los genes que codifican ARNm, existen algunos que al traducirse originan polipéptidos transitorios relativamente largos —llamados poliproteínas—, cuyo procesamiento los fragmenta en dos o más proteínas distintas entre sí. Cabe agregar que cuando una misma poliproteína es producida en dos

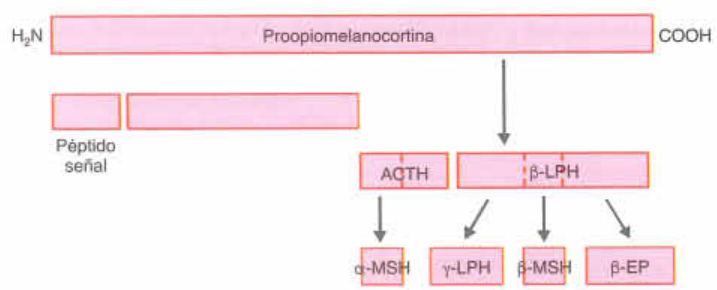


Fig. 16-16. Procesamiento de la proopiomelanocortina en los distintos tipos de células hipofisarias que la elaboran. *ACTH*, corticotropina; *β-LPH*, β-lipotropina; *γ-LPH*, γ-lipotropina; *α-MSH* y *β-MSH*, hormonas estimulantes de los melanocitos; *β-EP*, β-endorfina.

tipos celulares diferentes, la forma como se fragmenta en uno de ellos puede no ser la misma que en el otro. Veamos el siguiente ejemplo:

La prohormona ***proopiomelanocortina*** (***POMC***) es una poliproteína que en las células adrenocorticotropas del lóbulo anterior de la hipófisis se fragmenta en corticotropina (ACTH) y β-lipotropina (β-LPH). En cambio, en las células de la parte intermedia de la misma glándula se fragmenta en β-endorfina (β-EP), γ-lipotropina (γ-LPH) y las dos formas de la hormona estimulante de los melanocitos: la α-MSH y la β-MSH (fig. 16-16).

BIBLIOGRAFIA

Agard D.A. (1993) How molecular chaperones work. Science 260: 1903.

Brennecke J., Stark A., Russell R.B. et al. (2005) Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biology 3.

Burbaum J.J. and Schimmel P. (1991) Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. J. Biol. Chem. 266:16965.

Caskey T.H. (1980) Peptide chain termination. TIBS 5:234.

Cavarelli J. and Moras D. (1993) Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. FASEB J. 7:79.

Craig E.A. (1993) Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. Science 260:1902.

Dahlberg A.E. (2001) The ribosome in action. Science 292:868.

Delarne M. (1995) Aminoacyl-tRNA synthetases. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:48.

Garen A. (1968) Sense and non-sense in the genetic code. Science 160:149.

Gay D.A., Yen T.J., Lau J.T.Y. and Cleveland D.W. (1987) Sequences that confer β-tubulin autoregulation through modulated mRNA stability reside within exon 1 of αβ-tubulin mRNA. Cell 50:671.

Guyette W.A., Matusik R.J. and Rosen J.M. (1979) Prolactin mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. Cell 17:1013.

Hale S.P. et al. (1997) Discrete determinants in transfer RNA for editing and aminoacylation. Science 276:1250.

Ibba M., Curnow A.W. and Söll D. (1997) Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. TIBS 22:39.

Illangasekare M. et al. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. Science 267:643.

Kerppola T.K. and Kane C.M. (1991) RNA polymerase: regulation of transcript elongation and termination. FASEB J. 5:2833.

Kozak M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. J. Biol. Chem. 266:19867.

Lindahl L. and Hinnebusch A. (1992) Diversity of mechanisms in the regulation of translation in prokaryotes and lower eukaryotes. Curr. Opin. Genet. Dev. 2:720.

McCarthy J.E.G. and Kollmus H. (1995) Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. TIBS 20:191.

McClain W.H. (1993) Transfer RNA identity. FASEB J. 7:72.

Merrick W.C. (1990) Overview: mechanism of translation initiation in eukaryotes. Enzyme 44:7.

Merrick W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. Microbiol. Rev. 56:291.

Moore P.B. and Steitz T.A. (2005) The ribosome revealed. Trends Biochem. Sci. 30:281.

Mullner E.W. and Kuhn L.C. (1988) A stem-loop in the 3′ untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. Cell 53:815.

Nissen P. et al. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. Science 270:1464.

Nissen P. et al. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science 289:920.

Noller H.F. (2005) RNA structure: reading the ribosome. Science 309:1508.

Oh S.K. and Sarnow P. (1993) Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding. Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 295.

Powers T. and Walter P. (1996) The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. Curr. Biol. 6:331.

Rassow J. and Pfanner N. (1996) Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides. Curr. Biol. 6:115.

Rhoads R.E. (1993) Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. J. Biol. Chem. 268:3017.

Rich A. and Kim S.H. (1978) The three-dimensional structure of transfer RNA. Sci. Am. 240 (1):52.

Sachs A.B. (1993) Messenger RNA degradation in eukaryotes. Cell 74:413.

Schimmel P.R. (1987) Aminoacyl-tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. Annu. Rev. Biochem. 56:125.

Stansfield I., Jones K.M. and Tuite M.F. (1995) The end in sight: terminating translation in eukaryotes. TIBS 20:489.

Tate W.P. and Brown C.M. (1992) Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. Biochemistry 29:5881.

Theil E.C. (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. J. Biol. Chem. 265:4771.

Tolia N.H. and Joshua-Tot L. (2007) Slicer and the argonautes. Nature Chem. Biol. 3:36.

Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J. et al. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev. 20:515.

Varshavsky A. (2005) Regulated protein degradation. Trends Biochem. Sci. 30:283.

Yonath A., Leonard K.R. and Wittman H.G. (1987) A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstitution. Science 236:813.

Yoshizawa S., Fourmy D. and Puglisi J.D. (1999) Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. Science 285:1722.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Replicación del ADN
Mutación y reparación

17

REPLICACION DEL ADN

17-1. La replicación del ADN se produce en la interfase

Al cabo de la división celular las células hijas heredan la misma información genética contenida en la célula progenitora. Como esa información se halla en el ADN, cada una de las moléculas de ADN debe generar otra molécula de ADN idéntica a la originaria para que ambas sean repartidas en las dos células hijas. Esta duplicación, merced a la cual el ADN se propaga en las células de generación en generación, se denomina **replicación**.

La vida de las células que se dividen transita por dos etapas que se alternan cíclicamente, conocidas con los nombres de **interfase** y **mitosis** (cap. 18-2). La interfase se subdivide en tres períodos, llamados G1, S y G2 (fig. 17-1). En la **fase G1** tienen lugar las distintas actividades de la célula (secreción, conducción, contracción, endocitosis, etc.). Le sigue la **fase S**, en cuyo transcurso se produce, además, la replicación del ADN. Luego tiene lugar la **fase G2**, transición que se extiende hasta el inicio de la **fase M** —correspondiente a la mitosis—, al cabo de la cual las moléculas de ADN duplicadas se segregan en las células hijas.

Debe señalarse que desde la terminación de la fase S hasta que se segregan en la mitosis, los ADN hijos derivados de un mismo ADN progenitor permanecen juntos, unidos a la altura del centrómero mediante un complejo de proteínas llamadas **cohesinas** (fig. 17-2). Mientras están unidos, esos ADN llevan el nombre de ***cromátidas hermanas***. El centrómero se evidencia durante la mitosis, cuando la cromatina de ambas cromátidas alcanza el máximo grado de compactación; desempeña una función crucial en la separación de las cromátidas hermanas, pues gracias a él cada célula hija recibe una sola cromátida, que pasa a llamarse ***cromosoma*** después de la separación (cap. 18-9) (fig. 17-2).

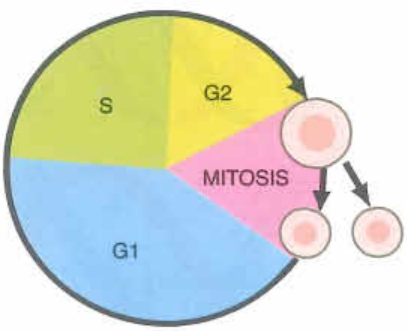


Fig. 17-1. Ciclo vital de una célula, que comprende la interfase y la mitosis. La primera incluye las fases G1, S y G2. La replicación del ADN ocurre durante la fase S.

Para que puedan formarse dos moléculas de ADN a partir de una, primero tienen que separarse las dos cadenas de la doble hélice del ADN progenitor, pues se utilizan como moldes para la construcción de sendas cadenas complementarias. Dado que las cadenas recién sintetizadas no se separan de las respectivas cadenas molde, se forman dos nuevas dobles hélices de ADN idénticas a la anterior (fig. 17-3).

Hemos visto que el ADN no está solo sino combinado con

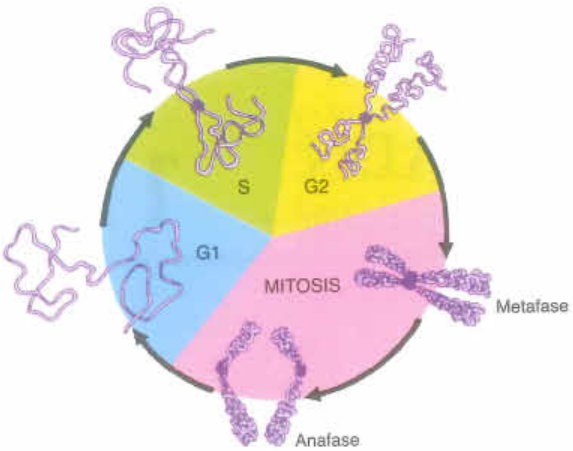


Fig. 17-2. Ciclo de condensación-descondensación de los cromosomas. La replicación se produce en la fase S. La condensación del ADN es máxima en la metafase y en la anafase.

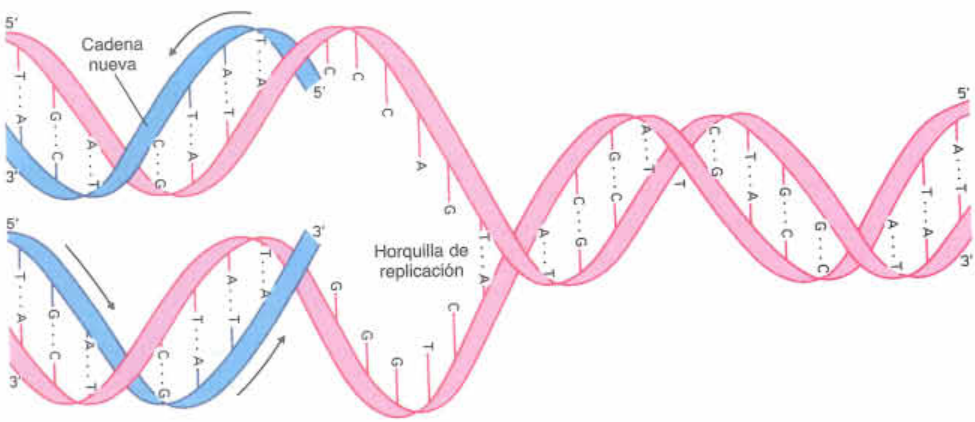
proteínas (histonas, etc.) y que la integración de ambas moléculas lleva el nombre de **cromatina** (fig. 12-9). La presencia de las proteínas complica el estudio de la replicación, por un lado porque intervienen en el enrollamiento de la cromatina y por otro porque ellas también se duplican. Con el objeto de simplificar las descripciones, estos aspectos serán ignorados en las primeras secciones del capítulo a menos que sus menciones resulten imprescindibles.

17-2. La replicación tiene algunas similitudes con la transcripción

La síntesis del ADN (replicación) presenta algunas similitudes con la síntesis del ARN (transcripción del ADN). Igual que el ARN, el ADN se sintetiza en dirección 5′→3′ y utiliza como molde una cadena de ADN preexistente. Además, enzimas equivalentes a las ARN polimerasas, llamadas **ADN polimerasas**, agregan los sucesivos nucleótidos —también de a uno por vez— en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento. Las ADN polimerasas catalizan las **uniones fosfodiéster** que se producen entre el OH del C3′ de la desoxirribosa de un nucleótido y el fosfato ligado al C5′ del nucleótido recién arribado (fig. 17-4).

Las diferencias entre la replicación y la transcripción se deben en parte a que el ADN es una molécula doble y no simple como el ARN. En la síntesis del ARN, el ADN se transcribe sólo en los sectores que corresponden a los genes activos, mientras que en la replicación no queda ningún sector del ADN sin duplicar. Para la síntesis del ARN las dos cadenas del ADN se separan transitoriamente en la zona donde se produce la transcripción, por lo cual se forma una especie de "burbuja" que se desplaza en dirección 5′→3′. El ARN copia una sola de las dos cadenas del ADN y, conforme progresa la transcripción, se despega de la cadena que le sirve de molde. Contrariamente, en la replicación las dos cadenas del ADN se utilizan como moldes y una vez separadas no vuelven a juntarse (porque las cadenas hijas quedan unidas a las progenitoras). Finalmente, la replicación exige un número considerablemente mayor de enzimas que la transcripción.

Fig. 17-3. La replicación del ADN se produce previo desenrollamiento de las dos cadenas de la doble hélice, cada una de las cuales es usada como molde para sintetizar las cadenas nuevas. Obsérvese que la síntesis tiene lugar sólo en dirección 5′→3′.



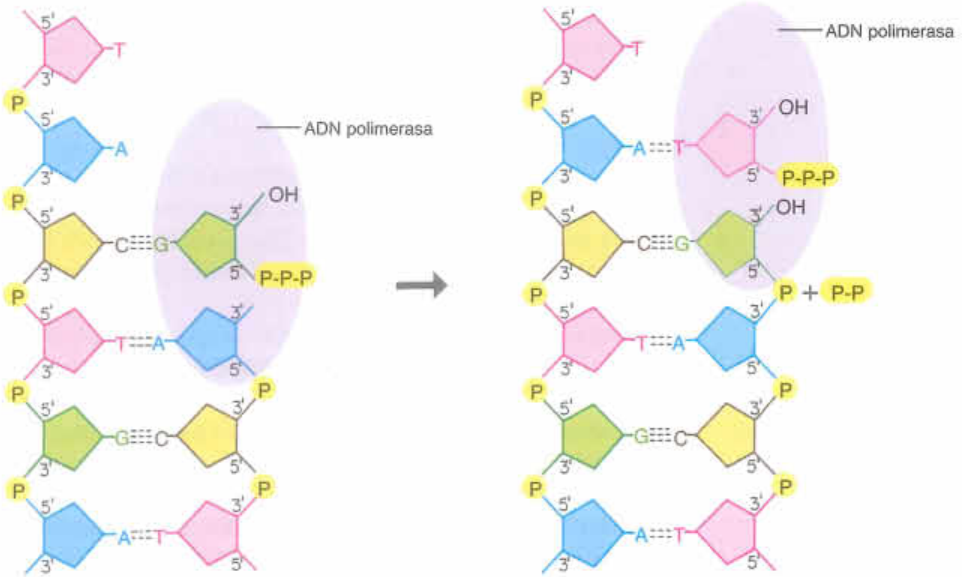


Fig. 17-4. Acción de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN. La enzima ubica en su lugar a un nucleósido trifosfato y cataliza la unión fosfodiéster, con liberación de un difosfato. Se observa que la ADN polimerasa sólo puede agregar nucleótidos en la dirección 5'→3'.

En síntesis, a partir de una molécula doble de ADN se originan dos moléculas dobles de ADN —dos dobles hélices—, cada una compuesta por una cadena heredada del ADN progenitor y una cadena recién sintetizada. Dado que las moléculas de ADN recibidas por las células hijas contienen una cadena original (preexistente) y una cadena nueva (recién sintetizada), se dice que el mecanismo de replicación del ADN es ***semiconservador*** (fig. 17-5).

17-3. La replicación se produce sectorialmente

Si la célula abordara la replicación del ADN considerándolo como una larga, uniforme y delicadísima hebra compuesta por millones de pares de nucleótidos apareados que deben separarse a un tiempo en toda su extensión, la tarea no podría concretarse por un elemental problema de espacio. Aunque desde el punto de vista teórico la molécula de ADN exhibe las características mencionadas, esa situación no se presenta por el modo como se asocia con las histonas y se enrolla sobre sí misma.

Recordemos que el ADN integra los **nucleosomas de 10 nm** y se enrolla

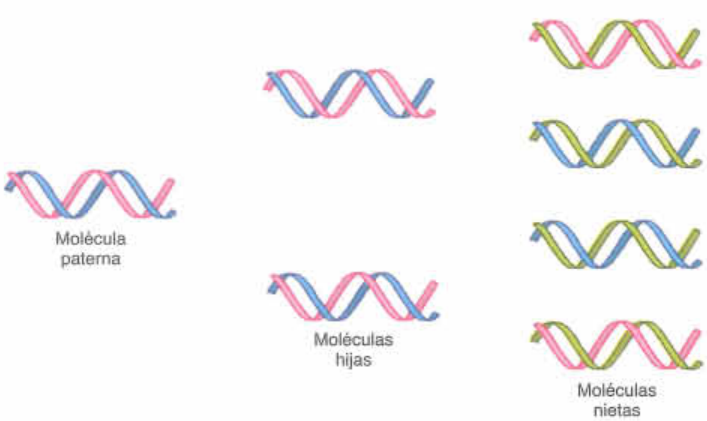


Fig. 17-5. Replicación semiconservadora del ADN. Se muestran las cadenas de ADN paterno y las cadenas hijas en dos generaciones sucesivas.

hasta generar una estructura helicoidal de **30 nm** de diámetro (solenoide), que al volver a enrollarse forma **lazos** de diferente longitud, los cuales emanan de un eje que está constituido por proteínas no histónicas (fig. 12-12). Los dos extremos de cada lazo se sujetan a ese eje por secuencias de ADN llamadas **SAR** (cap. 12-9).

Además de proteger al ADN de eventuales enredos, nudos y roturas, esta disposición de la cromatina lo organiza sectorialmente, ya que cada lazo representa una **unidad de replicación**. En los capítulos 12-9 y 14-12 se dijo que probablemente algunos lazos también constituyan unidades de transcripción, es decir, genes.

Al hablarse de unidades de replicación se quiere decir que el ADN no se sintetiza globalmente sino a partir de múltiples sectores a lo largo de su molécula, cada uno de los cuales corresponde a un lazo. Por consiguiente, cada unidad abarca al ADN comprendido entre los puntos de origen y de llegada del lazo a su base, es decir, entre las SAR. Es necesario advertir que tal sectorización no supone la existencia de algún tipo de interrupción en la continuidad del ADN, ya que la condición unitaria de su molécula no se pierde. La estrategia de sectorizar la replicación del ADN podrá ser valorada en las próximas secciones, cuando se analicen las múltiples complicaciones que debe sortear la célula para que este proceso se concrete.

17-4. La duplicación del ADN se genera a partir de múltiples orígenes de replicación

Si para sintetizarse el ADN comenzara a hacerlo a partir de uno de los extremos del cromosoma y avanzara hasta arribar al otro extremo, la replicación tardaría en promedio unos 30 días. No obstante, la duración de la fase S —o el tiempo que tarda el ADN en duplicarse— es de 7 horas aproximadamente, lo cual se debe a que a lo largo de cada cromosoma aparecen en el

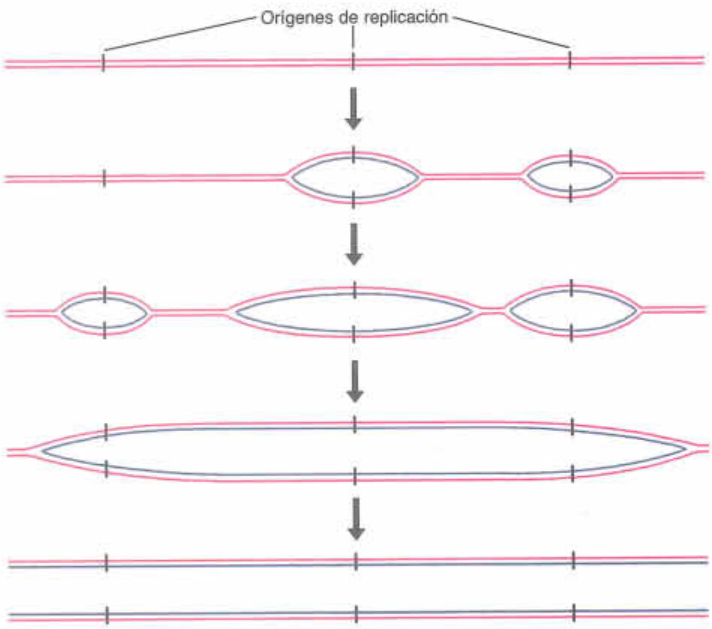


Fig. 17-6. Esquema que muestra tres orígenes de replicación contiguos en un sector de un cromosoma.

Fig. 17-7. Un sector cromatínico durante la replicación. (Cortesía de S. L. McKnight y O. L. Miller Jr.)

ADN múltiples **orígenes de replicación**, entre 20 y 80 por cada lazo de cromatina, es decir, por cada unidad de replicación.

Los orígenes de replicación se gestan al separarse localmente las dos cadenas del ADN (figs. 17-6 y 17-7). No surgen todos simultáneamente y su aparición más temprana o más tardía depende del grado de enrollamiento y de otras características de la cromatina en los lugares donde se forman.

Los orígenes de replicación contienen tramos de ADN especiales, compuestos por cientos de nucleótidos. Aunque son diferentes entre sí, todos poseen una secuencia común denominada **ARS** (por *autonomous replication sequence*), de alrededor de once nucleótidos (cap. 12-6).

El ADN de los orígenes de replicación se halla asociado a un complejo de seis proteínas llamado **ORC** (por *origin recognition complex*). Este se une al origen porque —como ocurre con los factores de transcripción— invade los surcos del ADN y reconoce ciertas singularidades químicas en sus superficies externas (cap. 14-9).

El ORC es requerido durante la activación de los orígenes de replicación. Aunque se ignora cómo actúa, se sabe que al comienzo de la fase S recluta a otras proteínas —por ejemplo, las denominadas **MCM** (por *minichromosome maintenance proteins*) y **Cdc6p** (por *cell division cycle protein*)—, con las cuales integra un complejo mayor llamado **pre-RC** (por *pre-replication complex*). Este cataliza el inicio de la replicación después de ser inducido por el factor **SPF** (por *S-phase promoting factor*), que como se verá en el capítulo 18-24 aparece en la célula al comienzo de la fase S.

Además de participar en la activación de los orígenes de replicación, el ORC impide que el ADN se reduplique durante la fase G2, por lo que evita que la célula comience la mitosis teniendo un número de moléculas de ADN mayor que el normal (cap. 18-24).

17-5. La replicación del ADN es un proceso bidireccional

Cuando en un origen de replicación se abre la doble hélice del ADN, se forma la llamada **burbuja de replicación**, cuyo tamaño aumenta a medida que avanza la separación de las cadenas en los dos extremos de la burbuja (fig. 17-6). Ello da lugar —en cada extremo— a una estructura con forma de Y denominada **horquilla de replicación**, ilustrada en la figura 17-8. Sus ramas representan a las cadenas del ADN separadas, y el tronco, a la doble hélice en vías de separación.

Las dos horquillas que nacen en cada origen avanzan en direcciones

opuestas. Desaparecen cuando colisionan con sus similares de las burbujas contiguas, al culminar el acercamiento progresivo entre ellas (fig. 17-9). Como es obvio, esto no ocurre con la horquilla que recorre el tramo distal del telómero.

El segmento de ADN que se sintetiza a partir de un origen de replicación recibe el nombre de **replicón**. La replicación concluye cuando se conectan entre sí todos los replicones. La acción cooperativa de miles de ellos es lo que permite que el ADN se sintetice en un tiempo relativamente breve para el ciclo vital de la célula.

17-6. Existen diferencias en el modo como se sintetizan las dos cadenas nuevas de ADN

Si bien hasta el momento se ha analizado la estrategia general usada por la célula para replicar su ADN en el menor tiempo posible, poco hemos dicho sobre la propia síntesis del ADN y menos sobre los detalles moleculares que dan lugar a la separación de sus cadenas. Sólo adelantamos que la síntesis necesita un molde de ADN preexistente y enzimas llamadas ADN polimerasas, y que tiene lugar por el agregado de nucleótidos en el extremo 3′ de las cadenas hijas.

Esta última condición, y porque las dos cadenas de la doble hélice son antiparalelas (fig. 17-3), crea durante la síntesis del ADN una primera dificultad. En efecto, dado que en cada horquilla los nucleótidos de una de las cadenas corren en dirección 5′→3′ y los de la otra lo hacen en dirección 3′→5′, la primera, al copiarse, tendría que gestar una cadena hija en dirección 3′→5′, algo que ninguna ADN polimerasa puede realizar.

La célula resuelve el problema recurriendo a estrategias diferentes para fabricar las dos cadenas nuevas.

Así, el tramo de cadena hija que crece en dirección 5′→3′ —cuyo molde es la cadena progenitora 3′→5′— se construye sin mayores complicaciones, mediante el agregado ***continuo*** de nucleótidos en su extremo 3′ a medida que se desplaza la horquilla (fig. 17-8).

En cambio, la otra cadena hija —que usa como molde la cadena progenitora que corre en dirección 5′→3′— se sintetiza de un modo singular, ya que para poder crecer debe hacerlo en dirección contraria al avance de la horquilla. Lo logra porque se fabrica de manera ***discontinua***, lo cual significa que se

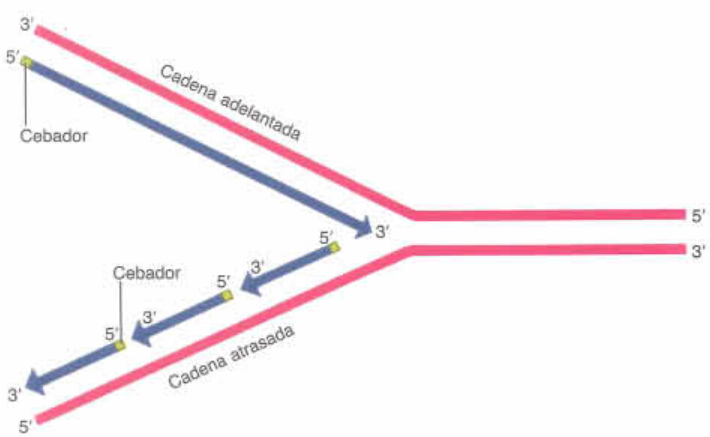


Fig. 17-8. La replicación es bidireccional. Además es continua en la cadena adelantada y discontinua en la cadena atrasada.

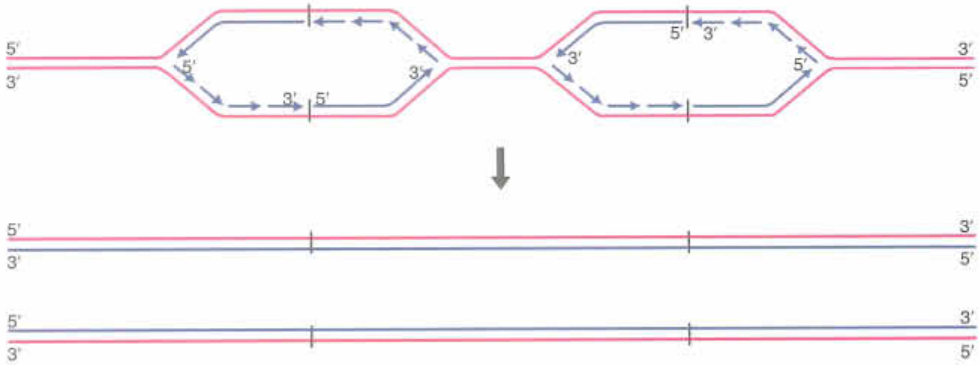


Fig. 17-9. Esquema que muestra dos replicones contiguos y los lugares donde se origina la replicación. Asimismo muestra el carácter bidireccional de la replicación y los sectores donde el ADN se sintetiza en forma continua y discontinua.

construyen pequeños tramos de ADN —llamados **fragmentos de Okazaki**— que se ligan entre sí conforme se van formando (fig. 17-8).

La figura 17-8 muestra cómo se sintetiza un fragmento de Okazaki. Puede verse que se copia un segmento de la cadena progenitora relativamente alejado del ángulo de la horquilla, situado "por detrás" del que diera origen al fragmento de Okazaki construido con anterioridad. Esto significa que el segmento de ADN progenitor más cercano a la horquilla permanece sin copiar, aunque a esa altura la otra cadena progenitora ya fue copiada por la cadena continua. Es por ello que a esta última se la llama también ***adelantada***, y a la discontinua, ***atrasada***.

Se dice que la replicación del ADN es un proceso **bidireccional** no sólo porque las dos cadenas se sintetizan en direcciones opuestas, sino también porque las dos horquillas avanzan en direcciones divergentes.

Además es **asimétrica**, ya que una misma cadena se replica en forma continua de un lado de la burbuja y en forma discontinua del otro lado (fig. 17-9).

En suma, cada burbuja presenta cuatro áreas generadoras de ADN, dos que lo hacen de manera continua y dos de manera discontinua, las primeras cruzadas con las segundas (fig. 17-9). Como vimos, la síntesis continua se produce en dirección de las horquillas y la discontinua en dirección contraria.

A continuación analizaremos de qué modo se sintetiza el ADN en la cadena continua (adelantada) y en la cadena discontinua (atrasada). Por motivos didácticos lo haremos en secciones separadas, aunque estos procesos —como los ya explicados y los que falta explicar— ocurren simultáneamente.

17-7. La cadena de ADN que se sintetiza en forma continua comienza a replicarse a partir de un cebador

Para iniciar la síntesis de la ***cadena continua*** de ADN, la ADN polimerasa necesita, además de una cadena de ADN 3′→5′ molde, un extremo 3′ para poder colocar el primer desoxirribonucleótido. Este extremo lo provee una pequeña pieza de ARN de unos 10 nucleótidos llamada **cebador** (fig. 17-8). La formación del cebador es catalizada por una ARN polimerasa específica, la **ADN primasa**. Se diferencia de las ARN polimerasas porque genera un ARN corto que queda unido al ADN copiado.

Una vez formado el cebador, la síntesis del ADN se produce por la acción de la ADN polimerasa y la provisión de desoxirribonucleótidos. Estos se encuentran en el núcleo como desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dTTP,

dCTP, dGTP) y se agregan secuencialmente en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento siguiendo el orden marcado por los nucleótidos de la cadena de ADN que sirve de molde (fig. 17-4).

La energía que se requiere para la replicación del ADN es tomada de los propios desoxirribonucleósidos trifosfato, que liberan dos fosfatos cuando se ligan entre sí (fig. 17-4).

Dada la naturaleza bidireccional de la replicación, al iniciarse la síntesis continua del ADN, en cada origen se forman dos cebadores divergentes, uno en cada cadena de la doble hélice abierta (fig. 17-9).

Seguidamente, la **ADN polimerasa δ**, que es la enzima que cataliza la síntesis de la cadena continua, agrega un desoxirribonucleótido en el extremo 3′ del cebador y luego los sucesivos nucleótidos en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento. La figura 17-11 muestra que la ADN polimerasa δ se localiza cerca del ángulo de la horquilla de replicación.

Cuando la horquilla arriba al extremo del replicón, la cadena continua toma contacto con la cadena discontinua del replicón vecino —que avanzaba en dirección contraria— y otra enzima, la **ADN ligasa**, une el extremo 3′ de la primera con el extremo 5′ de la segunda (fig. 17-9).

Además, donde se iniciara la síntesis de la cadena continua, el cebador es removido por una **nucleasa reparadora** —será descrita en la sección 17-22— y reemplazado por una pieza equivalente de ADN generada con la ayuda de una enzima especial, la **ADN polimerasa β**. Finalmente, esta pieza de ADN se conecta con el resto de la cadena continua mediante la ADN ligasa.

Una característica de las ADN polimerasas es su tendencia a desprenderse del ADN de la cadena molde. Empero, mientras hacen su trabajo permanecen unidas a él debido a que son sostenidas por una **abrazadera deslizante**. Como muestra la figura 17-10, la abrazadera se une a la polimerasa y rodea al ADN, de ahí que impide el desprendimiento de la enzima pero no su deslizamiento. Se libera de las ADN polimerasas β y δ apenas éstas se detienen, es decir, cuando la β completa el tramo de ADN que reemplaza al cebador y la δ alcanza el extremo del replicón. Sólo entonces las enzimas se desprenden del ADN. Dada la pequeñez del cebador, la ADN polimerasa β se mantiene unida al ADN por un período muy breve.

La abrazadera deslizante se forma con el concurso de tres subunidades proteicas iguales entre sí denominadas **PCNA** (por *proliferating cell nuclear antigen*), cada una integrada por dos dominios topológicamente idénticos.

17-8. La cadena de ADN que se sintetiza en forma discontinua requiere muchos cebadores

Como se acaba de ver, la cadena continua necesita un solo cebador, el cual se instala apenas comienza la replicación. En cambio, la ***cadena discontinua*** requiere que la **ADN primasa** fabrique múltiples **cebadores**, uno para cada fragmento de Okazaki (figs. 17-8 y 17-11).

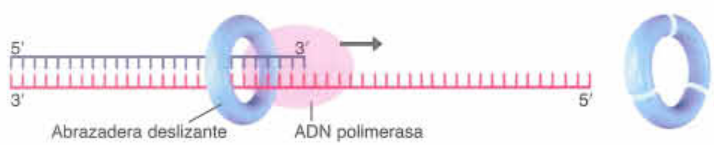


Fig. 17-10. Unión de la abrazadera deslizante a la ADN polimerasa. A la derecha se ilustran las tres subunidades proteicas que componen la abrazadera.

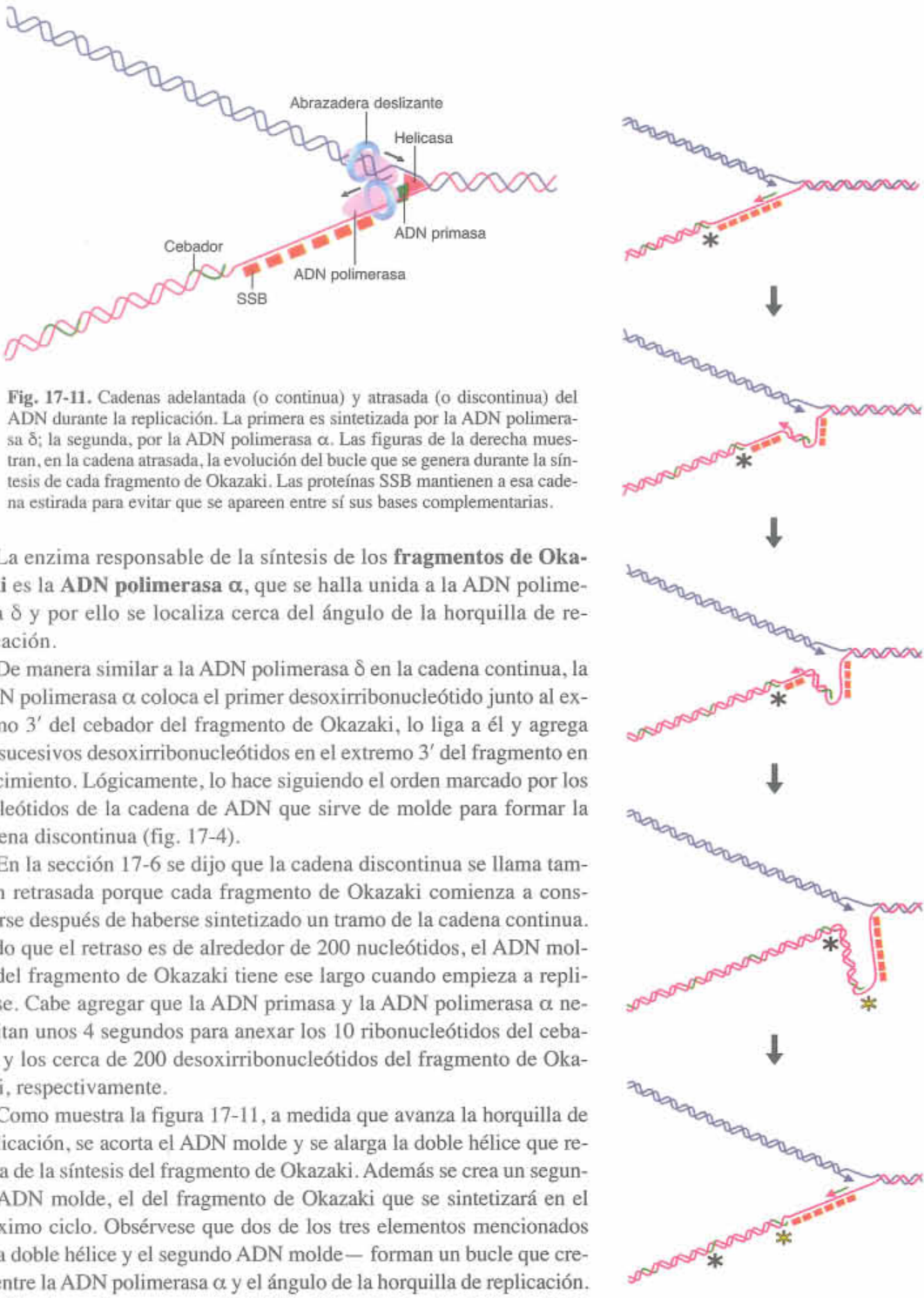


Fig. 17-11. Cadenas adelantada (o continua) y atrasada (o discontinua) del ADN durante la replicación. La primera es sintetizada por la ADN polimerasa δ; la segunda, por la ADN polimerasa α. Las figuras de la derecha muestran, en la cadena atrasada, la evolución del bucle que se genera durante la síntesis de cada fragmento de Okazaki. Las proteínas SSB mantienen a esa cadena estirada para evitar que se apareen entre sí sus bases complementarias.

La enzima responsable de la síntesis de los **fragmentos de Okazaki** es la **ADN polimerasa α**, que se halla unida a la ADN polimerasa δ y por ello se localiza cerca del ángulo de la horquilla de replicación.

De manera similar a la ADN polimerasa δ en la cadena continua, la ADN polimerasa α coloca el primer desoxirribonucleótido junto al extremo 3′ del cebador del fragmento de Okazaki, lo liga a él y agrega los sucesivos desoxirribonucleótidos en el extremo 3′ del fragmento en crecimiento. Lógicamente, lo hace siguiendo el orden marcado por los nucleótidos de la cadena de ADN que sirve de molde para formar la cadena discontinua (fig. 17-4).

En la sección 17-6 se dijo que la cadena discontinua se llama también retrasada porque cada fragmento de Okazaki comienza a construirse después de haberse sintetizado un tramo de la cadena continua. Dado que el retraso es de alrededor de 200 nucleótidos, el ADN molde del fragmento de Okazaki tiene ese largo cuando empieza a replicarse. Cabe agregar que la ADN primasa y la ADN polimerasa α necesitan unos 4 segundos para anexar los 10 ribonucleótidos del cebador y los cerca de 200 desoxirribonucleótidos del fragmento de Okazaki, respectivamente.

Como muestra la figura 17-11, a medida que avanza la horquilla de replicación, se acorta el ADN molde y se alarga la doble hélice que resulta de la síntesis del fragmento de Okazaki. Además se crea un segundo ADN molde, el del fragmento de Okazaki que se sintetizará en el próximo ciclo. Obsérvese que dos de los tres elementos mencionados —la doble hélice y el segundo ADN molde— forman un bucle que crece entre la ADN polimerasa α y el ángulo de la horquilla de replicación.

El bucle se forma porque la ADN polimerasa α no puede deslizarse activamente sobre el ADN molde debido a que, como se vio, se ha-

lla unida a la ADN polimerasa δ en el ángulo de la horquilla de replicación. Por consecuencia, le corresponde al ADN molde deslizarse con relación a la enzima, lo cual genera un bucle de longitud creciente que hace posible que el ADN molde se convierta en una doble hélice sin que la ADN polimerasa α se mueva de su lugar. Cabe agregar que existen otros modelos teóricos de bucle que proponen evoluciones distintas a la que se acaba de describir. El modelo presentado aquí es uno de los más difundidos y, como los restantes, deriva de estudios efectuados en células procariotas.

Otro dato que revela la figura 17-11 es que los dos ADN moldes —el que se acorta y el que se alarga— están asociados a múltiples unidades de una proteína llamada **SSB** (por *single-strand DNA binding*), cuya función es mantener relativamente rectos a esos ADN simples para evitar que se apareen las bases complementarias de sus propias cadenas, lo cual impediría la labor de la ADN polimerasa α. Debe señalarse que una vez que la célula fabrica las SSB necesarias, éstas se reutilizan mientras dura la replicación, ya que sus unidades se transfieren de los ADN molde que se acortan a los ADN molde que se alargan.

Al igual que las ADN polimerasas δ y β, la ADN polimerasa α no se desprende del ADN molde debido a que se le asocia una **abrazadera deslizante**, cuyas partes se separan —y la abrazadera se desarma— apenas el fragmento de Okazaki termina de sintetizarse (figs. 17-10 y 17-11). Luego el bucle se endereza y sus dos componentes —el fragmento de Okazaki y el flamante ADN molde— quedan situados en el lado opuesto de la enzima (fig. 17-11). Ello crea las condiciones para que comience a formarse un nuevo fragmento de Okazaki, lo cual ocurre una vez que se forma el cebador y que la ADN polimerasa α se une al ADN molde como consecuencia del rearmado de la abrazadera deslizante.

Como se vio en la sección 17-6, a partir de los orígenes de replicación cada una de las dos cadenas de la burbuja da origen a dos cadenas divergentes, una que crece en forma continua y otra en forma discontinua (fig. 17-9). Dada la manera como se construye la cadena discontinua, su extremo 3′ corresponde al extremo 3′ del primer fragmento de Okazaki sintetizado, y su extremo 5′, al extremo 5′ del último fragmento. Además, el primer fragmento se liga al extremo 5′ de la cadena continua del replicón, mientras que el último se liga con el extremo 3′ de la cadena continua del replicón contiguo.

La ADN polimerasa α interrumpe su actividad después que agrega el último nucleótido del fragmento de Okazaki, cuyo extremo 3′ queda junto al extremo 5′ del cebador formado precedentemente (fig. 17-8). Del mismo modo que en la cadena continua, los cebadores de la cadena discontinua son removidos por una **nucleasa reparadora** y reemplazados con piezas de ADN construidas por la **ADN polimerasa β**. Luego actúa la **ADN ligasa**, que suelda el extremo 3′ de esas piezas con el extremo 5′ de los fragmentos de Okazaki precedentes.

17-9. En los telómeros la replicación del ADN es dirigida por la telomerasa

En el capítulo 12-6 se dijo que el ADN de los **telómeros**, a pesar de que por su ubicación puede fusionarse con el ADN de otros telómeros o degradarse mediante una nucleasa, en condiciones normales no corre esos riesgos porque se dobla sobre sí mismo y las proteínas TRF le forman un capuchón

protector. Tanto el doblez como el capuchón se ilustran en la parte inferior de la figura 17-12. Obsérvese que el ADN se dobla porque una de sus cadenas es más larga que la otra e invade un tramo cercano de la doble hélice, lo que da lugar a una triple hélice de ADN de unos 150 nucleótidos de extensión.

Cabe agregar que la cadena discontinua del ADN telomérico se sintetiza de una manera singular. Es que la ADN polimerasa β no puede construir el tramo de ADN que debe reemplazar al último cebador que se elimina de esa cadena porque carece de un extremo 3′ a partir del cual pueda comenzar a formarse. Por consecuencia, en cada una de las sucesivas divisiones celulares, con la eliminación del último cebador se pierde un tramo del ADN telomérico, lo que provoca su progresivo acortamiento.

Naturalmente, si al cabo de un determinado número de divisiones los cromosomas no revirtieran ese acortamiento, no sólo perderían los telómeros sino que comenzarían a perder información genética. En la mayoría de las células esto no sucede porque después de alrededor de 50 divisiones el acortamiento telomérico llega a un nivel que les impide iniciar una nueva división. Más aún, esas células envejecen y mueren debido a que desde sus telómeros agotados surgen señales que activan al gen de la proteína P53, lo cual, como se verá en los capítulos 18-29 y 22-6, bloquea la división y determina la

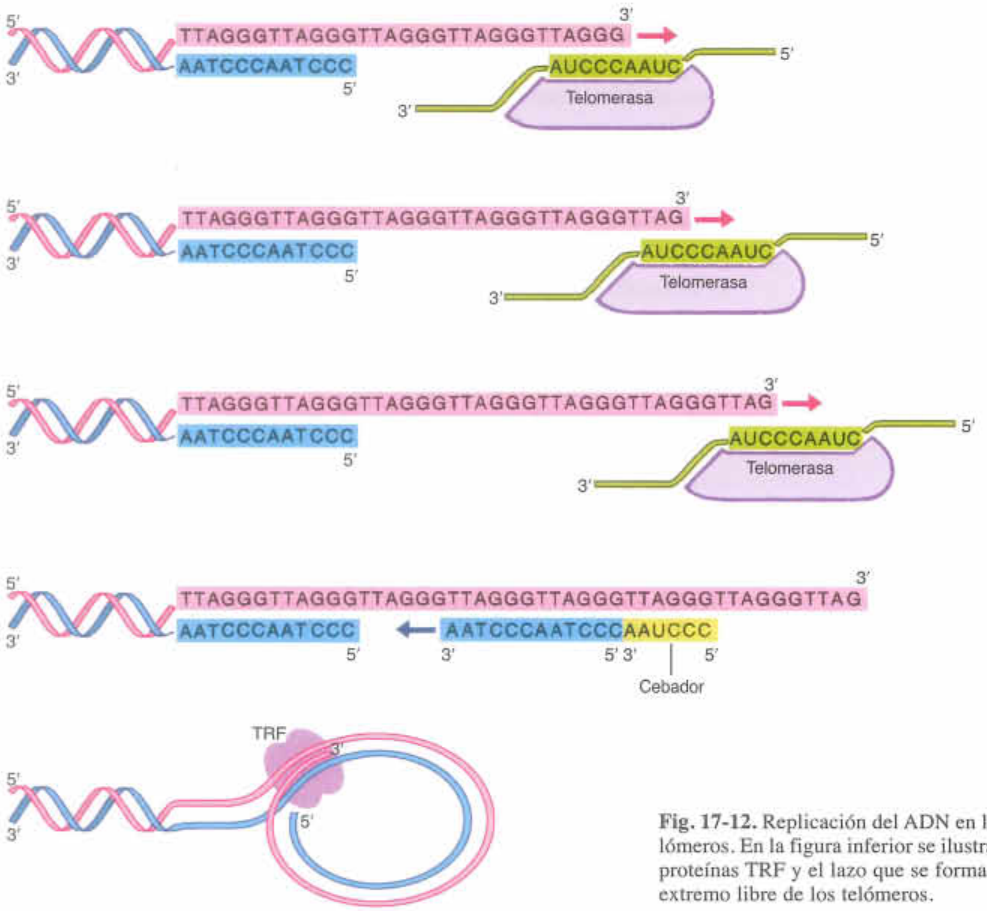


Fig. 17-12. Replicación del ADN en los telómeros. En la figura inferior se ilustran las proteínas TRF y el lazo que se forma en el extremo libre de los telómeros.

muerte de las células. Así, la muerte sobreviene antes de que las células pierdan información genética.

En algunas células pertenecientes a las líneas germinativas del testículo y el ovario (cap. 19-3) lo anterior no ocurre a pesar de que se dividen repetidamente, lo cual se debe a que contienen un complejo enzimático ribonucleoproteico diseñado para recuperar el ADN telomérico que pierden durante las divisiones. Ese complejo se llama **telomerasa** y está integrado por varias proteínas y un ARN de alrededor de 450 nucleótidos llamado **ARNte** (cap. 13-2), que incluye la secuencia $\overleftarrow{AUCCCAAUC}$ (fig. 17-12). Veamos cómo actúa la telomerasa, adelantando que sus propiedades catalíticas derivan de su fracción proteica.

En los telómeros la cadena 3′→5′ del ADN está compuesta por numerosas secuencias $\overleftarrow{AATCCC}$ consecutivas, las cuales, junto con sus complementarias *TTAGGG* de la cadena 5′→3′, se van perdiendo durante las sucesivas divisiones celulares.

La recuperación de este ADN telomérico repetitivo (cap. 12-7) comienza en un ciclo celular ulterior, cuando la secuencia $\overleftarrow{AUCCCAAUC}$ del ARN de la telomerasa se une al extremo 3′ de la cadena 5′→3′, colocándose en el lado de la cadena 3′→5′ del modo ilustrado en la figura 17-12.

A partir de ese momento la cadena 5′→3′ reúne los requisitos que le permiten crecer: tiene su propio extremo 3′ libre y una secuencia de nucleótidos que le sirve de molde, la del ARN de la telomerasa. Puesto que a medida que crece provoca el corrimiento de la telomerasa, el proceso se reitera varias veces. Concluye cuando la cadena 5′→3′ recupera su longitud y el telómero se libera de la telomerasa.

Como se ve, la telomerasa es una ADN polimerasa que copia una secuencia de ARN, de modo que se comporta como una transcriptasa inversa (sección 17-25).

Resta describir cómo la cadena 3′→5′ recupera su longitud. Es restaurada por la ADN polimerasa α, que utiliza como molde el ADN 5′→3′ recién sintetizado y agrega los nucleótidos complementarios a partir del extremo 3′ del ARN de un cebador previamente fabricado por la enzima ADN primasa. Finalmente, el cebador es removido y la enzima ADN ligasa une el antiguo extremo 5′ de la cadena con el extremo 3′ del segmento recién formado.

Dado que no existe un balance exacto entre las pérdidas teloméricas y sus recuperaciones periódicas, la longitud de los telómeros varía en los distintos cromosomas.

17-10. La lamina A desempeña un papel central en el mantenimiento de los telómeros

En los capítulos 5-3, 12-2 y 12-14 se dijo que la ***lamina A*** es una de las proteínas de la lámina nuclear y que los telómeros están unidos a ella.

Investigaciones adicionales revelaron que la lamina A desempeña un papel central en el mantenimiento de los telómeros, ya que la presencia de una mutación en su gen —llamado **LMNA** (por *lamin A*)— acelera el acortamiento de los extremos de los cromosomas, lo cual produce **envejecimiento celular prematuro** o **progeria**. La proteína anómala que resulta de la mutación del gen LNMA se conoce con el nombre de **progerina**.

Corresponde advertir que el envejecimiento celular prematuro puede deberse a otras causas, como el estrés oxidativo (cap. 10-3), la sobreexpresión de ciertos oncogenes (cap. 18-31) y la excesiva exposición a los rayos γ.

Otros estudios sobre envejecimiento celular han demostrado que, en medios de cultivo, las células provenientes de embriones y de individuos jóvenes se dividen más veces que las células provenientes de individuos de mayor edad, las cuales, además, mueren mucho antes. Este fenómeno se conoce con el nombre de ***senescencia replicativa***. Se cree que las células jóvenes cultivadas viven más porque sus telómeros recuperan el ADN que pierden en cada división a una velocidad mayor que los telómeros de las células envejecidas, pues en éstas la síntesis de telomerasa se reduciría progresivamente a medida que se suceden las divisiones celulares.

Debe agregarse que en las ***células cancerosas*** la síntesis de la telomerasa está conservada o aumentada, lo que explicaría por qué cuando se las cultiva suelen multiplicarse indefinidamente (cap. 21-4).

17-11. La topoisomerasa I y la girasa disminuyen la tensión torsional que se produce en la doble hélice del ADN al separarse sus dos cadenas por la acción de la helicasa

Debido a que el ADN es una molécula compuesta por dos cadenas helicoidales apareadas y enrolladas entre sí, su síntesis presenta una dificultad adicional, soslayada hasta ahora para no complicar el análisis de los puntos anteriores.

Hemos visto que las ADN polimerasas copian los nucleótidos del ADN después que las dos cadenas de la doble hélice se separan. La separación es producida por una enzima específica llamada **helicasa**, que se sitúa en el ángulo de la horquilla de replicación por delante de las ADN polimerasas δ y α y corta los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias de las dos cadenas de la doble hélice (fig. 17-11). Este proceso requiere energía, que es tomada del ATP.

Conforme avanza la horquilla de replicación, la helicasa deja tras de sí tramos de las dos cadenas del ADN con sus nucleótidos expuestos. Recordemos que para dar lugar a la cadena discontinua, los nucleótidos de la cadena progenitora 5′→3′ permanecen un tiempo sin replicar, combinados con las SSB.

Dada la naturaleza helicoidal del ADN, la helicasa no puede abrir la doble hélice del ADN como si abriera un cierre relámpago. El modelo que se muestra en la figura 17-13 nos ayuda a comprender por qué. Conforme las cadenas del ADN se separan a nivel de la horquilla, se va acumulando delante de ésta —en la doble hélice no abierta todavía— una torsión cada vez mayor. Como es de suponer, esa torsión haría inviable la separación de las cadenas por la helicasa. Por lo tanto, para que la acción de la enzima no sea frenada es necesario evitar el superenrollamiento con un desenrollamiento equivalente, a fin de prevenir excesivas tensiones torsionales en los segmentos de la doble hélice aún no replicados.

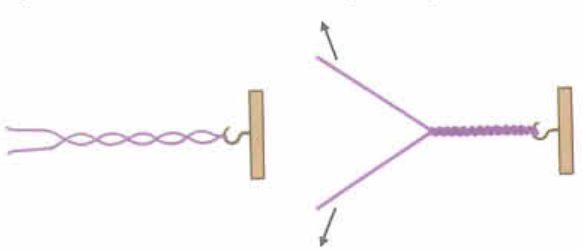


Fig. 17-13. Separación de las dos cadenas del ADN a nivel de la horquilla de replicación y su consecuencia mecánica, evitada por las topoisomerasas.

El desenrollamiento es producido por dos enzimas específicas, la topoisomerasa I y la gi-

rasa (o topoisomerasa II). Ambas utilizan energía y evitan las vueltas en exceso mediante un proceso que se cumple en tres pasos.

En el primer paso, la **topoisomerasa I** corta una de las cadenas de la doble hélice; en el segundo, la cadena cortada gira en torno de su propio eje; en el tercero, los extremos cortados se vuelven a unir.

En cambio, la **girasa** no corta una sino las dos cadenas del ADN, las cuales restablecen sus uniones después de haber girado.

Como se ve, ambas enzimas se comportan como nucleasas (cortan al ADN a nivel de las uniones fosfodiéster) y ADN ligasas (reconectan las piezas cortadas después de haber rotado el ADN).

La girasa es una de las proteínas que integra el andamio proteico en el que se sostienen los lazos de cromatina de 30 nm (cap. 9-9); se asocia con el ADN del lazo colocándose cerca de sus extremos, donde compondría una suerte de articulación giratoria similar a la mostrada en la figura 17-14. Con respecto a la topoisomerasa I, existirían varias en cada lazo, pues operarían entre las burbujas de replicación.

La topoisomerasa I y la girasa se diferencian no sólo porque la primera corta una sola cadena del ADN y la segunda corta las dos, sino por la magnitud de sus efectos, ya que el desenrollamiento que produce la topoisomerasa I es de corto alcance y el de la girasa abarca una extensión de ADN mucho mayor.

Por otra parte, no se descarta que ambas enzimas sirvan para prevenir enredos en las moléculas de cromatina fuera de la replicación, ya que podrían actuar —recurriendo a una analogía imperfecta— como tijeras y manos que para desenredar un extenso hilo enmarañado lo cortan primero y lo anudan después.

17-12. La topoisomerasa I es requerida durante la transcripción

Durante la **transcripción del ADN**, cuando la ARN polimerasa avanza y abre el lado frontal de la burbuja (fig. 14-2), se forma en la doble hélice un superenrollamiento similar al que se produce durante la replicación. Al igual que en esta última, el superenrollamiento de la transcripción debe ser continuamente aliviado, de lo cual se ocupa la **topoisomerasa I**.

17-13. La compactación de la cromatina retrasa la replicación

El enrollamiento extremo de la cromatina, derivado de los sucesivos grados de compactación causados por la asociación del ADN con las histonas (cap. 12-9), impide la replicación. En el capítulo 14-12 se analizaron algunos mecanismos por medio de los cuales, durante la transcripción, la ARN polimerasa sortea parte de la compactación de la cromatina. Hasta el momento no se poseen datos ciertos sobre mecanismos análogos en la replicación. A pesar de ello, no se duda de que la compactación del ADN afecta la replicación, ya que la heterocromatina, a diferencia de la eucromatina (cap. 10-12), se replica muy tardíamente en la fase S.

Esta diferencia se aprecia cuando se compara la replicación del cromosoma X activo con la de su homólogo compactado (***cuerpo de Barr***); la de éste es bastante más tardía a pesar de que ambos cromosomas X son virtualmente idénticos.

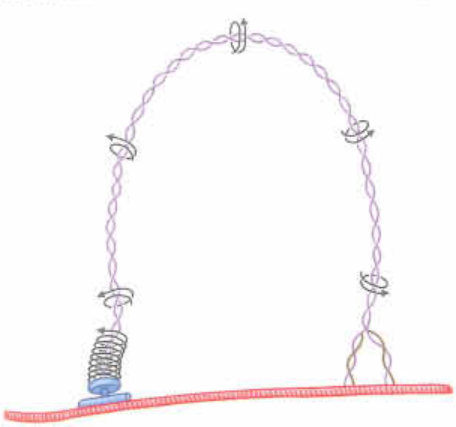


Fig. 17-14. Efecto hipotético de la girasa para evitar el superenrollamiento que se produciría en el ADN como consecuencia de la separación de sus dos cadenas.

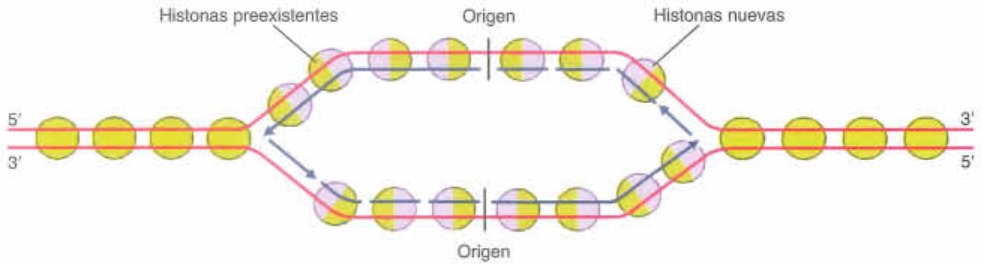


Fig. 17-15. Agregado de histonas nuevas durante la replicación del ADN.

También hay diferencias en la replicación cuando se compara el ADN de las bandas R (ricas en G-C apareados) con el ADN de las bandas G y Q (ricas en A-T apareados) (fig. 12-17): las bandas R se replican durante la primera mitad de la fase S y las bandas G y Q lo hacen durante la segunda mitad. El significado de estas bandas ha sido analizado en el capítulo 12-13.

17-14. Como el ADN, las histonas también se sintetizan en la fase S

Hemos dicho que el ADN se replica semiconservadoramente, es decir, que las dos cadenas progenitoras, al separarse para su replicación, se reparten en ambos cromosomas hijos (sección 17-2) (fig. 17-5).

Respecto de los nucleosomas, se sabe cómo se segregan sus histonas. Al cabo de la replicación se reparten —aparentemente al azar— entre ambas cromátidas hijas, por lo que éstas deben proveerse de histonas de reciente formación. Los nucleosomas nuevos se forman con histonas preexistentes e histonas nuevas (figs. 17-7 y 17-15).

Los nucleosomas se construyen en dos pasos. En el primero, las histonas H3 y H4 se ligan entre sí mediante la **proteína N1** (cap. 12-9) y "son entregadas" al ADN por un complejo proteico llamado **CAF-I** (por *chromatin assembly factor*). En el segundo, las histonas H2A y H2B, asistidas por la **nucleoplasmina** (cap. 12-9), se unen a las histonas H3 y H4 y completan el octámero (figs. 12-8 y 17-16).

La mayor parte de las histonas nuevas se sintetizan en la fase S y se incorporan a los nucleosomas apenas el ADN es duplicado (fig. 17-15).

Durante la fase S, casi todas las copias —entre 20 y 50— de los genes de las cinco histonas (cap. 13-7) se transcriben simultáneamente. Por lo tanto, en la fase S la concentración de los ARNm de las histonas es muy alta, aunque no sólo porque aumenta su síntesis sino también porque disminuye su degradación (cap. 16-22).

La pequeña cantidad de histonas que se sintetizan fuera de la fase S serviría para reemplazar a las que envejecen. Ello es infrecuente porque las histonas son bastante longevas y suelen mantenerse durante toda la vida de la célula.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

17-15. La replicación constituye el prólogo de la división celular

Como señalamos al comienzo del capítulo, al concluir la replicación los cromosomas contienen una doble dotación de ADN y las moléculas gemelas

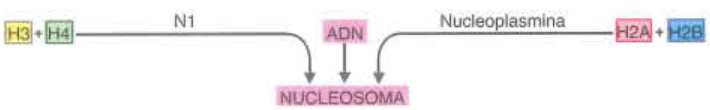


Fig. 17-16. Participación de la proteína N1 y de la nucleoplasmina en el armado de los nucleosomas.

—es decir, el par de cromátidas— quedan unidas por el centrómero hasta la anafase de la división celular. Así, la replicación del ADN constituye el prólogo de la división, por lo que parte de lo analizado en este capítulo habrá de retomarse en el próximo, dedicado a la mitosis y su control.

MUTACION DEL ADN

17-16. Las alteraciones del ADN pueden deberse a mutaciones génicas o a aberraciones cromosómicas

El material genético se halla en constante peligro de ser alterado, no sólo por la acción de agentes ambientales sino también espontáneamente, por ejemplo, como consecuencia de errores que ocurren durante la replicación.

Cuando las alteraciones del genoma involucran a uno o a unos pocos nucleótidos, se denominan **mutaciones génicas**.

Otras veces las alteraciones son de tal magnitud que afectan al cariotipo, por lo cual llevan el nombre de **aberraciones cromosómicas**. Pueden ser estructurales o numéricas. En las aberraciones estructurales se hallan afectadas partes extensas de un cromosoma, que pueden perderse, invertirse, duplicarse o translocarse. En las numéricas, en cambio, el cariotipo exhibe un número de cromosomas menor o mayor que el normal.

En este capítulo nos ocuparemos exclusivamente de las mutaciones génicas, ya que las aberraciones cromosómicas serán analizadas en el capítulo 20.

17-17. Las mutaciones génicas tienen diversas consecuencias

Las mutaciones génicas más comunes consisten en la sustitución de un nucleótido por otro, en la pérdida (deleción) de uno o varios nucleótidos, o en la inserción (intercalación) de uno o varios nucleótidos en una molécula de ADN. Cualquiera que sea el tipo de mutación, genera un cambio en la información contenida en el gen y lleva a la producción de una proteína distinta de la esperada o a la ausencia de su producción.

Como se sabe, el cambio de un nucleótido en un gen da lugar a un codón diferente y, en consecuencia, a la presencia en la proteína de un aminoácido que no corresponde (salvo que el nuevo codón sea "sinónimo" y, por lo tanto, codifique al mismo aminoácido). Muchas veces el cambio de un solo aminoácido produce alteraciones sustanciales en las funciones de la proteína, ya que la modificación de su estructura primaria modifica las estructuras secundaria y terciaria de la molécula.

La deleción o la intercalación de un nucleótido en un gen cambia el encuadre de los codones en el ARNm desde el sitio de la mutación hasta el codón terminal (cap. 16-3). Ello suele traducirse en la producción de una proteína aberrante o, más comúnmente, en la interrupción de su síntesis, al aparecer un codón de terminación antes del lugar que corresponde.

Las mutaciones pueden producirse en las células somáticas o en las germinativas. En el primer caso, si bien son capaces de afectar el fenotipo de los individuos, no pasan a la descendencia. En cambio, cuando se instalan en las células germinativas pueden transmitirse a la descendencia y heredarse de generación en generación.

Para los individuos las mutaciones suelen ser perjudiciales. Por ejemplo,

cuando corresponden a proteínas involucradas en la morfogénesis, las mutaciones se traducen en ***malformaciones congénitas anatómicas***.

Otras veces las proteínas modificadas dan lugar a ***alteraciones funcionales*** o a ***trastornos metabólicos***. Como ejemplos de las primeras pueden mencionarse las hemoglobinopatías, en las que la presencia en la hemoglobina de un aminoácido errado suele generar graves disfunciones sanguíneas. En cambio, en los trastornos metabólicos se alteran enzimas que participan en procesos sintéticos y degradativos de diversas moléculas.

Las mutaciones también pueden afectar a genes necesarios para la supervivencia de las células o a genes involucrados en el control de la multiplicación celular. En el último caso suele descontrolarse la proliferación de las células, con la consiguiente aparición de cuadros cancerígenos (cap. 18-30).

Consideradas desde un ángulo biológico global, las mutaciones génicas tienen un lado positivo, ya que a veces su acumulación en el genoma forja las condiciones para la aparición de individuos mejor adaptados al medio ambiente, base de la evolución de las especies.

17-18. Existen varias clases de mutaciones génicas espontáneas

La mayor parte de las mutaciones génicas que afectan a las células se producen espontáneamente, durante la replicación del ADN. Ello se debe a que cuando se sintetizan las cadenas hijas pueden insertarse nucleótidos incorrectos, o nucleótidos de menos o de más. Como se verá en futuras secciones, la célula ha desarrollado mecanismos especiales para corregir tales errores y lograr la mayor fidelidad posible en la duplicación del ADN.

Se estima que estos mecanismos corrigen casi todos los errores que se producen durante la replicación, de modo que, de los numerosos nucleótidos incorrectamente insertados cada vez que se copian los millones de pares de nucleótidos del genoma humano, en promedio persisten errados (mutados) solamente unos cincuenta.

No obstante, debido a que el 90% del ADN nuclear carece de genes (cap. 12-7), no más del 10% de esas cincuenta mutaciones son capaces de ocasionar alguna consecuencia.

También existen mutaciones génicas espontáneas ajenas a la replicación. Algunas aparecen como consecuencia de la **desaminación** de las bases de los nucleótidos, dada la facilidad con que pierden sus grupos amino. Como muestra la figura 17-17, cuando la citosina se desamina se convierte en uracilo, que se aparea con la adenina y no con la guanina. Si la célula no corrige el error reemplazando el uracilo por una citosina, en la próxima replicación —al asumir la cadena hija alterada el papel de cadena progenitora— insertaría una adenina en lugar de una guanina, y esa mutación se instalaría en el genoma. Algo análogo ocurre —espontáneamente también— cuando se desamina la adenina, que al convertirse en hipoxantina se aparea con la citosina en vez de hacerlo con la timina.

Otras clases de mutaciones génicas espontáneas aparecen a raíz de la **apurinización**, es decir, cuando una base —particularmente una purina— se desprende de la desoxirribosa del nucleótido (fig. 17-18). Por lo tanto, en esos puntos —llamados **sitios AP** (por *apurínico* o *apirimidínico*)— los genes carecen de información.

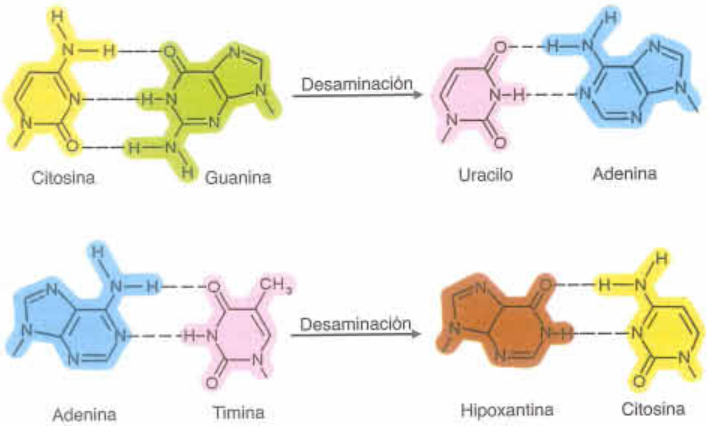


Fig. 17-17. Consecuencias de mutaciones génicas espontáneas producidas por desaminación.

17-19. Varios agentes ambientales inducen la aparición de mutaciones génicas

Existen tres grupos de agentes ambientales que al actuar sobre las células inducen la aparición de mutaciones: 1) los químicos, que son los más difundidos; 2) las radiaciones ionizantes, por ejemplo, la radiación ultravioleta de la luz solar, los rayos γ y los rayos X, y 3) ciertos virus capaces de introducir segmentos de ADN foráneo en los genes.

Algunos de estos agentes incrementan la aparición de mutaciones espontáneas en el ADN (sustituciones de bases, deleciones, intercalaciones, desaminaciones, apurinizaciones). Otros dan lugar a otras clases de cambios. Por ejemplo, los rayos γ y los rayos X producen roturas en la doble hélice, mientras que la luz ultravioleta forma dímeros entre pirimidinas contiguas en una de las dos cadenas del ADN. Los más comunes son los **dímeros de timina** (fig. 17-19). La unión entre dos timinas vecinas distorsiona su apareamiento con las adeninas de la cadena opuesta, lo cual altera la replicación normal del ADN y conduce a la aparición de mutaciones.

REPARACION DEL ADN

17-20. Existen varios mecanismos para reparar el ADN

Para cada tipo de alteración del ADN existe un mecanismo de reparación especial, dirigido por una combinación de enzimas específicas. A continuación analizaremos los mecanismos más frecuentes utilizados por la célula para corregir los errores en el ADN. En la mayoría de los casos se basan en la información genética complementaria existente entre las dos cadenas de la doble hélice, de modo que si una de ellas sufre alguna alteración (mutación), puede ser reparada a partir de la información normal contenida en la otra. Como en cualquier proceso biológico, los mecanismos reparadores de errores en el ADN pueden fallar, con la consiguiente aparición de mutaciones génicas.

Fig. 17-18. Consecuencia de la mutación génica espontánea producida por apurinización.

17-21. La ADN polimerasa corrige los errores que ella misma comete

Durante la replicación del ADN, para que un nucleótido pueda ser agregado en el extremo 3′ de la cadena hija en crecimiento es imprescindible que el nucleótido incorporado precedentemente sea el que corresponde. Más aún, si la ADN polimerasa inserta en forma accidental un nucleótido incorrecto, "percibe" el error y no agrega nuevos nucleótidos, de modo que el crecimiento de la cadena se detiene transitoriamente. El error es resuelto por la propia enzima mediante el ejercicio de una función adicional conocida como ***"lectura de pruebas"***.

Así, la ADN polimerasa, ante la presencia de un nucleótido insertado incorrectamente, retrocede y lo elimina. Para ello utiliza la actividad exonucleolítica 3′→5′ de una de sus subunidades. Una vez eliminado el nucleótido, la síntesis del ADN progresa normalmente.

Como vemos, durante la replicación la ADN polimerasa controla los errores que ella misma comete y además los corrige. Sin embargo, dada la importancia de la integridad del ADN para la vida celular, si falla esta "lectura de pruebas" se pone en marcha un segundo sistema de reparación que se cumple de la manera descrita en la próxima sección.

17-22. Existe un segundo sistema de reparación a cargo de una nucleasa reparadora

En primer término, el o los nucleótidos erróneos son removidos por una **nucleasa reparadora**, la misma que remueve a los cebadores en la síntesis continua y discontinua del ADN (secciones 17-7 y 17-8). Para ello, la nucleasa corta la unión fosfodiéster que conecta al nucleótido incorrecto con el nucleótido contiguo. La reparación se completa cuando la ADN polimerasa β sintetiza la pieza faltante y la ADN ligasa une esa pieza al ADN cortado.

Debe existir alguna señal que le permita a la nucleasa reparadora distinguir en cuál de las dos cadenas del ADN se encuentra el nucleótido incorrecto. En los procariotas tal reconocimiento se basaría en la existencia de una diferencia transitoria en la metilación de ciertas adeninas entre las dos cadenas después de la replicación. Dado que transcurre un tiempo entre la síntesis de la cadena hija y la metilación, los errores serían reparados durante ese período.

17-23. Las desaminaciones y las apurinizaciones se reparan con las mismas enzimas

La aparición en el ADN de uracilos en lugar de citosinas —como consecuencia de **desaminaciones** espontáneas— da lugar a un mecanismo de reparación que utiliza una ADN glicosidasa específica. Esta reconoce y corta la conexión entre la base errónea —el uracilo— y la desoxirribosa, de modo que deja al nucleótido sin su base (fig. 17-20). En forma similar, otra ADN glicosidasa específica remueve la hipoxantina que se produce al desaminarse la adenina.

Fig. 17-19. Formación de dímeros de timina por acción de la luz ultravioleta.

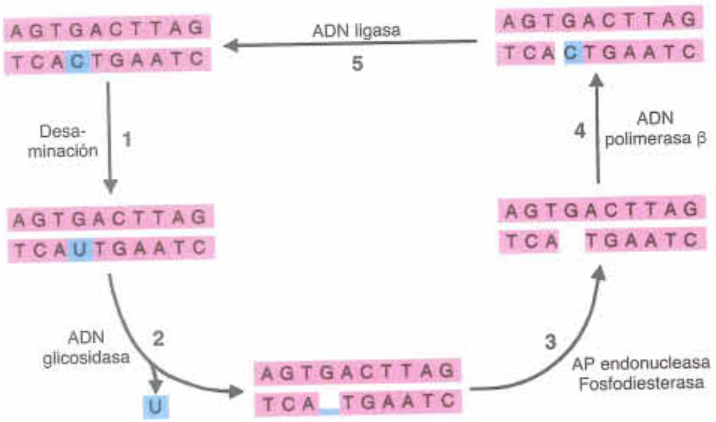


Fig. 17-20. Acción de las enzimas que reparan el ADN mutado por desaminación.

Los sitios AP que se generan evolucionan del siguiente modo. La desoxirribosa sin base es removida por la AP endonucleasa y una fosfodiesterasa, que cortan, respectivamente, el extremo 5′ y el extremo 3′ del sitio AP y remueven el azúcar. Luego la ADN polimerasa β coloca el nucleótido correcto en el lugar vacío y la ADN ligasa pone fin a la reparación.

Estos tres últimos pasos se utilizan también para reparar los sitios AP que se producen como consecuencia de las **apurinizaciones** espontáneas (sección 17-18).

17-24. En la reparación de los dímeros de timina intervienen dos nucleasas

Generalmente las mutaciones inducidas por agentes ambientales son reparadas por los mismos mecanismos que se utilizan para la corrección de las mutaciones espontáneas. En cambio, los **dímeros de timina** (fig. 17-19) —producidos por la luz ultravioleta— son removidos por un sistema de enzimas especiales, que hidrolizan simultáneamente dos uniones fosfodiéster, una a cada lado de la lesión.

Así, luego de reconocer la distorsión provocada por la presencia del dímero, sendas nucleasas cortan en la cadena afectada la quinta y la vigésima cuarta unión fosfodiéster, contadas a partir del dímero en dirección 3′ y 5′, respectivamente. A continuación, el segmento de 29 nucleótidos —que obviamente incluye al dímero— es separado de la cadena normal por la helicasa, que corta los puentes de hidrógeno entre las bases del segmento que hay que remover y las bases de la cadena normal. La reparación se completa cuando la ADN polimerasa β reemplaza la pieza ausente por un tramo de ADN nuevo y la ADN ligasa lo une al ADN anterior.

Si una de las nucleasas que remueven los dímeros de timina es deficiente —como ocurre en individuos homocigotos en los que el gen de la enzima se halla mutado— se produce la enfermedad llamada ***xeroderma pigmentoso***, caracterizada por una extrema sensibilidad de la piel a los rayos ultravioletas de la luz solar. Así, la exposición de la piel a esas radiaciones da lugar a una alta incidencia de cáncer cutáneo.

Fig. 17-21. Transposón con el gen de la transposasa y las secuencias de nucleótidos inversamente repetidas en sus extremos.

TRANSPOSICION DE SECUENCIAS DE ADN

17-25. Los transposones son segmentos de ADN que saltan de un lugar a otro del genoma

Durante muchos años se creyó en la existencia de una estabilidad absoluta en el ordenamiento de los nucleótidos en los cromosomas y, por lo tanto, de los propios genes. Sin embargo, para algunos tramos del ADN esto no es cierto. A fines de la década del 40, Bárbara McClintock descubrió segmentos de ADN que tienen la propiedad de pasar de un lugar a otro del genoma en cepas de maíz cuyas mazorcas presentan granos de colores diferentes. Basándose en observaciones citogenéticas propuso que los granos de color claro eran producidos por segmentos de ADN que cambian de posición e inactivan al gen del grano pigmentado. Su hipótesis fue recibida con total descreimiento y se la ignoró durante 20 años, hasta que se hicieron observaciones equivalentes en la *Escherichia coli*.

Se vio que estos segmentos de ADN transponibles —o **transposones**— son capaces de codificar una enzima denominada **transposasa**, y que en sus extremos poseen sendas secuencias de nucleótidos iguales entre sí, si se las lee en direcciones opuestas.

El número de nucleótidos en esas ***repeticiones invertidas*** es fijo para cada transposón. En el transposón hipotético ilustrado en la figura 17-21 se observa al gen de la transposasa —que es una endonucleasa de restricción (cap. 23-36)— con las secuencias de nucleótidos repetidas en sus flancos. La transposasa reconoce a esas secuencias en forma específica, las corta, e inserta el trasposón en un sitio distinto del genoma.

Las secuencias repetidas presentes en los extremos del transposón son causa y consecuencia del mecanismo por el cual los transposones son extraídos de un lugar del genoma e insertados en otro. Como ilustra la figura 17-22, durante este proceso la transposasa efectúa cortes espaciados, inserta el transposón y realiza las reparaciones necesarias en el ADN.

En la mosca *Drosophila melanogaster* la mayor parte del ADN repetitivo está representado por unas 15 familias de elementos transponibles. Existen en el genoma entre 20 y 80 copias de cada familia. Se sabe que estas secuencias tienden a saltar de un lado a otro del genoma porque en las distintas cepas de moscas los transposones se hallan localizados en los cromosomas en posiciones diferentes. Por ejemplo, en la cepa de ojos blancos se encontró un elemento transponible en medio del gen codificador de la enzima que determina el color rojo del ojo. La mayoría de las mutaciones espontáneas en la *Dro-*

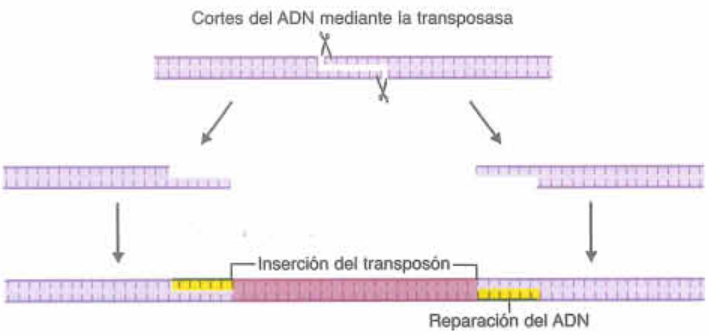


Fig. 17-22. Cortes espaciados en el ADN efectuados por la transposasa. Obsérvese la inserción del transposón y la reparación del ADN.

sophila son causadas por transposones que saltan dentro de un mismo gen.

En los vertebrados la mayoría de los transposones tienen gran similitud con el ARN de los retrovirus. Las semejanzas son tan amplias que los retrovirus pueden ser considerados transposones que aprendieron a saltar de una célula eucariota a otra. Corresponde señalar que en el ciclo de los retrovirus la información genética contenida en el ARN es copiada en sentido retrógrado (ARN→ADN) por una enzima llamada **transcriptasa inversa**, y que el ADN resultante es insertado en el genoma de la célula infectada.

En el hombre los elementos transponibles más abundantes son versiones truncadas y mutadas de retrotransposones no virales. Estos transposones corresponden a los ADN repetitivos dispersos de las familias **Alu** y **L1**, cuyas secuencias constituyen —como se mencionó en el capítulo 12-7— más de un tercio de todo el genoma. No obstante, en los cromosomas humanos sólo una pequeña cantidad de esta clase de transposones tiene la capacidad de moverse.

La mudanza de transposones puede acarrear consecuencias genéticas importantes si se producen deleciones (cap. 20-10) en regiones de ADN no esenciales flanqueadas por otros transposones similares, ya que la recombinación entre sus secuencias dentro de determinados intrones podría conducir a la aparición de genes nuevos. Otro mecanismo capaz de crear genes nuevos deriva de la transposición de exones, pues la combinación de sectores funcionales de dos genes preexistentes podría llevar a la formación de un tercer gen.

Lo mencionado en el párrafo anterior sugiere que la flexibilidad genómica introducida por los elementos transponibles ha sido fundamental para la evolución. No obstante, la mayoría de los genes nuevos han aparecido por el mecanismo de **duplicación genética** (cap. 20-10) seguido por una mutación en la segunda copia del gen. Eso es lo que ha ocurrido con los genes de las globinas α y β, los cuales se formaron a partir de un gen ancestral común.

17-26. Las duplicaciones genéticas suelen producir seudogenes

Muchos de los genes duplicados no se convirtieron en genes nuevos sino en los llamados **seudogenes**, que son incapaces de generar ARN. Puesto que no sufren ningún tipo de presión selectiva, estos seudogenes —relativamente frecuentes en el genoma de los mamíferos— acumulan mutaciones, lo que puede convertirlos en genes funcionales.

17-27. Los seudogenes procesados se originan por la transcripción inversa de moléculas de ARN

El genoma contiene también seudogenes que no surgen por duplicación genética sino a partir de ARN que fueron copiados a ADN por la transcriptasa inversa e insertados en el genoma. Estos segmentos de ADN —que se conocen como **seudogenes procesados**— se encuentran normalmente en las células de todos los mamíferos. Están flanqueados por secuencias repetidas de ADN similares a las descritas en los transposones y podrían ser "marcas" dejadas en el genoma por algunos virus portadores de ARN (retrovirus). La inactividad funcional de los seudogenes se debe a que carecen de secuencias reguladoras. Por otra parte, se han descubierto seudogenes procesados cuyas composiciones son muy parecidas a las de los genes de las inmunoglobulinas, las globinas y la tubulina β.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

BIBLIOGRAFIA

Autexier C. and Greider C.W. (1996) Telomerase and cancer: revisiting the hypothesis. TIBS 21:387.

Bramhill D. and Kornberg A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. Cell 54:915.

Broers J.L., Ramaekers F.C., Bonne G., Yaou R.B., Hutchison C.J. (2006) Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. Physiol Rev 86:967.

Calos M. and Miller J. (1980) Transposable elements. Cell 20:579.

Cao K., Blair C., Faddah D.A. et al. (2011) Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. J. Clin. Invest. 121:2833.

Chakalova L., Debrand E., Mitchel J.A. et al. (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. Nature Rev. Genet. 61:669.

Chan S.R. and Blackburn E.H. (2004) Telomeres and telomerase. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 359:109.

Chong J.P.J., Thömmes P. and Blow J.J. (1996) The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. TIBS 21:102.

Chuang T.C., Moshir S., Garini Y. et al. (2004) The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. BMC Biol 2:12.

Dechat T., Pfleghaar K., Sengupta K. et al. (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. Genes Dev 22:832.

Dillin A. and Rine J. (1998) Roles for ORC in M phase and S phase. Science 279:1733.

Dillingham M.S. (2006) Replicative helicases: a staircase with a twist. Curr. Biol. 16:R844.

Drake J.W. (1991) Spontaneous mutation. Annu. Rev. Genet. 25:125.

Edmondson D.G. and Roth S.Y. (1996) Chromatin and transcription. FASEB J. 10:1173.

Gierl A. and Frey M. (1991) Eukaryotic transposable elements with short terminal inverted repeats. Curr. Opin. Genet. Dev. 2:698.

Greider C.W. and Blackburn E.H. (1996) Telomeres, telomerase and cancer. Sci. Am. 274 (2):80.

Grossman L., Caron P.R., Mazur S.J. and Oh E.Y. (1988) Repair of DNA-containing pyrimidine dimers. FASEB J. 2:2629.

Groth A., Rocha W. and Almouzni G. (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. Cell 128:721.

Harley C.B. and Villeponteau B. (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:249.

Harrison J.C. and Haber J.E. (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. Annu. Rev. Genet. 40:209.

Huberman J.A. and Tsai A. (1973) Direction of DNA replication in mammalian cells. J. Mol. Biol. 75:5.

Indian C. and O'Donnel M. (2006) The replication clamp–loading machine at work in the three domains of life. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7:751.

Jackson V. (1988) Deposition of newly synthesized histones: hybrid nucleosomes are not tandemly arranged on daughter DNA strands. Biochemistry 27:2109.

Karlseder J., Smogorzewska A. and de Lange T. (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 295:2446.

Kolodner R.D. (1995) Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. TIBS 20:397.

Lange T. (1998) Telomeres and senescence: Ending the debate. Science 279:334.

Lange T. (2001) Telomere capping: One strand fits all. Science 292:1075.

Laskey R.A., Fairman M.P. and Blow J.J. (1989) S phase of the cell cycle. Science 246:609.

Leffell D.J. and Brash D.E. (1996) Sunligth and skin cancer. Sci. Am. 275 (1):38.

Li R., Hannon G.J., Beach D. and Stillman B. (1996) Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. Curr. Biol. 6:189.

Lingner J., Cooper J. and Cech T.P. (1995) Telomerase and DNA end replication: No longer a lagging strand problem? Science 269:1533.

Lingner J. et al. (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. Science 276:561.

Loeb L.A. (1985) Apurinic sites as mutagenic intermediates. Cell 40:483.

Lohman T.M. (1993) Helicase-catalyzed DNA unwinding. J. Biol. Chem. 268:2269.

Marx J. (1994) New link found between p53 and RNA repair. Science 266:1321.

Marx J. (1995) How DNA replication originates. Science 270:1585.

Muzi-Falconi M., Brown G.W. and Kelly T.J. (1996) DNA replication: controlling initiation during the cell cycle. Curr. Biol. 6:229.

O'Donnell M. and Kuriyan J. (2005) Clamp loaders and replication initiation. Curr. Opin. Struct. Biol. 16:35.

Prelich G. and Stillman B. (1988) Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 replication in vitro requires PCNA. Cell 53:117.

Robinson N.P. and Bell S.D. (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. FEBS 272:3757.

Romanowski P. et al. (1996) The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. Curr. Biol. 6:1416.

Sancar A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair. Science 266:1954.

Sancar A., Lindsey-Boltz L.A. et al. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu. Rev. Biochem. 73:39.

Sancar A. and Sancar G.B. (1988) DNA repair enzymes. Annu. Rev. Biochem. 57:29.

Smogorzewska A. and de Lange T. (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. Annu. Rev. Biochem. 73:177.

Seeberg E., Lars E. and Bjorås M. (1995) The base excision repair pathway. TIBS 20:391.

Sharma A. and Mondragon A. (1995) DNA topoisomerases. Curr. Opin. Struc. Biol. 5:39.

Sharp P.A. (1983) Conversion of RNA to DNA in mammals: Alu-like elements and pseudogenes. Nature 301:471.

Shinohara A. and Ogawa T. (1995) Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. TIBS 20:387.

Stillman B. (1996) Cell cycle control of DNA replication. Science 274:1659.

Wang J.C. (1991) DNA topoisomerases: why so many? J. Biol. Chem. 266:533.

Wevrick R. and Buchwald M. (1993) Mammalian DNA-repair genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 3:470.

18 Mitosis
Control del ciclo celular

MITOSIS

18-1. Un individuo adulto está formado por unas 10^{13} células

La capacidad de reproducirse es una propiedad fundamental de la célula. Se puede tener una idea de la magnitud de la reproducción celular si se considera que un individuo adulto está formado por billones de células (10^{13}), todas derivadas de una sola, el cigoto. La multiplicación celular sigue siendo notable aun en un ser adulto que ha dejado de crecer. Un ejemplo llamativo lo dan los eritrocitos, cuya vida media es de sólo 120 días. Así, el organismo debe producir unos 2,5 millones de eritrocitos por segundo para mantener su número relativamente constante. Esa reproducción celular debe ser regulada de manera perfecta para que la formación de nuevas células compense las pérdidas y se mantenga el equilibrio.

18-2. En el ciclo celular se intercalan períodos de interfase con divisiones celulares

Como adelantáramos en el capítulo 17-1, las células pasan por un ciclo que comprende dos períodos fundamentales: la interfase y la división celular. Esta última tiene lugar por mitosis o por meiosis. A causa de los profundos cambios que el microscopio óptico permitía observar, el período de división constituyó durante muchos años el punto de interés primordial para los citólogos, ya que la interfase fue considerada como una etapa de "reposo", a pesar de ser el período en el que ocurren las funciones más importantes del ciclo celular, tanto en el núcleo como en el citoplasma. La mayoría de las células pasan la parte más extensa de su vida en interfase, durante la cual —si se van a dividir— se duplican todos sus componentes. Debe señalarse que algunos tipos celulares diferenciados se dividen rara vez, y que después del nacimiento las células nerviosas —salvo escasísimas excepciones— no se dividen. Por lo tanto, en las neuronas el período de interfase se extiende a lo largo de toda la vida del individuo.

El ciclo celular puede ser considerado como una compleja serie de fenómenos que culminan cuando el material celular duplicado se distribuye en las células hijas. La división celular es sólo la fase final, microscópicamente visible, de cambios previos a nivel molecular. Así, antes que la célula se divi-

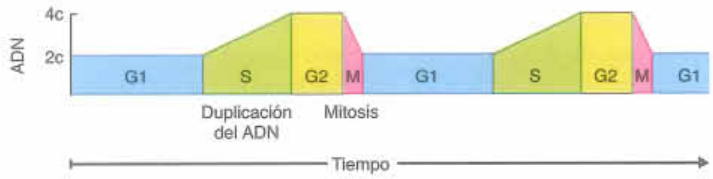


Fig. 18-1. Cambios en el contenido del ADN nuclear durante las fases del ciclo vital de la célula. La letra *c* representa la cantidad de ADN contenida en un juego haploide de 23 cromosomas. *2c*, contenido doble de ADN. *4c*, contenido cuádruple de ADN.

da por mitosis, sus principales componentes ya se han duplicado. En este aspecto, la división celular representa la separación final de las unidades moleculares y estructurales previamente duplicadas.

18-3. La interfase comprende los períodos G1, S y G2

El uso de métodos citoquímicos brindó los primeros indicios de que la duplicación del ADN ocurre durante la interfase. Más tarde, la radioautografía con timidina marcada permitió determinar el período exacto en que se produce la duplicación del ADN, y demostró que la síntesis tiene lugar solamente durante un tramo limitado de la interfase, denominado fase S (por *síntesis de ADN*), que es precedido y seguido, respectivamente, por las fases G1 y G2 (por *gap*, intervalo), en las que no hay síntesis de ADN. Esto llevó a dividir el ciclo celular en cuatro fases sucesivas: G1, S, G2 y M (por *mitosis*) (fig. 17-1). G2 es el tiempo que transcurre entre el final de la síntesis del ADN y el comienzo de la mitosis.

Como muestra la figura 18-1, durante la fase G2 la célula contiene el doble (4c) de la cantidad de ADN presente en la célula diploide original (2c). Después de la mitosis las células hijas ingresan en la fase G1 y recuperan el contenido de ADN de las células diploides (2c).

18-4. El período G1 es el más variable del ciclo celular

La duración del ciclo varía mucho de un tipo celular a otro. En una célula cultivada de mamífero, con un tiempo de vida generacional de 16 horas, la fase G1 dura 5 horas; la fase S, 7 horas; la fase G2, 3 horas, y la fase M, 1 hora (fig. 18-2). Los períodos S, G2 y M son relativamente constantes en la mayoría de los tipos celulares. El más variable es el período G1, que puede durar días, meses o años. Las células que no se dividen (como las nerviosas o las del músculo esquelético), o que se dividen poco (como los linfocitos), se hallan en el período G1, que en estos casos se denomina G0 porque las células se retiran del ciclo celular.

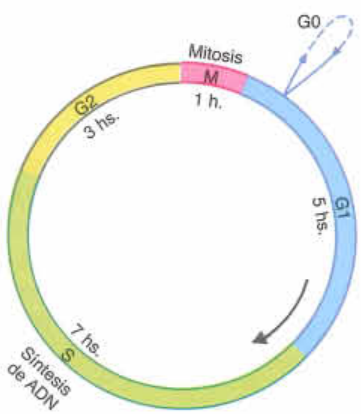


Fig. 18-2. Ciclo celular, en el que se indica la duración de cada fase en una célula que se divide cada 16 horas.

18-5. Descripción general de la mitosis

Dijimos que la división celular comprende una serie de fenómenos por los cuales los materiales primero se duplican y luego se reparten en proporciones virtualmente iguales entre las dos células hijas. Todos los componentes de la célula —no sólo los que están relacionados con la transmisión de la herencia genética— se duplican antes de que la célula se divida por mitosis. En los capítulos respectivos se analizaron los mecanismos por los cuales se produce un aumento en el número de algunos organoides y el incremento de volumen de otros. La mitosis comprende también el problema de la continuidad de los cromosomas como entidades capaces de autodupli-

carse y de mantener sus características morfológicas a través de las sucesivas divisiones, de ahí que resulte necesario repasar los procesos vinculados con la replicación del ADN y los que dan lugar al enrollamiento de la cromatina.

Entre los procesos que tienen lugar en el citoplasma, el más llamativo es la formación del **huso mitótico**, que se organiza cada vez que la célula comienza a dividirse y desaparece al final de la división. Veremos que es un armazón estructural compuesto por microtúbulos que controlan la posición de los cromosomas y su reparto entre las células hijas. Los microtúbulos del huso nacen de un par de centrosomas, los cuales se forman durante la interfase al duplicarse el centrosoma ilustrado en la figura 5-23 (sección 18-12).

Como corolario de la mitosis se produce la partición del citoplasma y su distribución equitativa en las células hijas, fenómeno conocido con el nombre de citocinesis.

En general, los procesos que dan lugar a las mitosis son semejantes en todas las células del organismo. Las figuras 1-12 y 18-3 muestran las diferentes etapas de la mitosis, que son consideradas como fases de un ciclo que comienza al final de la interfase —o período intermitótico— y termina al comenzar la interfase siguiente. Las etapas en que se divide la mitosis son: **profase**, **prometafase**, **metafase**, **anafase** y **telofase**. A partir de la penúltima comienza la **citocinesis** —o separación de los dos territorios citoplasmáticos hijos—, que culmina cuando concluye la telofase.

En primer término, las distintas fases de la mitosis serán consideradas de una manera eminentemente descriptiva, con el fin de dar una idea global de los fenómenos que ocurren tanto en el núcleo como en el citoplasma. En secciones ulteriores se pasará revista a la ultraestructura y a la bioquímica de algunos de esos fenómenos.

18-6. Durante la profase las cromátidas se condensan, se forma el huso mitótico y se desintegra el nucléolo

La detección de los cromosomas como filamentos delgados indica el comienzo de la ***profase***. El término mitosis (del griego *mitos*, filamento) expresa este fenómeno, que se vuelve más evidente a medida que los cromosomas se siguen condensando por el enrollamiento de la cromatina. Como vimos en el capítulo 17-1, después de la duplicación del ADN en la fase S cada cromosoma está compuesto por dos moléculas de ADN denominadas **cromátidas** (fig. 17-2). A medida que avanza la profase, las cromátidas se hacen más cortas y gruesas. Además, los centrómeros (o constricciones primarias) se vuelven claramente visibles debido a que se les han asociado dos placas proteicas llamadas **cinetocoros**, que dan hacia los lados externos de las cromátidas (fig. 18-6). Al principio los cromosomas están distribuidos homogéneamente en el nucleoplasma, pero luego se aproximan a la carioteca, de modo que aparece un espacio vacío en el centro del núcleo. Este movimiento centrífugo de los cromosomas indica que se aproxima el momento de la desintegración de la envoltura nuclear. También pueden observarse las constricciones secundarias de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. Otro cambio es la reducción del tamaño del nucléolo, hasta su desaparición.

Debido a la desintegración del citoesqueleto, la célula tiende a hacerse es-

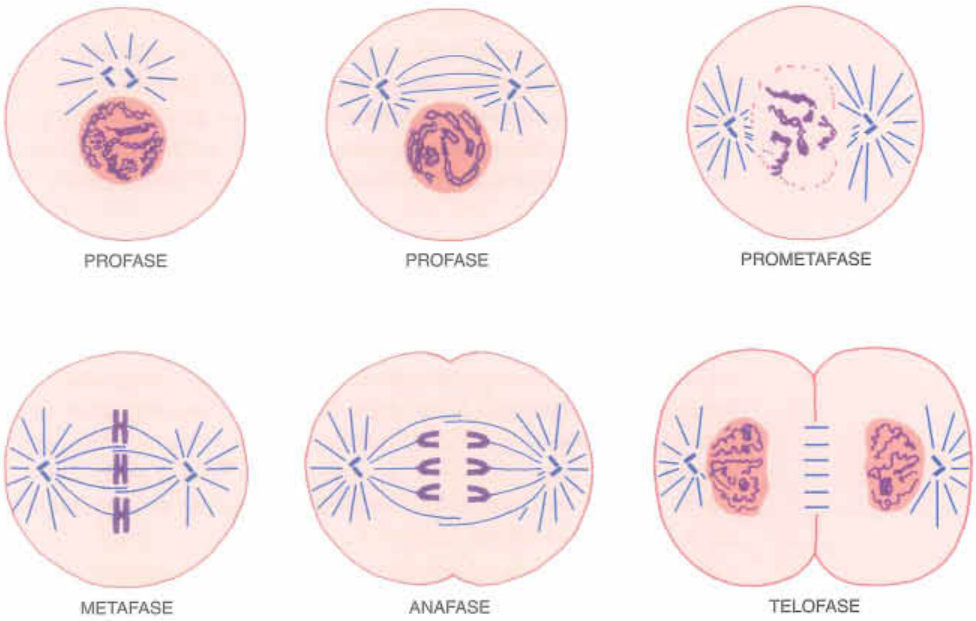


Fig. 18-3. Esquema general de las fases de la mitosis.

férica; además pierde sus contactos con las células vecinas o con la matriz extracelular. Simultáneamente, el RE y el complejo de Golgi se fragmentan en vesículas pequeñas. Pero lo que más se destaca en el citoplasma es la formación del **huso mitótico**. Se trata de conjuntos de haces de microtúbulos que surgen de ambos centrosomas, los cuales se alejan recíprocamente pues se dirigen a los polos opuestos de la célula.

Más adelante veremos cómo —y en qué fases del ciclo celular— la célula forma el segundo centrosoma. Como se señaló en el capítulo 5-5, el centrosoma está integrado por la matriz centrosómica —que es el lugar de nacimiento de los microtúbulos— y un par de centríolos. Desde los centrosomas las fibras del huso irradian en todas las direcciones, pero las más llamativas son aquellas que se extienden hacia el centro de la célula, donde dan lugar a asociaciones de importancia funcional.

18-7. Durante la prometafase se desintegra la carioteca

Lleva el nombre de ***prometafase*** la transición entre la profase y la metafase. Se trata de un período muy corto, durante el cual la carioteca se desintegra y los cromosomas —algo más condensados— quedan en aparente desorden. Los centrosomas arriban a los polos de las células y —ya desaparecida la carioteca— las **fibras del huso** invaden el área que ocupaba el núcleo. Por sus extremos libres algunas fibras del huso se conectan con los cinetocoros de los cromosomas; estas fibras se denominan **cinetocóricas**. Otras fibras —llamadas **polares**— se extienden más allá del plano ecuatorial de la célula y sus tramos distales se entrecruzan con los provenientes del polo opuesto. Existe un tercer tipo de fibras surgidas de los centrosomas, las fibras del **áster**; son más cortas, irradian en todas direcciones y sus extremos se hallan aparentemente libres (fig. 18-4A).

Volviendo a las fibras cinetocóricas, es lógico pensar que, al tratar de co-

nectarse con los cromosomas, no se unan a los cinetocoros todas al mismo tiempo. Así, considerando a un cromosoma en particular, al unírsele primero las fibras que vienen de uno de los polos y después las provenientes del polo opuesto, presenta durante un tiempo movimientos de alejamiento y de aproximación respecto del plano ecuatorial de la célula. Finalmente, cuando ambas fuerzas se equilibran, el cromosoma se mantiene en ese plano.

18-8. Durante la metafase los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula

En la ***metafase***, los cromosomas —que han llegado a su máxima condensación— aparecen ordenados en el ecuador de la célula. Se acomodan de modo tal que las dos placas cinetocóricas de cada centrómero quedan orientadas hacia los polos opuestos de la célula, "mirando" a los respectivos centrosomas (fig. 18-4A).

18-9. Durante la anafase los cromosomas hijos se dirigen hacia los polos de la célula

Durante la ***anafase*** se produce la partición de las cohesinas de los centrómeros (cap. 17-1), hecho que ocurre casi simultáneamente en todos los cromosomas (fig. 18-3). De inmediato las cromátidas —o **cromosomas hijos**— se separan y comienzan a migrar hacia los polos, traccionadas por las fibras cinetocóricas del huso. Los cromosomas suelen adoptar la forma de una V. Los brazos de la V en los cromosomas metacéntricos tienen la misma longi-

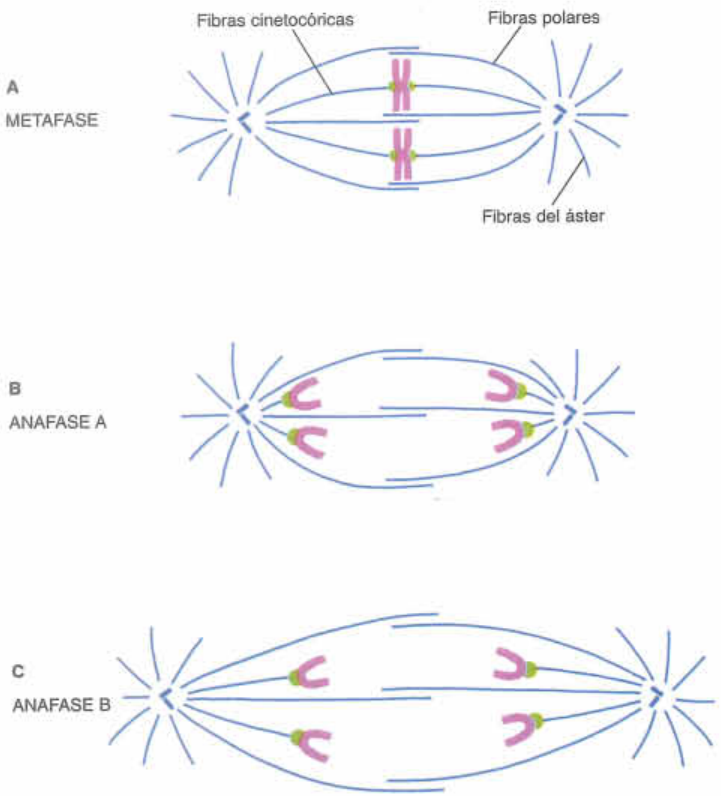


Fig. 18-4. Fibras del huso mitótico y su comportamiento en la metafase (**A**), la anafase A (**B**) y la anafase B (**C**) (véase sección 18-17).

tud, pero en los submetacéntricos y en los acrocéntricos son desiguales (cap. 12-16). El centrómero, en el ángulo de la V, precede a las partes restantes del cromosoma en su "carrera" hacia el centrosoma. Como es obvio, en este proceso los microtúbulos de las fibras cinetocóricas se acortan progresivamente (fig. 18-4B). En cambio, aumenta la longitud de las fibras polares debido al mutuo distanciamiento de los polos de la célula, que por ello pierde su forma esférica y adquiere un aspecto ovoide (figs. 18-3 y 18-4C).

18-10. Durante la telofase se forman los núcleos hijos

La llegada de los cromosomas hijos a los polos —con la consiguiente desaparición de las fibras cinetocóricas del huso— señala el inicio de la ***telofase***. La célula se ha alargado un poco más, de modo que las fibras polares exhiben una mayor longitud, comparadas con las de la anafase. Los cromosomas comienzan a desenrollarse y se muestran cada vez menos condensados; así, en cierta forma este proceso representa la recapitulación de lo sucedido en la profase, pero en sentido inverso.

Al tiempo que los cromosomas se convierten en fibras de cromatina desenrolladas, éstas son rodeadas por partes del RE, las cuales se integran hasta formar las envolturas nucleares definitivas en torno de los dos núcleos hijos. Además, en los núcleos reaparecen los respectivos nucléolos.

18-11. La citocinesis reparte el citoplasma entre las células hijas

La ***citocinesis***, es decir, la partición del citoplasma, se inicia en la anafase. El citoplasma se constriñe en la región ecuatorial por la formación de un surco en la superficie, que se profundiza a medida que la célula se divide. Tanto las fibras del áster como las polares se reducen hasta desaparecer. Sólo sobreviven los tramos de las fibras polares localizados en la zona ecuatorial de la célula; componen el llamado **cuerpo intermedio**, que analizaremos más adelante (fig. 18-7). Como es obvio, estas fibras quedan perpendiculares al surco que divide al citoplasma.

Finalmente se restablece el citoesqueleto, por lo cual las células hijas adquieren la forma original de la célula predecesora y se conectan con otras células (si pertenecen a un epitelio) y a la matriz extracelular. Dirigidos por el citoesqueleto, los componentes citoplasmáticos (mitocondrias, RE, complejo de Golgi, etc.) se distribuyen en las células hijas como estaban en la célula madre.

18-12. El ciclo de los centrosomas comprende la duplicación de los centríolos y de la matriz centrosómica

Los **centrosomas** comienzan a duplicarse durante la interfase, más concretamente, al final de la fase G1 o al comienzo de la fase S. Para duplicarse, los dos **centríolos** del diplosoma se separan y cerca de cada uno aparece un **procentríolo**, que se dispone en ángulo recto con respecto al centríolo preexistente (fig. 18-5). Los procentríolos crecen lentamente durante las fases S y G2 y alcanzan su tamaño definitivo al comienzo de la profase, que posee dos pares de centríolos. Cada par de centríolos se halla en medio de su **matriz centrosómica**, proveniente de la matriz centrosómica original, que también se ha duplicado.

Como vemos, los centríolos no se duplican por división ni a partir de un molde. Dado que los procentríolos surgen a cierta distancia de los centríolos predecesores (no están en contacto), se estima que estos últimos actúan como inductores y que organizan el material de los primeros.

18-13. Los cinetocoros son los sitios de implantación de los microtúbulos

Como se dijo, las fibras del huso mitótico que se unen a los cromosomas se implantan en los **cinetocoros** (figs. 18-4 y 18-6). Estos están adosados al **centrómero**, es decir, al segmento más estrecho del cromosoma (constricción primaria). Así, el centrómero no es sólo el sector por el que las cromátidas hermanas se unen entre sí a través de las cohesinas (cap. 17-1), sino también el lugar donde los microtúbulos del huso se conectan —cinetocoros mediante— con los cromosomas. En los capítulos 12-7 y 12-11 se vio que la mayor parte del centrómero contiene ADN repetitivo satélite y que se halla en una zona de heterocromatina constitutiva.

Los cinetocoros están situados en los lados del centrómero que dan a las cromátidas, de modo que en la metafase —que es cuando se ven mejor— "miran" hacia sus respectivos polos celulares. En los cortes transversales el microscopio electrónico revela que cada cinetocoro es una estructura trilaminar compuesta por dos capas densas de unos 50 nm de espesor, y una capa intermedia, más clara, de 25 nm de espesor (fig. 18-6).

La cara externa del cinetocoro es convexa y en ella se implantan entre 30 y 40 microtúbulos. En cambio, su cara interna es plana y está en contacto con la cromatina del centrómero. Se han observado fibras de cromatina surgidas de este último que ingresan en la capa densa interna del cinetocoro y que luego de doblarse sobre sí mismas retornan al cromosoma a fin de mantener a los cinetocoros ligados al centrómero. Volviendo a la cara externa, los extremos de los 30 a 40 microtúbulos que se anclan en su superficie están asociados con proteínas motoras de las familias de la dineína y la quinesina (cap. 5-8) (fig. 18-6).

Más adelante se analizará el papel que desempeñan los cinetocoros durante la separación de los cromosomas hijos en la anafase.

La ***esclerodermia*** es una enfermedad humana que genera autoanticuerpos llamados **CREST** (por las iniciales de *calcinosis*, *Raynaud's phenomenon*, *esophageal dysphagia*, *sclerodactyly* y *telangiectasia*), los cuales reaccionan

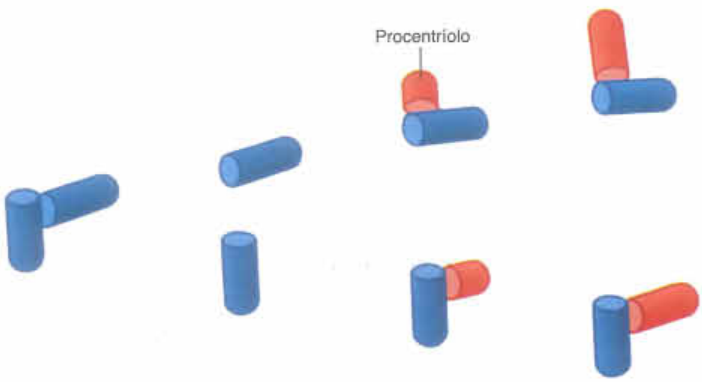


Fig. 18-5. Duplicación de los centríolos antes del comienzo de la mitosis.

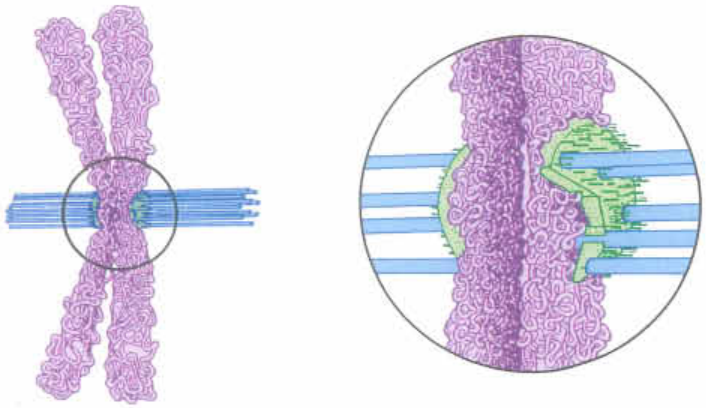


Fig. 18-6. Estructura del centrómero en un cromosoma metafásico. Se observan los cinetocoros, en los que se implantan las fibras cinetocóricas del huso mitótico.

contra los cinetocoros. Esto ha permitido usarlos como marcadores para reconocer y estudiar a las proteínas cinetocóricas, especialmente las motoras de las familias de la quinesina y la dineína y las que estabilizan la unión del cinetocoro con la cromatina del centrómero.

Los autoanticuerpos CREST permitieron detectar a las proteínas cinetocóricas en todas las etapas del ciclo celular, aunque aparecen asociadas a los centrómeros a partir de la fase S, que es cuando empezarían a formarse los cinetocoros.

Con la ayuda de los autoanticuerpos CREST se localizaron los genes que codifican a las proteínas cinetocóricas y se determinaron sus secuencias. Se hallan en los propios centrómeros, entre el ADN repetitivo satélite que los caracteriza. Así, además de estar compuestos por ese ADN —el cual posee la **secuencia alfoide** mencionada en el capítulo 12-7—, los centrómeros contienen los genes de las proteínas cinetocóricas.

En los cinetocoros de los cromosomas humanos se han identificado, entre otras, seis proteínas, denominadas CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-D, CENP-E y CENP-F (por *centromere protein*). La **CENP-A** y la **CENP-B** se hallan asociadas a las fibras de cromatina que ingresan en la capa densa interna del cinetocoro. Más aún, la CENP-A no es otra que la histona H3 —algo modificada— de los nucleosomas de esas fibras. La **CENP-C** se encuentra en la capa densa interna del cinetocoro, entre las fibras de cromatina que la unen al centrómero. Respecto de la **CENP-D**, no se conocen su localización ni sus funciones. Finalmente, tanto la **CENP-E** como la **CENP-F** se hallan en la capa densa externa del cinetocoro con el fin de reforzar el anclaje de los microtúbulos del huso mitótico. Puesto que la CENP-E es la quinesina mencionada anteriormente, se encuentra también en la cara externa del cinetocoro.

18-14. Los microtúbulos del huso mitótico son estructuras dinámicas

En el citosol existe normalmente una abundante cantidad de tubulinas libres que se hallan en equilibrio dinámico con las tubulinas de los microtúbulos (cap. 5-7). Cuando la célula comienza la profase se despolimerizan los microtúbulos interfásicos y se construyen los del **huso mitótico**. Así, en la mitosis sólo existen microtúbulos pertenecientes al huso. En la anafase, con el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos, el huso comienza a despolimerizarse, por lo menos sus fibras cinetocóricas. En la telofase lo ha-

cen las fibras del áster y las polares, aunque estas últimas no en toda su extensión, pues persisten los tramos pertenecientes al cuerpo intermedio (sección 18-11). Finalmente, antes de completarse la citocinesis, comienzan a reaparecer los primeros microtúbulos interfásicos.

En el capítulo 5-6 se vio que los dos extremos de los microtúbulos muestran polimerizaciones y despolimerizaciones diferentes, ya que en el extremo [+] el crecimiento y el acortamiento son más rápidos que en el extremo [–] (fig. 5-6). A diferencia de los citoplasmáticos, en los microtúbulos mitóticos el extremo [–] no se halla bloqueado por la matriz centrosómica, de modo que los microtúbulos del huso pueden polimerizarse y despolimerizarse también por ese extremo (cap. 5-10).

18-15. Los microtúbulos desplazan a los centrosomas en la profase, y a los cromosomas en la prometafase y la metafase

Los microtúbulos son capaces de generar fuerzas mecánicas —de empuje y de tracción— sobre los cinetocoros y, por consiguiente, sobre los cromosomas. El empuje y la tracción son consecuencia, respectivamente, del alargamiento y del acortamiento de los microtúbulos (fig. 18-4B).

Durante la profase, la migración de los centrosomas hacia los polos se debe a que son empujados por el alargamiento de los microtúbulos tendidos entre ellos. Dado que entre los tramos entrecruzados de los microtúbulos polares —en la zona ecuatorial de la célula— se ha detectado una proteína motora bipolar de la familia de las quinesinas, no se descarta que el deslizamiento de unos sobre otros en direcciones opuestas sea un mecanismo adicional usado por la célula para trasladar a los centrosomas hacia los polos. En los fibroblastos, la separación de los centrosomas se realiza a una velocidad de 0,8 a 2,4 μm por minuto.

En la prometafase, tan pronto como comienza la desintegración de la carioteca y la región del núcleo es invadida por los microtúbulos, las puntas de las fibras cinetocóricas establecen contacto con los cinetocoros y los cromosomas comienzan a movilizarse hacia el ecuador de la célula. Este traslado es consecuencia del alargamiento y el acortamiento simultáneos de los microtúbulos cinetocóricos provenientes de los polos opuestos. Durante la metafase existe una suerte de equilibrio entre las fuerzas ejercidas por los microtúbulos de ambos polos, lo cual mantiene a los cromosomas inmovilizados en el ecuador celular.

18-16. Otros tipos de fuerzas movilizan a los cromosomas en la anafase

En la anafase se rompe ese equilibrio; ello provoca la partición de los centrómeros y, por ende, la separación de las cromátidas hijas y la movilización de los nuevos cromosomas hacia los polos. Lo hacen a una velocidad de 1 μm por minuto.

La característica forma en V adoptada por los cromosomas indica que las fuerzas responsables de la tracción —como resultado del acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos— son transmitidas a los cinetocoros. Un momento antes esas fuerzas fueron suficientemente intensas como para provocar la partición de los centrómeros.

Existen dos teorías para explicar la migración de los cromosomas durante la anafase: la del equilibrio dinámico y la del deslizamiento.

La ***teoría del equilibrio dinámico*** sostiene que la despolimerización de los microtúbulos —en sus dos extremos— es la responsable exclusiva del traslado; así, la fuerza mecánica derivada del desarmado de los microtúbulos bastaría para trasladar a los cromosomas.

La ***teoría del deslizamiento***, aunque reconoce la despolimerización de los microtúbulos, considera que éstos se comportan como "rieles" sobre los cuales los cromosomas se desplazan mediante alguna proteína motora asociada a los cinetocoros.

18-17. Durante la anafase, el alargamiento de la célula agrega un factor adicional para la migración de los cromosomas hacia los polos

En la anafase, el traslado de los cromosomas incluye dos procesos distintos pero concurrentes, los cuales permiten dividir este período en dos etapas, la anafase A y la anafase B. Durante la **anafase A** el traslado de los cromosomas hacia los polos corresponde a los movimientos descritos en la sección anterior, vinculados con los microtúbulos cinetocóricos. En cambio, en la **anafase B**, el mutuo alejamiento de los dos conjuntos cromosómicos se produce a consecuencia del alargamiento que experimenta la célula, por lo que está vinculado al crecimiento de los microtúbulos de las fibras polares (fig. 18-4C). En la sección 18-15 se vio que entre los tramos entrecruzados de estas fibras existe una proteína motora bipolar del tipo de la quinesina, por lo que es posible que el deslizamiento de algunos microtúbulos polares sobre otros constituya un recurso complementario para alejar a los cromosomas de la región ecuatorial de la célula.

18-18. La carioteca se reconstituye durante la telofase

En el capítulo 12 describimos la carioteca, con sus dos membranas, los componentes de los poros y la lámina nuclear.

Al finalizar la profase, la **lámina nuclear** se desarma debido a que sus laminofilamentos se despolimerizan porque se fosforilan algunas serinas de las laminas. Además, la **carioteca** se desintegra y da lugar a vesículas (como ocurre con el RE), y los **complejos del poro** quedan ligados a ellas.

Opuestamente, al alcanzar la célula la telofase, en las células hijas las láminas nucleares se reconstruyen debido a que los laminofilamentos se repolimerizan a causa de la desfosforilación de las laminas. Simultáneamente, las vesículas derivadas de la desintegración de la envoltura nuclear se unen entre sí y reconstruyen las cariotecas de los núcleos de las células hijas, con sus respectivos complejos del poro.

18-19. Durante la mitosis no se sintetiza ARN y disminuye la producción de proteínas

La **síntesis de ARN** (o transcripción del ADN) se detiene en la mitosis. Así, la velocidad de dicha síntesis declina rápidamente en la profase tardía y desaparece en la metafase y en la anafase. Es que, como ocurre en la interfase con los sectores heterocromáticos, el ADN no puede ser transcripto porque se halla muy compactado (cap. 14-12).

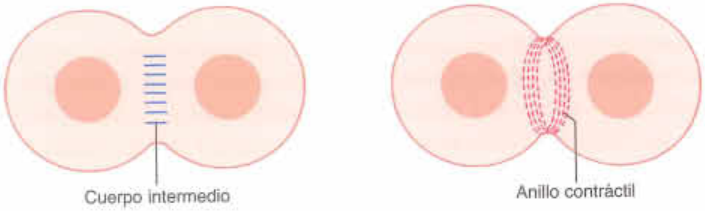


Fig. 18-7. Citocinesis. El cuerpo intermedio y el anillo contráctil se han dibujado por separado, aunque ambas estructuras aparecen simultáneamente.

Por su lado, la **síntesis proteica** —a partir de moléculas de ARN formadas con anterioridad— disminuye drásticamente durante la mitosis, casi al 25% de la que tiene lugar durante la interfase.

La síntesis de los ARN y de las proteínas comienza a recuperarse a partir de la telofase.

18-20. La citocinesis se genera al formarse un anillo contráctil compuesto por actina y miosina II

Aunque en la telofase los microtúbulos del huso tienden a despolimerizarse y a desaparecer, las fibras polares persisten en la zona ecuatorial de la célula, donde su cantidad aumenta. Estas fibras remanentes del huso mitótico, junto con vesículas y material denso que se les asocian, componen una estructura llamada **cuerpo intermedio** (figs. 18-7 y 18-8).

La citocinesis —o clivaje celular— deriva de la formación de un surco en el ecuador de la célula, que aparece en la segunda mitad de la anafase (fig. 18-3). En la telofase, el **surco ecuatorial** se profundiza hasta alcanzar al cuerpo intermedio, lo que indica que la partición del citoplasma está por concluir (fig. 18-8).

El desarrollo del surco ecuatorial es el resultado de la formación de un **anillo contráctil** en la corteza de la célula (fig. 18-7). Consiste en un haz de unos 20 filamentos de actina circulares situados por debajo de la membrana plasmática, perpendiculares a los microtúbulos del cuerpo intermedio. Esos filamentos se deslizan unos sobre otros en direcciones opuestas por la presencia de proteínas motoras del tipo de la miosina II (cap. 5-31). Dado que el anillo no aumenta de grosor a medida que se reduce su diámetro, se cree que los filamentos de actina van perdiendo monómeros por despolimerización.

El lugar donde se forma el anillo contráctil sería determinado —al finalizar la anafase— por los microtúbulos del áster, cuyos extremos libres se trasladarían al ecuador de la célula e inducirían la polimerización de monómeros de actina debajo de la membrana plasmática.

LA MITOSIS EN LAS CELULAS VEGETALES

18-21. La mitosis en las células vegetales es algo diferente de la observada en las células animales

Existen diferencias entre las divisiones de las células somáticas de los animales y los vegetales, aunque la mayoría de los procesos que se registran en esas divisiones son comunes a ambas clases de células. Aquí sólo señalaremos las diferencias.

En los vegetales superiores —como las angiospermas y la mayoría de las

gimnospermas— las mitosis son **anastrales**, es decir, carecen de centríolos y de fibras del áster (fig. 18-9). Esto es lo que indujo a sospechar que los centríolos no son indispensables para la formación de los microtúbulos.

Para dar lugar a la citocinesis, la región intermedia del huso mitótico se transforma en el **fragmentoplasto**, que equivale al cuerpo intermedio de las células animales (fig. 18-9).

El fragmentoplasto comienza a formarse al promediar la anafase. En el

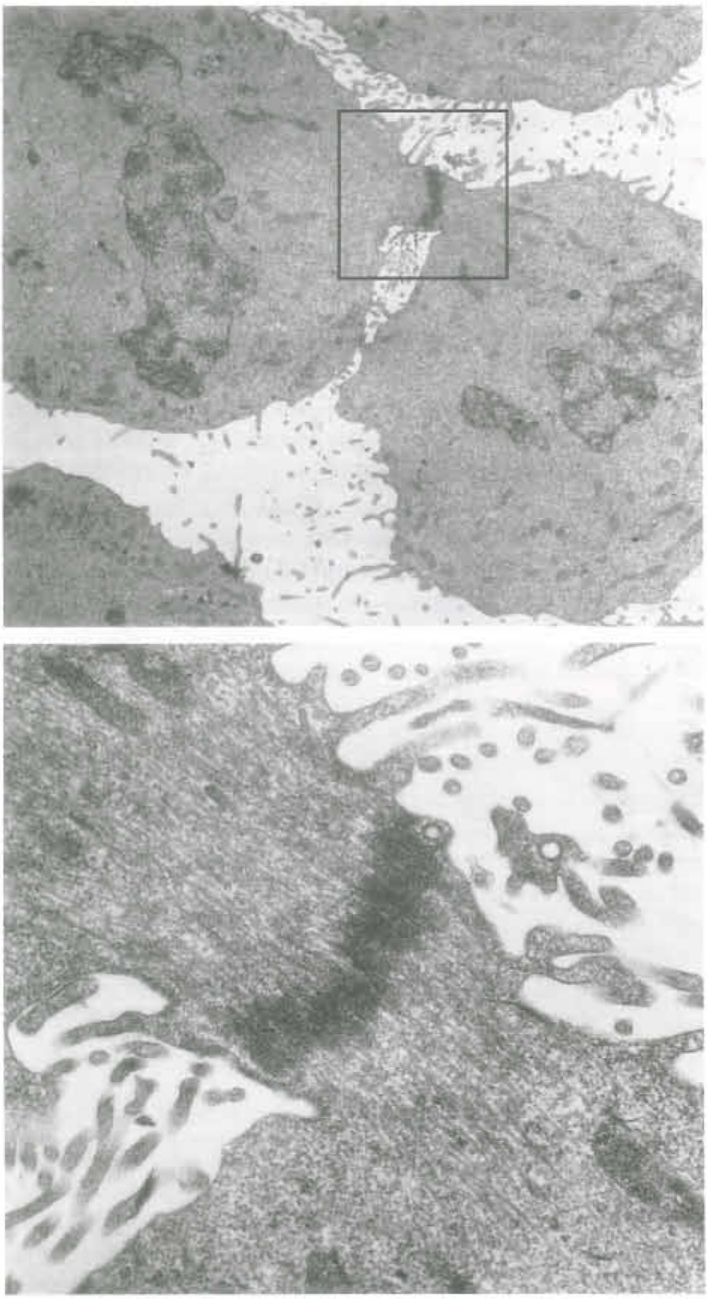


Fig. 18-8. Micrografía electrónica de una célula al final de la citocinesis. Las futuras células hijas se encuentran todavía unidas por un pequeño puente que contiene los microtúbulos del cuerpo intermedio, electrónicamente muy denso. 10.000× y 30.000×. (Cortesía de B. R. Brinkley.)

plano ecuatorial de la célula el microscopio electrónico permite ver que los microtúbulos de las fibras polares del huso se asocian a un material denso y a vesículas derivadas del complejo de Golgi.

Al principio el fragmentoplasto se dispone como un anillo en la periferia de la célula, pero luego, por el agregado de nuevos microtúbulos y vesículas, crece centrípetamente hasta extenderse por todo el plano ecuatorial. Las vesículas aumentan de tamaño y se fusionan entre sí. Dan lugar —en las células hijas— a membranas plasmáticas relativamente continuas, fenómeno que coincide con la transformación del fragmentoplasto en una estructura llamada **placa celular** (cap. 3-30). Esta sienta las bases para la formación de la pared celular (cap. 6-15), que es atravesada por túneles muy pequeños denominados plasmodesmos, los cuales permiten el paso de líquidos y solutos entre los citoplasmas de las células contiguas.

CONTROL DEL CICLO CELULAR

18-22. Existen mecanismos que controlan la dinámica de los ciclos celulares

Las células se reproducen para posibilitar el crecimiento corporal y para reemplazar a las que desaparecen por envejecimiento o por muerte programada (cap. 22-1). También lo hacen durante ciertas situaciones patológicas, como la reparación de heridas. Para poder reproducirse, la célula primero duplica el contenido de su núcleo y de su citoplasma y luego divide a estas estructuras en dos.

La multiplicación celular aparece al iniciarse la vida embrionaria, con la **segmentación de la célula huevo** (cap. 21-7). Dada la rapidez con que se suceden las divisiones de segmentación, solamente se duplican los materiales nucleares de esa célula (fig. 19-3). Por lo tanto, los componentes de su

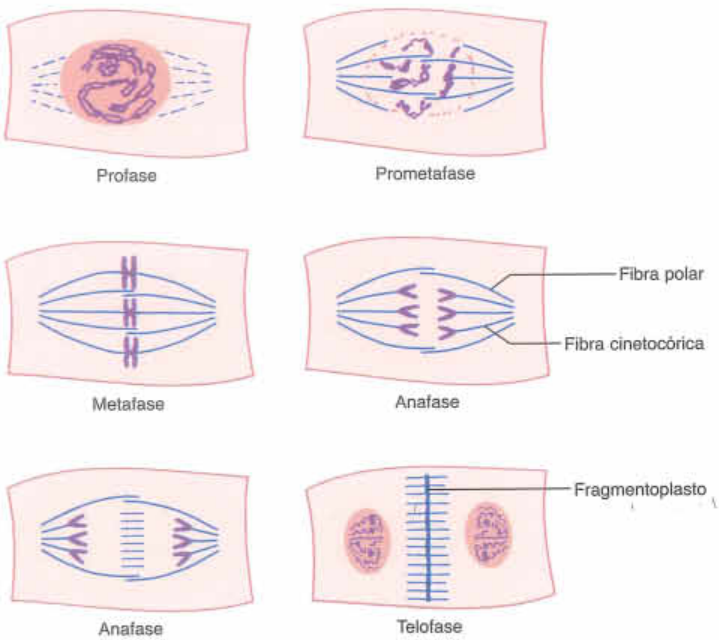


Fig. 18-9. Esquema de la mitosis en la célula vegetal. Obsérvese la falta de centríolos y de fibras del áster.

...TECA PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

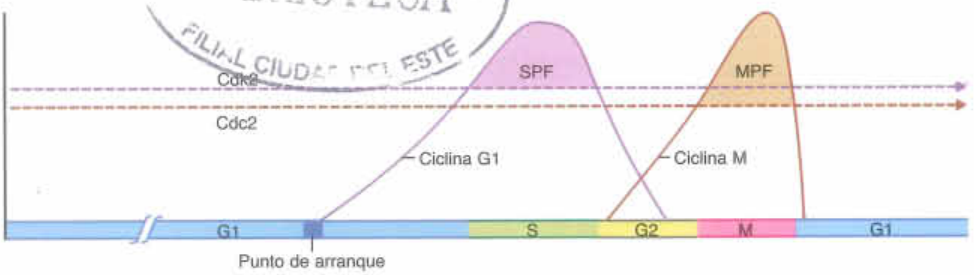


Fig. 18-10. Diagrama que ilustra los cambios de concentración de las ciclinas G1 y mitótica durante el ciclo celular. La primera se asocia con la quinasa Cdk2, con la que forma el complejo SPF. En cambio, la segunda se asocia con la quinasa Cdc2 y da lugar al complejo MPF.

enorme citoplasma se van repartiendo entre las sucesivas células hijas. Esta forma de división concluye cuando en las células del blastocisto se recupera la ***relación nucleocitoplasmática*** característica de las células somáticas (caps. 1-14 y 21-7).

En el capítulo 17 vimos que el ADN y las moléculas que lo acompañan se duplican durante la fase S del ciclo celular. La duplicación de los componentes citoplasmáticos abarca las fases G1, S y G2.

En la célula existen mecanismos especiales para coordinar los procesos de síntesis en el núcleo y en el citoplasma y determinar el inicio y la conclusión de las fases del ciclo celular. Las próximas secciones están destinadas al estudio de esos mecanismos.

18-23. En el control del ciclo celular intervienen ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

Poco antes de finalizar la ***fase G1*** —cuya duración varía en los distintos tipos celulares—, existe un momento en que la célula toma la decisión de dividirse. Recibe el nombre de **punto de arranque** o **de control G1** (fig. 18-10). Oportunamente se verá que la decisión es tomada ante la presencia de sustancias inductoras provenientes de otras células.

En el control de las divisiones celulares intervienen dos tipos de moléculas: 1) las **ciclinas**, cuyo nombre se debe a que en el curso de cada ciclo celular alternan un período de síntesis creciente seguido por otro de rápida degradación; 2) las **quinasas dependientes de ciclinas**, que al interactuar con las ciclinas fosforilan y activan a las moléculas responsables de la división celular.

Existen varias clases de ciclinas, cuyas concentraciones se elevan y descienden en diferentes momentos del ciclo celular. Las principales corresponden a dos grandes grupos: las **ciclinas G1** y las **ciclinas M**. Por su lado, en las especies superiores se han identificado dos quinasas dependientes de ciclinas, la **Cdk2** (por *cyclin-dependent protein kinase*) y la **Cdc2** (por *cell-division cycle*). No obstante, la existencia en el genoma de una numerosa familia de genes relacionados con estas quinasas indica que intervienen varias más en la regulación de los distintos pasos del ciclo celular.

18-24. La fase S se produce cuando la ciclina G1 activa a la Cdk2

Tomada la decisión de dividirse, la célula deja atrás la fase G1 e ingresa en la ***fase S***, es decir, comienza a replicar su ADN. Ello acontece cuando una **ciclina G1** activa a la quinasa **Cdk2**, la cual inicia una cadena de fosforilaciones en sucesivas proteínas intermediarias. La cadena culmina con la activación de las moléculas responsables de la replicación del ADN.

La Cdk2 se activa sólo cuando la ciclina G1 alcanza un determinado umbral de concentración, ya que éste es un requisito indispensable para que se produzca la activación (fig. 18-10). Más aún, a partir de ese momento la Cdk2 y la ciclina G1 se unen y componen un complejo proteico denominado **SPF** (por *S phase-promoting factor*) (fig. 18-11).

El SPF induce la apertura de los orígenes de replicación y activa a moléculas involucradas en la síntesis del ADN, como las ADN polimerasas, la helicasa, etc. Como se señaló en el capítulo 17-4, el SFP actúa a través del complejo **pre-RC**.

Dado que en cierto momento de la fase S la concentración de la ciclina G1 comienza a declinar, cuando cae por debajo del umbral anteriormente citado se separa de la Cdk2, con lo cual el SPF deja de existir. Las ciclinas son degradadas por proteasomas (cap. 4-6).

De las dos moléculas, la ciclina G1 es la única cuya concentración varía, ya que los niveles de la Cdk2 se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular. En cambio, la ciclina G1 comienza a sintetizarse a partir del punto de arranque, se incrementa durante gran parte de la fase S, en un momento de ésta comienza a declinar y desaparece en la fase G2 (fig. 18-10).

En una fase S normal el ADN se replica una sola vez, pues si así no fuese las células hijas tendrían un número de cromosomas mayor que el normal. El impedimento para la aparición de nuevas duplicaciones del ADN ya replicado depende del complejo proteico **ORC** (cap. 17-4). Los cuadros derivados de alteraciones en el control de este proceso se denominan ***poliploidías*** y serán analizados en el capítulo 20-8.

18-25. En la fase G2 actúan mecanismos de seguridad

La pausa impuesta por la ***fase G2*** le provee a la célula un lapso durante el cual actúan mecanismos de seguridad para controlar —antes que la célula se divida— si las moléculas de ADN han completado su replicación y, cuando corresponda, si fueron reparadas (cap. 17-20). Además, en la fase G2 se completa la duplicación de los componentes citoplasmáticos.

18-26. La fase M se produce cuando la ciclina M activa a la Cdc2

Superados tales controles, comienza la ***fase M***. El mecanismo que desencadena la mitosis es similar al que inicia la fase S, aunque con distintos protagonistas, pues en la mitosis intervienen la **Cdc2** y la **ciclina M**. La segunda comienza a sintetizarse a partir de la fase G2, antes que desaparezca la ciclina G1 (fig. 18-10). Cuando la ciclina alcanza un determinado umbral de concentración, se une a la Cdc2 y ambas moléculas componen un complejo denominado **MPF** (por *M phase-promoting factor*) (figs. 18-10 y 18-11).

A continuación, activada por la ciclina M, la Cdc2 fosforila —directamente o a través de quinasas intermediarias— a diversas proteínas citosólicas y nucleares, en particular a las que regulan la estabilidad de los filamentos del citoesqueleto, a las que componen los laminofilamentos de la lámina nuclear, a las histonas H1, etc. Veamos algunas consecuencias de esas fosforilaciones:

1) Se desintegra la red de filamentos de actina, por lo que la célula pierde contacto con las células vecinas (o con la matriz extracelular) y se vuelve esférica.

2) Se desarman los microtúbulos citoplasmáticos y se forman los del huso mitótico.

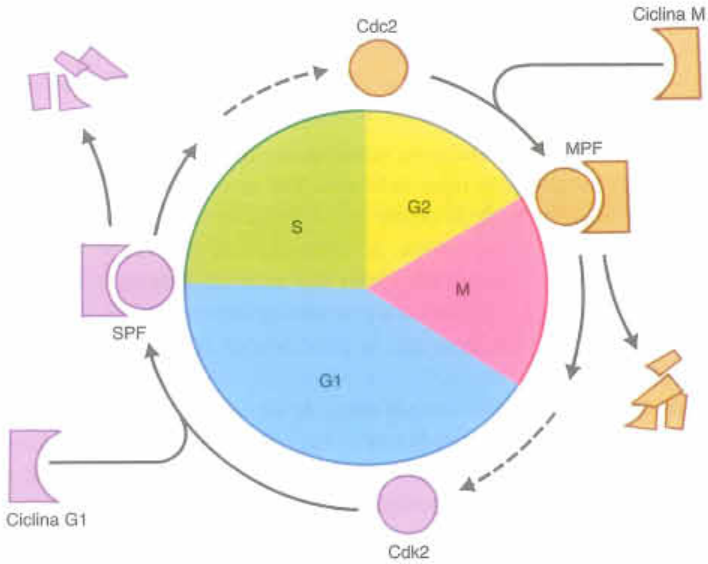


Fig. 18-11. Dibujo que muestra la formación de los complejos SPF y MPF durante el ciclo celular.

3) Se disgrega la lámina nuclear, y con ella la carioteca.

4) Se modifica la asociación de la histona H1 con el ADN, lo que aumenta el enrollamiento de la cromatina y la compactación de los cromosomas.

Cuando la división celular concluye, estos y otros fenómenos se revierten debido a que las proteínas que los producen se desfosforilan a causa de la desactivación de la Cdc2. A su vez, la Cdc2 se desactiva porque la concentración de la ciclina M cae a un nivel inferior del que se necesita para que ambas moléculas se mantengan unidas formando el MPF.

La disociación del MPF ocurre al comienzo de la anafase. Tiene lugar únicamente si todos los cromosomas arribaron al plano ecuatorial de la célula y todos los cinetocoros se ligaron a los microtúbulos cinetocóricos del huso mitótico, lo cual asegura la segregación normal de los cromosomas hijos y su desplazamiento hacia los respectivos polos celulares.

Se ha comprobado que los cinetocoros que no se ligan a los microtúbulos del huso producen una señal que impide la caída de la ciclina M —es decir, la disociación del MPF— para que la célula detenga la mitosis antes de que comience la anafase.

En condiciones normales esa señal no se genera y la célula entra en anafase. Lo hace después de formar un complejo proteico llamado **ciclosoma** o **APC** (por *anaphase-promoting complex*), que promueve la degradación de la ciclina M y de las cohesinas que unen a las cromátidas entre sí (cap. 17-1 y sección 18-9).

18-27. Si la fase G1 es muy prolongada pasa a llamarse G0

Las células hijas derivadas de la mitosis ingresan en la ***fase G1*** de la interfase y, si son inducidas por ciertos factores (sección 18-28), repiten el ciclo seguido por la célula predecesora y vuelven a dividirse. En caso contrario, la fase G1 se prolonga —a veces indefinidamente— y la célula "se retira" del ciclo, por lo que la fase G1 pasa a llamarse ***fase G0*** (fig. 18-2).

Una situación diametralmente opuesta se da en las divisiones celulares de la segmentación de la célula huevo, en las cuales la fase G1 prácticamente no

existe. Dado que la fase G2 tampoco existe, la interfase se reduce a la fase S, lo cual explica su corta duración (sección 18-22).

18-28. Diversas sustancias inducen la proliferación celular

El ritmo con que las células se reproducen depende de diversos factores, que varían en los distintos tipos celulares. Por ejemplo, las células que surgen de la segmentación de la célula huevo parecen tener un mecanismo intrínseco que, en forma automática, desencadena una división apenas concluye la precedente. En cambio, las células que no se dividen permanecen en la fase G0 porque en sus citoplasmas no existen ciclinas ni quinasas dependientes de ciclinas, probablemente por la presencia de factores que inhiben su producción.

En las células restantes —cuyo ritmo de reproducción varía de acuerdo con el carácter particular de cada una— las mitosis dependen de **sustancias inductoras** provenientes del exterior, sea de células vecinas (secreción paracrina) o de grupos celulares distantes (secreción endocrina). En el capítulo 11-2 se señaló que estos inductores actúan sobre receptores específicos. Las sustancias que inducen la proliferación celular lo hacen en el momento del ciclo llamado punto de arranque. El cambio que provocan en el receptor promueve la síntesis de la ciclina G1.

Entre las moléculas inductoras de la multiplicación celular se encuentran:

1) La ***somatomedina***, que estimula la proliferación de las células cartilaginosas durante el crecimiento óseo. Esta sustancia es sintetizada en el hígado, en respuesta a la hormona de crecimiento hipofisaria.

2) Varios inductores llamados ***factores de crecimiento***, en su mayoría secretados por células que se localizan en la vecindad de las células blanco (secreción paracrina). Así, los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), epidérmico (EGF) y derivado de las plaquetas (PDGF) estimulan la proliferación de muchos tipos celulares, no sólo los sugeridos por sus nombres. Otros ejercen acciones más específicas; se trata de los factores de crecimiento de los hepatocitos (HGF), de los nervios (NGF) y del endotelio vascular (VEGF). En el capítulo 11-12 se describieron los receptores celulares para estos factores y el modo como son conducidas sus señales en el interior de las células.

3) Varias clases de ***factores hemopoyéticos***, cada uno responsable de la proliferación de un tipo particular de célula sanguínea. Así, la interleuquina 2 (IL-2) estimula la multiplicación de los linfocitos T; el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) hace lo propio con los elementos progenitores de estas células, etc. Finalmente, la eritropoyetina, originada en los riñones, es el factor hemopoyético encargado de estimular la proliferación de los glóbulos rojos en la médula ósea. La IL-2 y el GM-CSF son producidos por células vecinas a las células blanco (secreción paracrina), mientras que la eritropoyetina llega a la médula ósea a través de la sangre (secreción endocrina).

La secreción de las sustancias inductoras es regulada por mecanismos que tienden a mantener un número adecuado y más o menos constante de células de cada uno de los tipos celulares. Por ejemplo, la cantidad de eritropoyetina secretada por los riñones es proporcional a la destrucción de los gló-

bulos rojos en la sangre y aumenta a niveles considerables en caso de hemorragias. Una situación similar se da con la ablación parcial del hígado, en que se secretan grandes cantidades de HGF; este factor estimula la multiplicación de los hepatocitos próximos a la herida, que cesa cuando el órgano recupera su tamaño normal.

18-29. La proteína P53 controla el estado del ADN antes de que la célula ingrese en la fase S

Antes de ingresar en la fase S la célula controla el estado de sus moléculas de ADN. El control es ejercido por una proteína citoplasmática llamada **P53** (por su masa molecular, de *53 kDa*), que es sintetizada por la propia célula en respuesta a la aparición de alteraciones en su ADN. El gen **p53** que la codifica pertenece a una categoría de genes conocidos como supresores de tumores, llamados así por causas que veremos más adelante.

La P53 se comporta como un factor de transcripción que promueve la expresión de los genes de otras proteínas reguladoras —llamadas **P21** y **P16**—, que tienen por misión bloquear la actividad de la Cdk2. Dado que este efecto se opone al de las ciclinas G1, la célula no replica sus moléculas de ADN y permanece en la fase G1. Finalmente, si se comprueba que el daño en el ADN es peligroso para las futuras células hijas, la proteína P53 vuelve a actuar, pero ahora para provocar la muerte de la célula y con ella la desaparición del ADN dañado (cap. 22-6).

En lo que atañe a la proteína P21, si no resultara suficiente para bloquear a la Cdk2, le queda otro recurso para impedir la mitosis: en el comienzo de la replicación del ADN se une a la abrazadera deslizante de PCNA (cap. 17-7) y anula su función.

En la célula existen otras proteínas reguladoras de la proliferación celular, como la proteína **Rb** (la sigla Rb deriva del tumor de la retina llamado retinoblastoma). Es codificada por el gen **rb**, que también es supresor de tumores. La proteína Rb inhibe la proliferación celular cuando está fosforilada. Lo hace mediante el bloqueo de los genes de ciertas proteínas necesarias para la replicación.

18-30. Muchos tipos de cánceres se producen por la acumulación de alteraciones genéticas

Si bien existen múltiples causas ambientales involucradas en la aparición de cuadros cancerígenos, es sabido que en algunas familias se presentan ciertos tipos de cáncer con una incidencia mayor que la habitual, lo cual ha llevado a la investigación de las posibles bases genéticas de la enfermedad. Se han descubierto dos clases de genes ligados al cáncer, los **protooncogenes** y los **genes supresores de tumores**. La alteración de los primeros produce un incremento de la proliferación celular, mientras que la falla de los segundos lleva a la pérdida de los mecanismos normales que detienen la proliferación.

El cáncer no se genera a partir de células normales que se transforman explosivamente en células malignas. Por el contrario, surge al cabo de sucesivas generaciones de células que pasan por estados precancerosos cada vez más acentuados. Esos estados son consecuencia de la suma progresiva de mutaciones en protooncogenes y en genes supresores de tumores —que activan

a los primeros e inactivan a los segundos—, lo cual al cabo de un tiempo instala la enfermedad en las células descendientes.

Por añadidura, en las células cancerosas los cromosomas a menudo lucen rotos o con partes translocadas, y algunos se encuentran varias veces repetidos. Al parecer estos cambios no son consecuencia del desarrollo tumoral, sino que se hallan asociados a sus causas.

18-31. Los protooncogenes son genes normales, y los oncogenes, sus versiones defectuosas

Los **protooncogenes** son genes normales que codifican proteínas implicadas en el control de la proliferación celular y la muerte celular. Hasta el momento se han caracterizado aproximadamente cien, entre ellos los que codifican a las siguientes proteínas (los nombres de los genes figuran entre paréntesis):

1) Los factores de crecimiento PDGF (sis), EGF (cap. 11-12) y GM-CSF (sección 18-28).

2) Los receptores de los factores de crecimiento PDGF, EGF (erb-B) (cap. 11-12) y GM-CSF (fms).

3) La proteína Ras (ras), que es fosforilada por receptores con actividad de tirosina quinasa (cap. 11-12).

4) La serina-treonina quinasa Raf (raf), que es activada por la proteína Ras (cap. 11-12).

5) Las tirosina quinasas Src (src), Fes (fes) y Abl (abl).

6) El receptor de la hormona tiroidea (erb-A), localizado en el citosol (cap. 11-6).

7) Varias proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción, por ejemplo, las proteínas Myc (myc), Myb (myb), Fos (fos) y Jun (jun). Los productos de los genes que activan promueven la proliferación celular.

8) La proteína Bcl-2 (bcl-2), incluida en esta categoría no porque se halla implicada en el control de la proliferación sino en la supervivencia de las células (cap. 22-4).

La denominación de protooncogenes se debe a que, como resultado de mutaciones, pueden dar lugar a sus versiones defectuosas: los **oncogenes**. Estos se diferencian de los normales porque se transcriben desmesuradamente y generan cantidades excesivas de sus productos, o porque su transcripción origina productos aberrantes. En ambos casos traen como consecuencia un aumento descontrolado de la proliferación celular o una disminución de la muerte celular (capítulo 22).

Diversos virus son portadores de oncogenes. Se cree que ingresaron en el genoma viral como protooncogenes, cuando —en alguna remota ocasión— esos virus infectaron células de animales y los "sustrajeron"; una vez instalados en el genoma viral, los protooncogenes se transformaron en oncogenes. Respalda esta hipótesis el hecho de que en los virus los oncogenes no cumplen ninguna función. En la actualidad, cuando esos virus infectan a diversas especies animales, los oncogenes que les transfieren son causa de cuadros cancerígenos (por ejemplo, el sarcoma de Rous en el pollo, provocado por el oncogén src).

Si bien varios cánceres que afectan a la especie humana se hallan asocia-

dos con infecciones virales (por ejemplo, el virus de la hepatitis B aumenta la incidencia de carcinoma hepático, el papilomavirus incrementa la aparición de cáncer de cuello uterino, el virus del sida hace lo propio con el sarcoma de Kaposi, etc.), afortunadamente ninguno de los cánceres humanos es generado por oncogenes transferidos por virus. La presencia de oncogenes en las células cancerosas humanas se debe a la aparición de defectos en los protooncogenes propios, al alterarse el ADN por mutaciones génicas o por aberraciones cromosómicas estructurales (caps. 17-17 y 20-10).

Es suficiente ***un solo alelo*** alterado de un protooncogén para transformar a una célula normal en una célula cancerosa o que puede llegar a serlo. Veamos algunos ejemplos de alteraciones de protooncogenes en la especie humana.

Se han observado mutaciones en el protooncogén **ras** en muchas clases de tumores, y se comprobó que ese gen suele ser blanco de diversos carcinógenos, lo cual confirma el papel de su análogo alterado —el oncogén ras— en el desarrollo del cáncer. Como consecuencia de la sobreexpresión del oncogén ras se generan grandes cantidades de proteína Ras, que activa a otras moléculas involucradas en la proliferación celular (cap. 11-12).

En la leucemia mieloidea crónica, el protooncogén **abl**, presente normalmente en el cromosoma 9, es translocado al cromosoma 22, donde se fusiona con el gen **bcr** (cap. 20-17). La unión da lugar a una tirosina quinasa Abl híbrida, cuya actividad es considerablemente mayor que la de la Abl normal.

Finalmente, en algunos neuroblastomas el protooncogén **myc** suele estar amplificado unas 300 veces.

18-32. Los genes supresores de tumores previenen la multiplicación anormal de las células

Mientras que los productos de los protooncogenes promueven el crecimiento celular, los derivados de los **genes supresores de tumores** inhiben la reproducción excesiva de las células. Así, los defectos de los genes supresores de tumores —a raíz de mutaciones génicas o de aberraciones cromosómicas— dejan a la célula sin esos frenos naturales. Por ende, si la célula adquiere otros defectos genéticos —ahora estimulantes de la actividad mitótica— se genera un cuadro cancerígeno.

Dado que los genes supresores de tumores son recesivos, el defecto se manifiesta cuando se alteran ***los dos alelos*** del gen (cap. 20-3).

Hasta el momento se han caracterizado unos 10 genes supresores de tumores. Entre ellos se encuentran:

El gen **p53**, situado en el brazo corto del cromosoma 17. La mutación de sus dos alelos —con la consiguiente falta de proteína P53— explica la génesis de muchos tumores. Las células sin proteína P53 no controlan el estado de sus moléculas de ADN antes de la replicación (sección 18-29). Ello provoca la acumulación de alteraciones genéticas en las sucesivas generaciones celulares —por ejemplo, en los protooncogenes—, lo cual propicia la aparición de muchos tipos de cánceres.

Algo similar ocurre cuando se alteran los dos alelos del gen **rb**, perteneciente al brazo largo del cromosoma 13. En este caso, debido a la falta de proteína Rb, se produce un tumor maligno en la retina de los niños, aunque también se han detectado defectos del gen rb en cánceres de muchos otros tejidos.

Los defectos en los dos alelos son variados, ya que pueden encontrarse ambos mutados, ambos ausentes (por deleción), uno mutado y uno ausente, etcétera.

Otros genes supresores de tumores son: 1) el gen **mcc** (por *mutated in colon carcinoma*), perteneciente al cromosoma 5; 2) el gen **dcc** (por *deleted in colon carcinoma*), ubicado en el cromosoma 18; 3) el gen **apc** (por *adenomatous polyposis of the colon*), localizado en el cromosoma 5 (no emparentado con el complejo proteico APC visto en la sección 18-26), y 4) el gen **wt** (por *Wilms' kidney tumor*), residente en el cromosoma 11.

BIBLIOGRAFIA

Albertson R., Riggs B. and Sullivan W. (2005) Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. Trends Cell Biol. 15:92.

Bailly E. and Bornens M. (1992) Centrosome and cell division. Nature 355:300.

Bielas J.H., Loeb K.R., Rubin B.P. et al. (2006) Human cancers express as mutator phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:18238.

Bishop J.M. (1981) Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. Cell 23:5.

Bishop J.M. (1982) Oncogenes. Sci. Am. 246 (3):69.

Bishop J.M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. Cell 64:235.

Burgess D.R. and Chang F. (2005) Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. Trends Cell Biol. 15:156.

Cantley L.C. et al. (1991) Oncogenes and signal transduction. Cell 64:281.

Cao L.G. and Wang Y.L. (1990) Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments. J. Cell Biol. 111: 1905.

Cavenee W.K. and White R. (1995) The genetic basis of cancer. Sci. Am. 272 (3):50.

Cobrinik D. et al. (1992) The retinoblastome protein and the regulation of cell cycling. TIBS 17:312.

Cross F., Roberts J. and Weintraub H. (1989) Simple and complex cell cycles. Annu. Rev. Cell Biol. 5:341.

Cross M. and Dexter T.M. (1991) Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. Cell 64:271.

Culotta E. and Koshland D.E. Jr. (1993) p53 sweeps through cancer research. Science 262:1958.

Dong Y., Vanden Beldt K.J., Meng X. et al. (2002) The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. Nature Cell Biol. 9:516.

Dunphy W.G., Brizuela L., Beach D. and Newport J. (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MFP, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell 54:433.

Dupree P. (1996) Cell division forms a pattern. Curr. Biol. 6:683.

Easton D.F., Pooley K.A., Dunning A.M. et al. (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibililty loci. Nature 447:1087.

Fang F. and Newport J.W. (1991) Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 protein in higher eukaryotes. Cell 66:731.

Gerace L. and Blobel G. (1988) The nuclear lamina is reversibly depolymerized during mitosis. Cell 19:277.

Glotzer M., Murray A.W and Kirschner M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature 349:132.

Hirano T. (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. Curr. Biol. 15:R265.

Johnston L.H. (1990) Periodic events in the cell cycle. Curr. Opin. Cell Biol. 2:274.

Jurgens G. (2005) Plant cytokinesis: fission by fusion. Trends Cell Biol. 15:277.

Kaufmann W.K. and Paules R.S. (1996) DNA damage and cell cycle checkpoints. FASEB J. 10:238.

Kirschner M. (1992) The cell cycle then and now. TIBS 17:281.

Levine A.J., Hu W. and Feng Z. (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? Cell Death Differ. 13:1027.

Li R., Hannon G.J., Beach D. and Stillman B. (1996) Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. Curr. Biol. 6:189.

Liao H., Li G. and Yen T.J. (1994) Mitotic regulation of microtubule cross-linking activity of CENP-E kinetochore protein. Science 265:394.

Lowe S.W., Cepero E. and Evan G. (2004) Intrinsic tumour suppression. Nature 432:307.

Lucocq J.M. and Warren G. (1987) Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells. EMBO J. 6:3239.

Mann D.J. and Jones N.C. (1995) E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest. Curr. Biol. 6:474.

Mazia D. (1987) The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. Int. Rev. Cytol. 100:49.

McIntosh J.R. and McDonald K.L. (1989) The mitotic spindle. Sci. Am. 261 (4):48.

McNeill P.A. and Berns M.W. (1981) Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells. J. Cell Biol. 88:543.

Morgan D.O. (2007) The Cell Cycle: Principles of Control. New Science Press, London.

Murray A.W. and Szostak J.W. (1985) Chromosome segregation in mitosis and meiosis. Annu. Rev. Cell Biol. 1:289.

Murray A.W. and Kirschner M.W. (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature 339:275.

Murray A.W., Solomon M.J. and Kirschner M.W. (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature 339:280.

Murray A.W. and Kirschner M.W. (1991) What controls the cell cycle? Sci. Am. 264 (3):56.

Murray A. and Hunt T. (1993) The Cell Cycle. Oxford University Press, Oxford.

Musacchio A and Saimon E.D. (2007) The spindle-assembly

checkpoint in space and time. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8:379.
Muzi-Falconi M., Brown G. and Kelly T. (1996) DNA replication: controlling initiation during the cell cycle. Curr. Biol. 6:229.
Nicklas R.B. (1997) How cells get the right chromosomes. Science 275:632.
Nigg E.A. (1993) Targets of cyclin-dependent protein kinases. Curr. Opin. Cell Biol. 5:187.
Nigg E.A. (2007) Centrosome duplication: of rules and license. Trends Cell Biol. 17:215.
Nislow C., Lombillo V.A., Kuriyama R. and McIntosh J.R. (1992) A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles. Nature 359:543.
Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature 344:503.
Perry M.E. and Levine A.J. (1993) Tumor suppressor p53 and the cell cycle. Curr. Opin. Genet. Dev. 3:50.
Peter M. et al. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. Cell 61:591.
Peters J.M. (2006) The anaphase promoting complex/cyoclosome: a rmachine designed to destroy. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7:644.
Pluta A.F. et al. (1995) The centromere: Hub of chromosomal activities. Science 270:1591.
Ridley A.J. (1995) Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:24.
Rosenblatt J., Gu Y. and Morgan D.O. (1992) Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:2824.
Rowley J.D. (1983) Human oncogene locations and chromosome aberrations. Nature 301:290.
Sherr C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. Cell 73:1059.
Straight A.F. (1997) Cell cycle: Checkpoint proteins and kinetochores. Curr. Biol. 7:R613.
Sunkel C.E. and Coelho P. (1995) The elusive centromere: sequence divergence and functional conservation. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:756.
Theriot J.A. and Satterwhite L.L. (1997). New wrinkles in cytokinesis. Nature 385:388.
Vafa O. and Sullivan F. (1997) Chromatin containing CENP-A and α-satellite DNA is a major component of the inner kinetochore plate. Curr. Biol. 7:897.
Vallee R. (1990) Dynein and the kinetochore. Nature 345:206.
Vogelstein B. and Kinzler K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. Nature Med. 10:789.
Weinberg R.A. (1990) The retinoblastoma gene and cell growth control. Trends Biochem. Sci. 15:199.
Weinberg R.A. (1991) Tumor suppressor genes. Science 254:1138.
Weinberg R.A. (2007) The Biology of Cancer. Garland Science, New York.
Winey M. (1996) Genome stability: keeping the centrosome cycle on track. Curr. Biol. 6:962.
Yu H. et al. (1996) Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. Curr. Biol. 6:455.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

19 Meiosis
Fecundación

MEIOSIS

19-1. La meiosis y la reproducción sexual

La meiosis es un tipo especial de división celular, exclusiva de los organismos que se reproducen sexualmente. En muchos protozoos, algas y hongos, la reproducción es asexual, es decir, por división celular simple o mitosis. En este caso todos los descendientes tienen una herencia que proviene de un solo antecesor. En cambio, en la mayoría de los organismos multicelulares (animales y vegetales) la reproducción se realiza por medio de gametos o células sexuales generados por meiosis —**espermatozoides** y **óvulos** en los animales—, los cuales se unen por un proceso denominado **fecundación**. Ello da origen al **cigoto** o **célula huevo**, que porta el material hereditario de los dos progenitores y se reproduce por mitosis hasta formar un nuevo individuo multicelular.

Las figuras 1-12 y 19-1 muestran los fenómenos básicos de la **meiosis** (del griego *meioum*, disminuir). El genoma humano posee 46 cromosomas (44 + XY en el varón; 44 + XX en la mujer). Si la división fuese por mitosis, cada gameto tendría 46 cromosomas y el cigoto 92. Dado que esto se repetiría en las sucesivas generaciones, el número de cromosomas se duplicaría de generación en generación. La meiosis es el mecanismo usado por los organismos para evitar que ello suceda. Así, mediante dos divisiones celulares consecutivas las células sexuales reducen a la mitad el número de sus cromosomas, con generación de gametos haploides (cuatro espermatozoides en el varón; un óvulo y cuerpos polares en la mujer). Los procesos que llevan a la producción de gametos —llamados **espermatogénesis** y **ovogénesis**— tienen lugar en las gónadas, es decir, en los testículos y en los ovarios.

Debe advertirse que para entender los aspectos más importantes de la citogenética (capítulo 20) el lector debe tener una clara comprensión de la meiosis, tanto de su dinámica estructural como de su bioquímica.

En este capítulo describiremos la meiosis como un tipo especial de división celular. En ella se producen: 1) la reducción del número de cromosomas a la mitad; 2) la recombinación genética, es decir, el intercambio de segmentos cromosómicos, y 3) la segregación al azar de los cromosomas homólogos paternos y maternos.

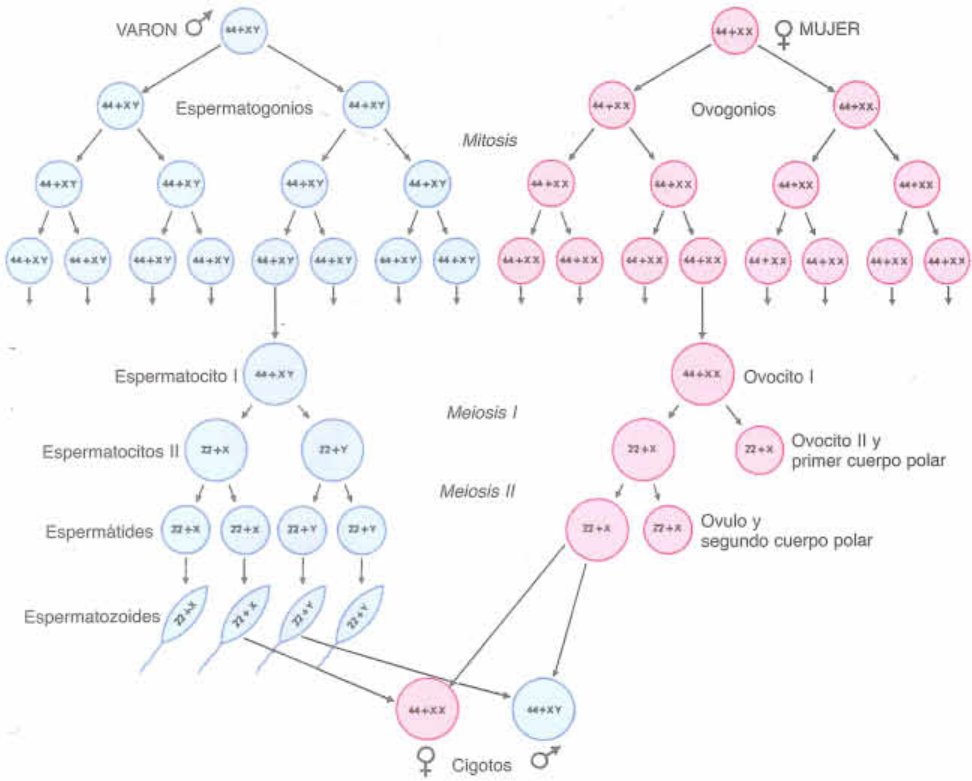


Fig. 19-1. Esquema de la espermatogénesis y la ovogénesis en la especie humana. Se observan tres divisiones mitóticas sucesivas por parte de los espermatogonios y los ovogonios, las respectivas divisiones meióticas y la fecundación del óvulo (*22+X*) por el espermatozoide (*22+X* o *22+Y*).

Se define como **cromosomas homólogos** a los dos cromosomas virtualmente idénticos —uno aportado por el padre y el otro por la madre— que conviven en las células diploides. Debido a que en las células somáticas humanas existen dos juegos haploides de 23 pares de cromosomas cada uno —un juego haploide aportado por el espermatozoide y otro aportado por el ovocito—, se dice que poseen 23 pares de homólogos (fig. 12-15).

19-2. Diferencias entre la mitosis y la meiosis

Muchos de los fenómenos que ocurren en la mitosis suceden también en la meiosis. Por ejemplo, la secuencia de cambios en el núcleo y en el citoplasma, los períodos de profase, prometafase, metafase, anafase y telofase, la formación del huso mitótico, la condensación de los cromosomas, la evolución de los centrómeros, etc. Existen, sin embargo, diferencias esenciales:

1) La mitosis tiene lugar en las células somáticas, y la meiosis en las células sexuales.

2) En la mitosis cada replicación del ADN es seguida por una división celular; en consecuencia, las células hijas presentan la misma cantidad de ADN que la célula madre y un número diploide de cromosomas. En cambio, en la meiosis cada replicación del ADN es seguida por dos divisiones celulares —la **meiosis I** y la **meiosis II**—, de las cuales resultan cuatro células haploides que contienen la mitad del ADN (figs. 1-12 y 19-2).

3) En la mitosis la síntesis del ADN se produce durante la fase S, que es seguida por la fase G2. En la meiosis, la fase S es más larga y la G2 es corta o falta (fig. 19-3).

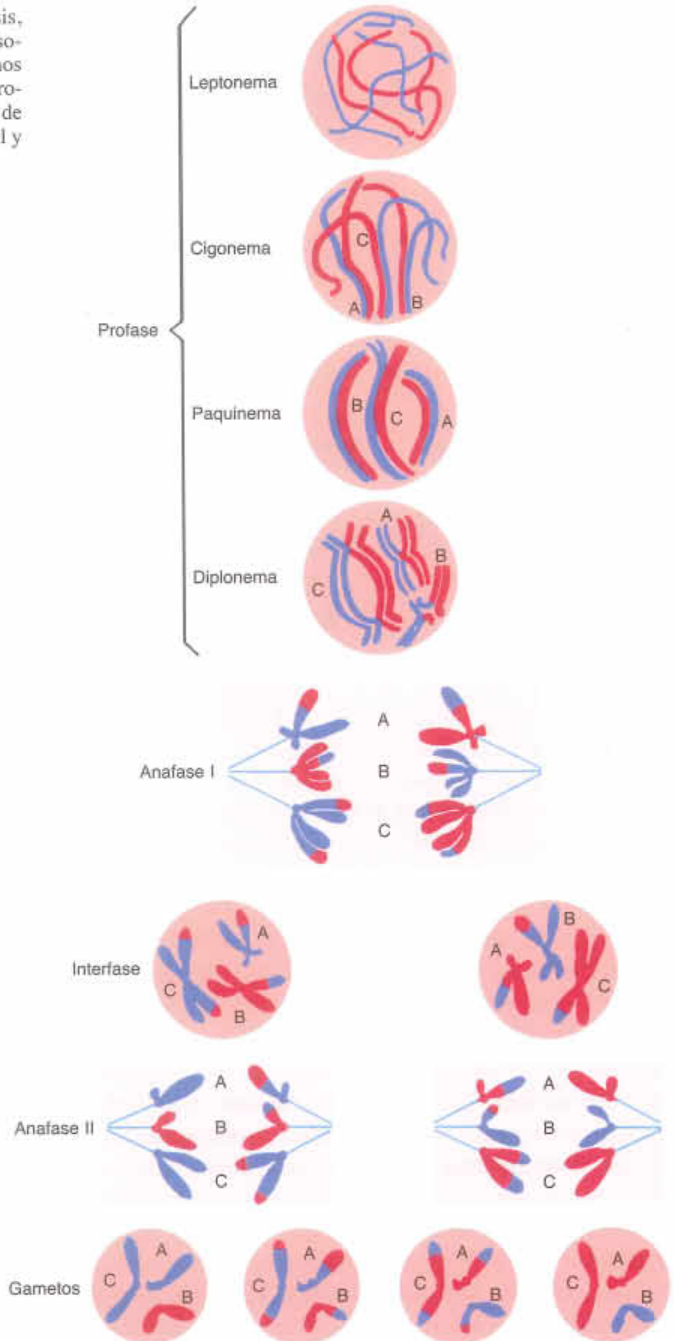


Fig. 19-2. Esquema general de la meiosis, que ilustra el apareamiento de los cromosomas homólogos, el intercambio de algunos de sus segmentos y la segregación de los cromosomas. Los cromosomas procedentes de cada progenitor están representados en azul y en rojo, respectivamente.

4) En la mitosis cada cromosoma evoluciona en forma independiente. En la meiosis —durante la primera de sus divisiones— los cromosomas homólogos se relacionan entre sí (se aparean) e intercambian partes de sus moléculas (se recombinan) (figs. 1-12 y 19-2).

5) La duración de la mitosis es corta (1 hora aproximadamente), mientras

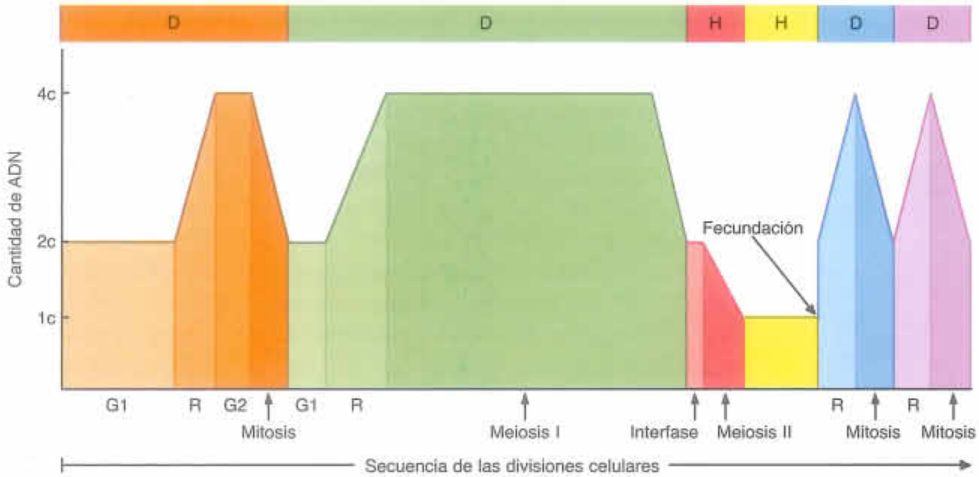


Fig. 19-3. Células germinativas diploides (*D*) y haploides (*H*) y cambios en el contenido del ADN nuclear durante las mitosis que preceden a las divisiones meióticas, en el transcurso de estas últimas, en los gametos, en el cigoto y en las dos primeras divisiones de segmentación. Espermatogonios y ovogonios (*marrón*). Espermatocitos I y ovocitos I (*amarillo*). Espermatocitos II y ovocitos II (*azul*). Espermatozoides (*rojo*) (el óvulo no existe en la especie humana). Cigoto (*verde*). Células embrionarias derivadas de la primera división de segmentación (*violeta*). Fase G1 del ciclo celular (*G1*). Fase G2 (*G2*). Fase S o duplicación del ADN (*S*). Contenido simple de ADN (*1c*). Contenido doble de ADN (*2c*). Contenido cuádruple de ADN (*4c*).

que la meiosis es bastante larga (en el varón insume 24 días y en la mujer varios años).

6) Otra diferencia fundamental es que en la mitosis el material genético permanece constante en las sucesivas generaciones de células hijas (a menos que ocurran mutaciones génicas o aberraciones cromosómicas), mientras que la meiosis genera una gran variabilidad genética.

19-3. Descripción general de la meiosis

Como se observa en la figura 19-1, las divisiones meióticas comienzan después de varias divisiones mitóticas de los **espermatogonios** y los **ovogonios**, es decir, de las células germinativas menos diferenciadas del testículo y el ovario.

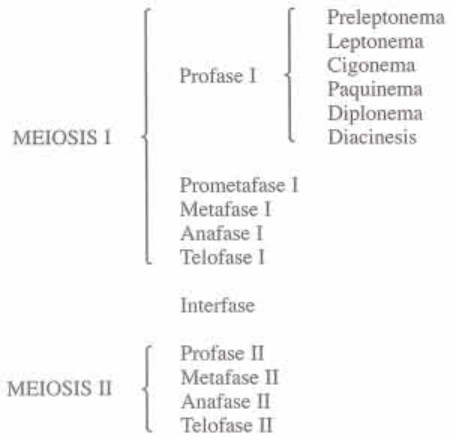
Al término de las divisiones mitóticas, parte de los espermatogonios y de los ovogonios se diferencian, respectivamente, en **espermatocitos I** y en **ovocitos I**, los cuales llevan a cabo la ***meiosis I***. Como corolario de la primera división meiótica se generan los **espermatocitos II** y el **ovocito II**, que son las células que realizan la ***meiosis II***. Finalmente, la segunda división meiótica culmina con la formación de las **espermátides** y del **óvulo**. Debe agregarse que las espermátides se convierten en **espermatozoides** y que —por las causas que se señalan en la sección 19-15— en la mujer se le da el nombre de óvulo al ovocito II.

La figura 19-3 muestra las divisiones mitóticas y meióticas de las células germinativas, la formación del cigoto y las dos primeras divisiones de segmentación (las características generales de las divisiones de segmentación se estudian en los capítulos 18-22 y 21-7). Además, señala la condición haploide o diploide y el contenido del ADN nuclear de las células que llevan a cabo esos procesos, de cuyo análisis se ocupan las próximas secciones.

19-4. La meiosis comprende dos divisiones celulares

Ya dijimos que la **meiosis** comprende dos divisiones celulares. La meiosis I se distingue de la meiosis II (y de la mitosis) porque su profase es muy larga y en su transcurso los cromosomas homólogos se aparean y recombinan para intercambiar material genético.

Los períodos de la mitosis son insuficientes para describir los fenómenos que ocurren en la meiosis, cuyos estadios progresan en el siguiente orden:



En primer término analizaremos detalladamente los cambios que se suceden durante la **meiosis I** —comenzando por los estadios de la **profase I**—, que como se vio tienen lugar en los **espermatocitos I** y los **ovocitos I.**

19-5. Durante el preleptonema los cromosomas son difíciles de observar

El ***preleptonema*** corresponde a la profase temprana de la mitosis. Los cromosomas son muy delgados y difíciles de observar.

19-6. Durante el leptonema los cromosomas aparentan ser simples

Al comenzar el ***leptonema*** (del griego *leptós*, delgado, y *nêma*, filamento) el núcleo aumenta de tamaño y los cromosomas se tornan visibles (figs. 19-2 y 19-4A). Además presentan una gran diferencia respecto de los cromosomas de la profase mitótica: a pesar de haberse duplicado su ADN (durante la fase S) y, por lo tanto, contener dos cromátidas cada uno, parecen ser simples en vez de dobles. Con frecuencia la mayoría de los cromosomas se doblan y sus dos extremos (los telómeros) se fijan en un área circunscrita de la envoltura nuclear cercana al centrosoma.

19-7. Durante el cigonema se produce el apareamiento de los cromosomas homólogos, entre los cuales se forma el complejo sinaptonémico

Durante el ***cigonema*** (del griego *zygón*, pareja) tiene lugar el primer fenómeno esencial de la meiosis: los cromosomas homólogos se alinean entre sí mediante un proceso denominado **apareamiento** o **sinapsis** (fig. 19-2). El apareamiento comprende la formación de una estructura compleja —observable con la ayuda del microscopio electrónico—, conocida con el nombre de **complejo sinaptonémico (CS)** (figs. 19-5, 19-6 y 19-7). El proceso puede comenzar en cualquier punto de los cromosomas. Así, en algunos casos los homólogos se unen primero a nivel de uno de sus extremos y la unión progresa

hacia el otro extremo como un cierre relámpago. En otros, en cambio, la asociación se produce simultáneamente en varios puntos a lo largo de los homólogos. El apareamiento es muy exacto y específico, pues se produce punto por punto entre los homólogos. No obstante, los cromosomas quedan separados por una distancia de unos 200 nm, que es ocupada por el complejo sinaptonémico. En términos moleculares esta separación es considerable, pues el diámetro del ADN es de 2 nm y algunas partes de ambos ADN deben desplazarse 100 nm para poder encontrarse y recombinarse en medio de ese espacio.

El CS está integrado por dos componentes laterales y un componente central (figs. 19-5, 19-6 y 19-7). Los componentes laterales se desarrollan al final del leptonema y el central aparece durante el cigonema. Sobre cada componente lateral se aplican las dos cromátidas hermanas de uno de los cromosomas homólogos.

En un corte transversal, los componentes laterales se hallan separados del componente central por espacios regulares de idéntico ancho. En conjunto, el CS tiene el aspecto de una escalera, con peldaños que la cruzan a intervalos de 20 a 30 nm. Tales peldaños, formados por filamentos muy delgados, aparentan cruzar todo el ancho del CS, desde un componente lateral al otro (fig. 19-6). Tanto los filamentos transversales como los componentes laterales contienen proteínas fibrilares.

En las cromátidas hermanas las fibras de 30 nm forman asas, cada una de las cuales contiene entre 5 y 25 μm de ADN. Como se ilustra en la figura 19-8, durante el leptonema las asas de cromatina tienen una disposición laxa en el eje del cromosoma. Después, a medida que la cromatina se condensa, las asas aparecen cada vez más juntas al lado de los componentes laterales del CS. Más aún, igual que en los cromosomas mitóticos, en los meióticos existe un armazón de proteínas no histónicas para sostener las asas de cromatina (fig. 19-8); la diferencia con los meióticos es que a éstos se les agregan los componentes del CS.

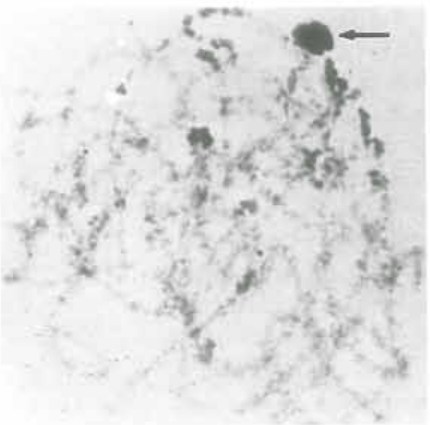
La fijación de los telómeros a la envoltura nuclear ordena espacialmente a los cromosomas, lo que favorece el alineamiento de los homólogos. Una vez formados los CS, sus extremos también se insertan en la envoltura nuclear (fig. 19-5). En los puntos donde lo hacen aparecen engrosamientos llamados **placas de fijación**.

Una de las funciones del CS es estabilizar el apareamiento de los homólogos y facilitar su recombinación. Así, las moléculas proteicas de sus componentes laterales permiten que los ADN de los cromosomas homólogos se dispongan de manera tal que el intercambio entre ellos resulte favorecido. En consecuencia, el CS debe ser considerado un armazón proteico que se construye para que se produzca el alineamiento y la recombinación de los homólogos.

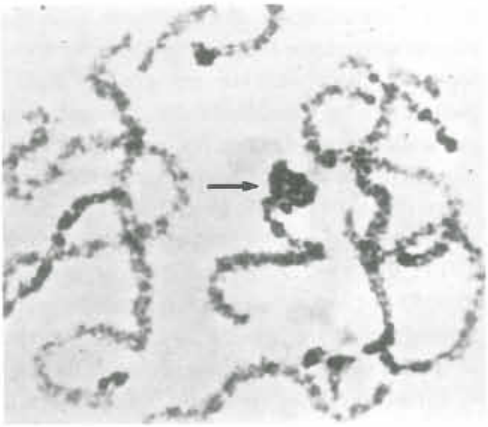
Cuando comienza el apareamiento, el acortamiento de los cromosomas es ya muy pronunciado y existe por lo menos una relación 300:1 entre el largo del ADN y la longitud cromosómica. Esto significa que sólo el 0,3% del ADN de los cromosomas homólogos se halla en contacto directo con los componentes laterales del CS.

19-8. Durante el paquinema se recombinan las cromátidas homólogas

Durante el ***paquinema*** (del griego *pachỳs*, grueso) los cromosomas se acortan y el apareamiento de los cromosomas homólogos se completa (figs.

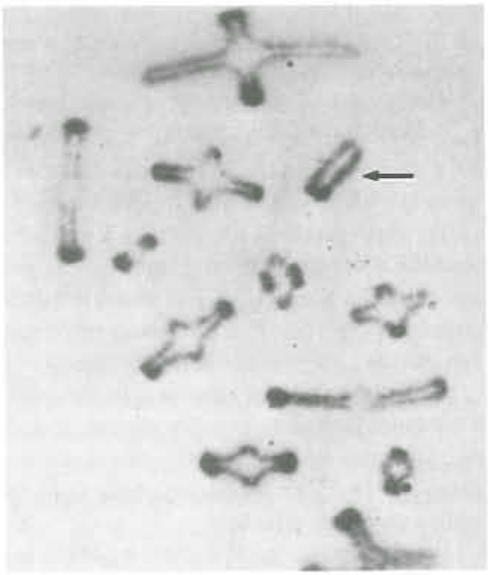


A LEPTONEMA



B PAQUINEMA

C DIPLONEMA TEMPRANO



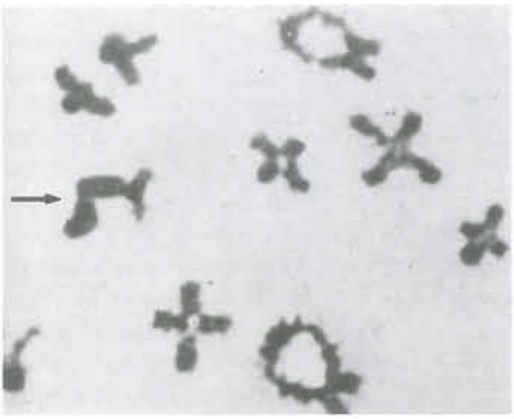
D DIPLONEMA TARDIO

19-2 y 19-4B). Pero lo más importante de este período es que se produce el intercambio de segmentos de ADN entre las cromátidas homólogas, fenómeno que lleva el nombre de **recombinación genética** (en inglés, *crossing-over*) (fig. 19-9).

Los sucesos que conducen a la recombinación son muy complejos, pues se cree que ésta tiene lugar al cabo de los pasos que se muestran en la figura 19-10. No obstante, en esencia ocurre el proceso que se ilustra en la figura 19-11, es decir, se producen cortes en las dos cromátidas seguidos por el cruce y el empalme de los segmentos que se intercambian.

El paquinema es un proceso relativamente prolongado. Su duración se mide en días, a diferencia del leptonema y el cigonema, que se miden en horas.

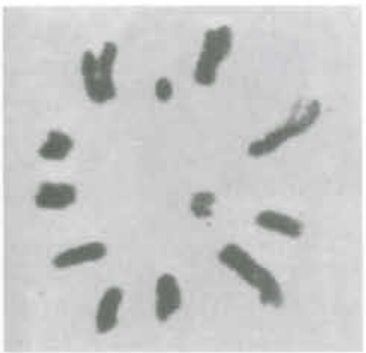
En el paquinema el núcleo parece contener un número haploide de cro-



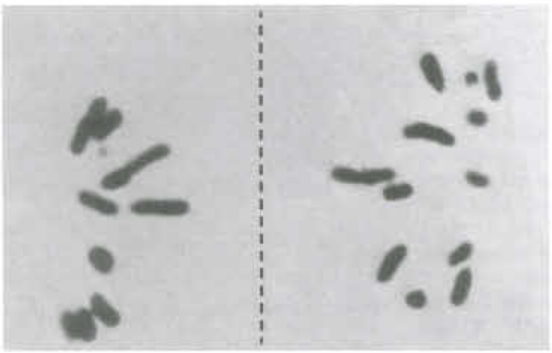
E DIACINESIS

Fig. 19-4. Etapas de la meiosis en la langosta *Laplatacris dispar* (2n = 22+X). El cromosoma X aparece señalado por una flecha. (De F. A. Saez.)

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE



F METAFASE I



G ANAFASE II

mosomas, pero no es así, ya que cada una de las unidades visibles se compone de dos cromosomas independientes, si bien íntimamente apareados. Por tal motivo, cada uno de los 23 pares de cromosomas recibe el nombre de **bivalente**. Dado que cada conjunto está integrado por cuatro cromátidas, se llama también **tétrada** (fig. 19-9).

Las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma se hallan conectadas por el centrómero, por lo que en un bivalente o tétrada existen dos centrómeros, uno por cromosoma. Igual que en la mitosis, cada centrómero contiene dos cinetocoros, uno por cada cromátida hermana. Sin embargo, hasta la finalización de la meiosis I los cinetocoros hermanos se comportan como una unidad (fig. 19-15).

A lo largo del bivalente, en el CS aparece una sucesión de nódulos densos de alrededor de 100 nm de diámetro, denominados **nódulos de recombinación** (fig. 19-7). Su número y sus localizaciones coinciden con los sitios de recombinación genética, lo que sugiere que a nivel de ellos ocurre el intercambio de los segmentos de ADN entre las cromátidas homólogas.

Para que se produzca la recombinación, las moléculas de ADN de las cromátidas homólogas deben situarse a una distancia de aproximadamente 1 nm en el componente central del CS. Se cree que ese virtual contacto ocurre a ni-

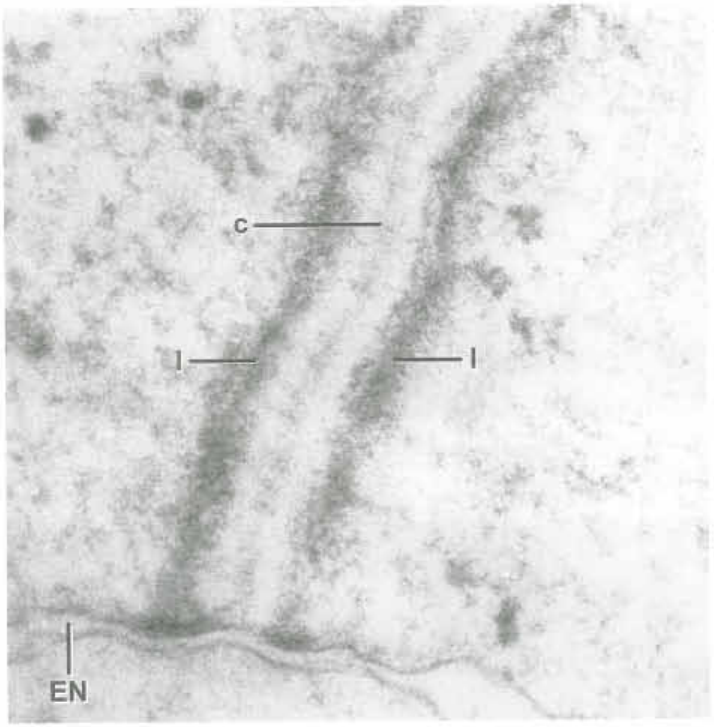


Fig. 19-5. Micrografía electrónica que muestra los componentes laterales (*l*) y el componente central (*c*) del complejo sinaptonémico entre los cromosomas homólogos. Obsérvese la manera en que los telómeros se fijan a la envoltura nuclear (*EN*).

vel de los filamentos transversales que unen a los componentes laterales, por los cuales las secuencias de nucleótidos homólogas se buscarían, hecho imprescindible para que tenga lugar el intercambio de los segmentos de ADN. El nódulo de recombinación podría considerarse la expresión morfológica de ese intercambio. Más aún, el nódulo sería un complejo multiproteico que reúne a las cromátidas paternas y maternas y produce los cortes y empalmes necesarios para la recombinación.

Entre las proteínas que actúan al comienzo de la recombinación se encuentra la **Rad51** (por *radiation sensitive*), cuya intervención es esencial para que se produzcan los cambios que se muestran en la figura 19-12, los cuales ocurrirían entre los pasos 2 y 3 del modelo de recombinación genética ilustrado en la figura 19-10. Obsérvese cómo la cadena invasora se combina con la doble hélice de la cromátida homóloga y da lugar a una triple hélice transitoria. Se considera que la cadena invasora se acomoda en el surco mayor de la doble hélice y que sus bases se unen con las de la cromátida homóloga mediante puentes de hidrógeno inusuales.

19-9. Durante el diplonema los cromosomas apareados se separan, aunque en algunos puntos permanecen unidos

Durante el ***diplonema*** (del griego *diplóos*, doble) los cromosomas homólogos comienzan a separarse, de modo que las cromátidas de la tétrada se vuelven visibles y el complejo sinaptonémico se desintegra (figs. 19-2 y 19-4CD). Sin embargo, la separación no es completa, ya que las cromátidas homólogas permanecen conectadas en los puntos donde ha tenido lugar el intercambio (figs. 19-4D, 19-9 y 19-13). Tales conexiones —llamadas **quiasmas** (del grie-

go *khíasma*, cruz)— expresan la etapa final de la recombinación, pues muestran a los cromosomas homólogos en vías de separarse, ligados todavía por esos puntos. El número de quiasmas es variable, ya que pueden aparecer pares de cromosomas homólogos con un solo quiasma (es el número mínimo) y otros con varios. Más aún, la cantidad de quiasmas y sus ubicaciones suelen coincidir con las de los nódulos de recombinación.

En la mujer el diplonema es un período extraordinariamente largo. Todos los ovocitos I arriban a esta fase del ciclo celular antes del séptimo mes de la vida intrauterina y permanecen así como mínimo hasta la pubertad (sección 19-15).

En el diplonema, diversos sectores de la cromatina experimentan un fuerte desenrollamiento. Situaciones extremas de este fenómeno se observan en los peces, los anfibios, los reptiles y las aves, en los que el desenrollamiento es tan acentuado que los bivalentes suelen asumir una configuración especial —emiten finas proyecciones laterales—, motivo por el cual se los llama **cromosomas plumulados** o **en cepillo** (fig. 19-14). Estas proyecciones son asas de cromatina muy desenrolladas, cuyo ADN se transcribe a gran velocidad. Así, tal configuración cromosómica expresa una intensa síntesis de ARN por parte de la célula, que es la causa del enorme crecimiento que experimenta el ovocito antes de ser expulsado del ovario.

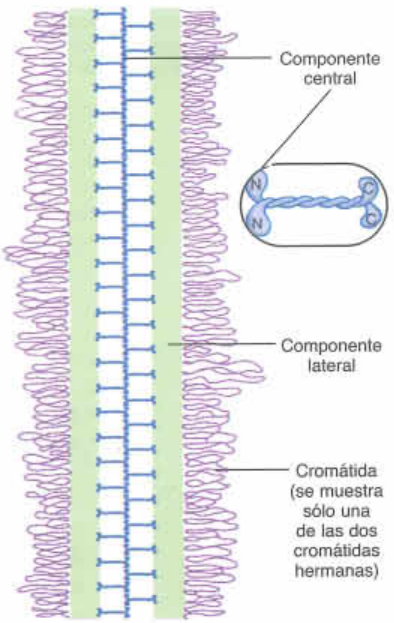


Fig. 19-6. Esquema del complejo sinaptonémico, con los componentes laterales, los filamentos transversales y el componente central. Los filamentos transversales son dímeros proteicos que nacen de los componentes laterales y se extienden hasta el plano sagital del complejo. Allí sus extremos libres se superponen y dan lugar a la línea de alta densidad electrónica del componente central, donde también existirían proteínas longitudinales. La ilustración del *recuadro* muestra que las dos proteínas de los dímeros son fibrosas, que están entrelazadas y que sus extremos globulares se hallan orientados como en el dímero de la figura 5-2.

En algunas de las clases zoológicas nombradas, a lo largo de los cromosomas pueden detectarse engrosamientos de cromatina dispuestos entre las asas —llamados **cromómeros**—, con un aspecto de collar de cuentas (fig. 19-14). Los cromómeros corresponden a sectores de cromatina altamente condensada, al contrario de la cromatina de las asas, que como acabamos de ver se encuentra bastante desenrollada. Los cromómeros comienzan a verse a partir del leptonema.

19-10. Durante la diacinesis la cromatina se vuelve a condensar

Durante la ***diacinesis*** (del griego *diá*, a través) la condensación de los cromosomas vuelve a acentuarse (fig. 19-4E). Las tétradas se distribuyen homogéneamente por todo el núcleo y el nucléolo desaparece. A excepción del aspecto de los cromosomas, este breve estadio muestra semejanzas con la profase tardía de la mitosis.

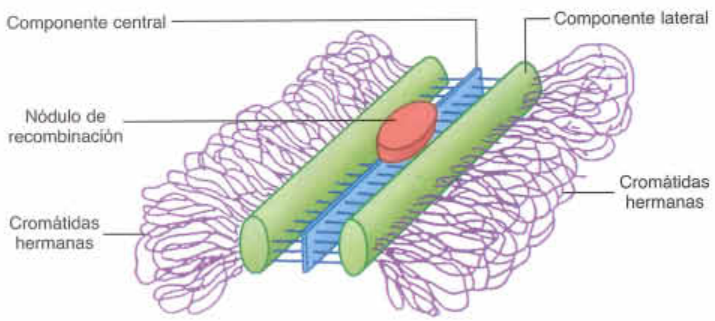


Fig. 19-7. Visión tridimensional del complejo sinaptonémico, con un nódulo de recombinación.

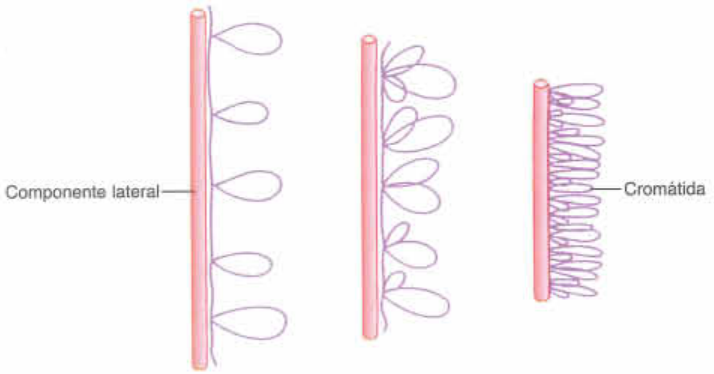


Fig. 19-8. Formación de asas de cromatina cada vez más compactas a medida que avanza la profase de la meiosis I.

19-11. En las restantes etapas de la división meiótica I los cromosomas homólogos se separan y se dirigen hacia los polos opuestos de la célula

Durante la **prometafase I** la condensación de los cromosomas alcanza su grado máximo. La carioteca desaparece y los microtúbulos del huso se conectan con los cinetocoros. Esta conexión es distinta de la registrada en la mitosis porque las fibras del huso provenientes de cada polo celular se asocian con los dos cinetocoros hermanos y no con uno (en la sección 19-8 se vio que en la meiosis I los cinetocoros hermanos se comportan como una unidad).

Durante la **metafase I** los bivalentes se disponen en el plano ecuatorial de la célula (fig. 19-4F). Debido al modo como se conectan las fibras del huso, los cinetocoros de cada cromosoma homólogo "miran" hacia un mismo polo (fig. 19-15). Los bivalentes continúan exhibiendo sus quiasmas. Cuando los cromosomas son cortos, los quiasmas se localizan en los extremos de los homólogos (quiasmas terminales); cuando los cromosomas son largos, los quiasmas aparecen en varios puntos a lo largo de los ejes cromosómicos (quiasmas intersticiales).

Durante la **anafase I** los cinetocoros opuestos son traccionados hacia los respectivos polos, de modo que los homólogos de cada bivalente —cada uno integrado por dos cromátidas hermanas— se separan entre sí y se movilizan en direcciones opuestas (figs. 19-2 y 19-15). La observación de los bivalentes en esta fase permite comprobar que a menudo la recombinación genética se produce entre las cromátidas de los dos pares de homólogos (fig. 19-13). Así, en algunos tramos del cromosoma la recombinación tiene lugar entre un par de cromátidas homólogas —no estamos diciendo "hermanas"— y en

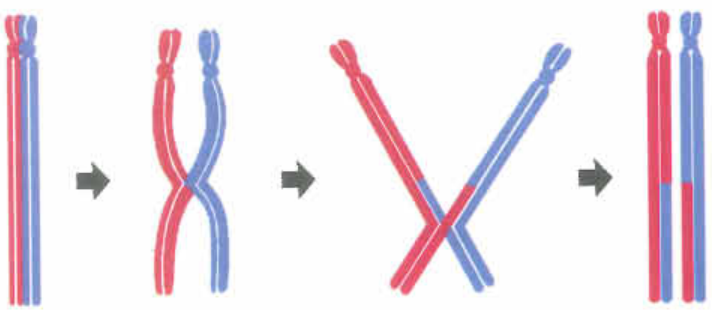


Fig. 19-9. Esquemas que muestran cómo se forma el bivalente (tétrada), el desarrollo del quiasma y la separación de los cromosomas.

otros tramos ocurre entre las cromátidas del otro par. Por consecuencia, al separarse por completo los cromosomas homólogos, en las células hijas las dos cromátidas de cada cromosoma son mixtas, pues tienen segmentos cromosómicos tanto paternos como maternos (fig. 19-16).

Durante la **telofase I** los grupos cromosómicos haploides llegan a sus respectivos polos y en torno de ellos se construyen las envolturas nucleares.

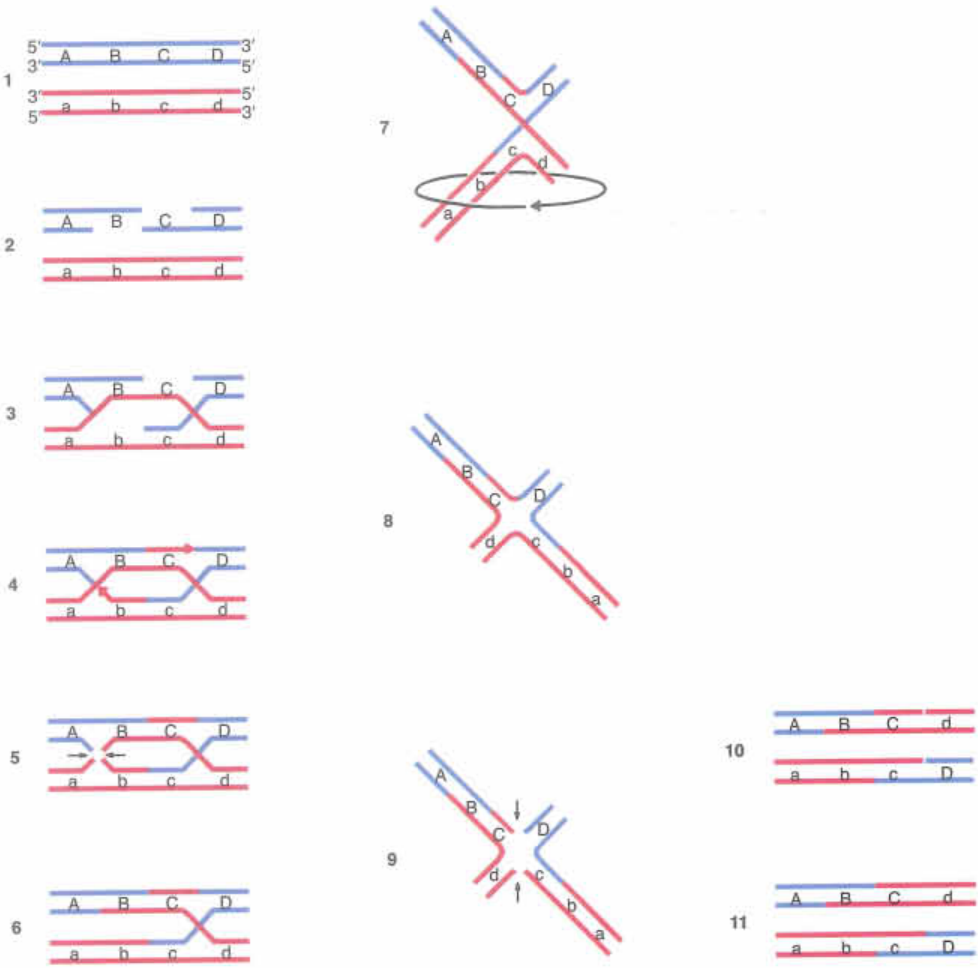


Fig. 19-10. Modelo teórico de recombinación genética entre las cromátidas homólogas. **1.** Apareamiento de las cromátidas. Los pares de letras *Aa*, *Bb*, *Cc* y *Dd* simbolizan a los dos alelos de los cuatro genes representados (cap. 20-3). **2.** Corte de las dos cadenas de ADN de una de las cromátidas y ampliación de las separaciones mediante exonucleasas. Dado que éstas remueven nucleótidos en dirección 5'→3', se forma —en cada cadena cortada— un extremo 3' libre (no apareado). **3.** Uno de esos extremos invade la cromátida homóloga y se coloca en el lugar de una de sus cadenas, la que a su vez se desplaza hacia el sitio que deja vacante la cadena invasora. **4.** Síntesis de ADN en las cadenas cortadas, para reconstruir los segmentos que faltan. Intervienen polimerasas que usan a las dos cadenas de la cromátida homóloga como moldes, por lo que los tramos que faltan se sintetizan por un mecanismo similar al de la reparación del ADN (cap. 17-22). Los pasos anteriores conducen a la formación de dos entrecruzamientos o *estructuras de Holliday* (llamadas así en homenaje al genetista Robin Holliday, quien describió esos entrecruzamientos en 1964). **5.** Corte de las dos cadenas a nivel de uno de los entrecruzamientos (*flechas*). **6.** Empalme lateral de las cadenas cortadas en el paso anterior. **7.** Encorvadura de ambas cromátidas a la altura del segundo entrecruzamiento y rotación de 180° de una de las cromátidas. **8.** Formación de una estructura de Holliday isométrica. **9.** Corte en una de las cadenas de cada cromátida (*flechas*). **10.** Enderezamiento de las cromátidas. **11.** Empalme lateral de las cadenas cortadas en el paso 9.

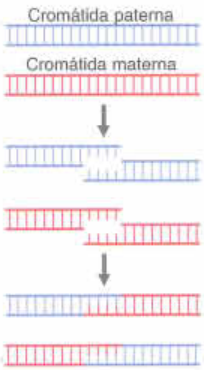


Fig. 19-11. Modelo simplificado de cortes y empalmes entre las moléculas de ADN de las cromátidas homólogas durante la recombinación genética.

19-12. Entre las dos divisiones meióticas existe una interfase de corta duración

La telofase I es seguida por la **partición del citoplasma**, y las dos células hijas pasan por un corto período de interfase en el que no hay replicación del ADN (no hay fase S). Por consiguiente, las células hijas derivadas de la meiosis I poseen un número haploide de cromosomas, cada uno de éstos compuesto por dos cromátidas hermanas (figs. 19-2 y 19-3).

En el varón el resultado de la meiosis I es la formación de dos células hijas iguales, denominadas **espermatocitos II**. En cambio, en la mujer, debido a que el reparto del citoplasma del ovocito I es desigual, se forman dos células de tamaño muy diferente: el **ovocito II**, que es relativamente voluminoso, y el primer **cuerpo polar**, que es pequeño y desaparece (fig. 19-1).

Los espermatocitos II y el ovocito II comienzan la **meiosis II**, cuyas etapas, como se verá a continuación, son similares a las de la mitosis.

19-13. En la división meiótica II se separan las cromátidas hermanas

La **profase II** es muy breve, aunque suficiente para permitir la reaparición de las fibras del huso y la desaparición de la envoltura nuclear.

La **metafase II** lleva a los cromosomas al plano ecuatorial de la célula. Las fibras del huso se conectan a los cinetocoros, los cuales se colocan como en los cromosomas mitóticos, es decir, uno apuntando a un polo y el otro al polo opuesto (fig. 19-15).

En la **anafase II**, debido a la tracción que las fibras del huso ejercen sobre los cinetocoros, el centrómero se divide y las cromátidas hermanas de cada cromosoma son separadas y traccionadas hacia los polos opuestos de la célula (figs. 19-2, 19-4G y 19-15).

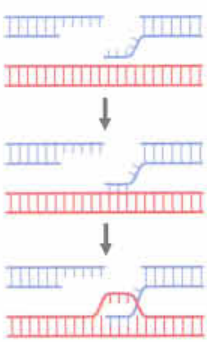
En la **telofase II** cada uno de los polos de la célula recibe un juego haploide de cromátidas, que pasan a llamarse cromosomas. La formación de una nueva envoltura nuclear en torno de cada conjunto cromosómico haploide —seguida por la **partición del citoplasma**— pone fin a la meiosis (figs. 19-2 y 19-3).

Como se acaba de ver, la meiosis II se asemeja a la mitosis, excepto porque en la primera las células hijas reciben una sola copia de cada cromosoma y no los dos homólogos.

La figura 19-1 muestra que en el varón el resultado de la meiosis II es la formación de dos células hijas iguales —denominadas espermátides— que al cabo de un tiempo se diferencian en **espermatozoides**. En cambio, en la mujer, debido a que el reparto del citoplasma del ovocito II es desigual, se forman dos células de tamaño muy diferente: el **óvulo,** que es voluminoso, y el segundo **cuerpo polar**, que como el primer cuerpo polar es pequeño y desaparece.

En síntesis, la meiosis genera cuatro espermatozoides a partir de cada espermatocito I, y un solo óvulo a partir de cada ovocito I (fig. 19-1).

Fig. 19-12. Formación de una triple hélice transitoria al comienzo de la recombinación genética. Tiene lugar entre los pasos *2* y *3* de la figura 19-10.



19-14. Consecuencias genéticas de la meiosis

En la sección 19-1 dijimos que los procesos esenciales de la meiosis son: 1) la reducción del número de cromosomas a la mitad (fig. 19-3); 2) la recombinación genética; 3) la segregación de los cromosomas paternos y maternos. Así, desde el punto de vista genético la meiosis puede considerarse un meca-

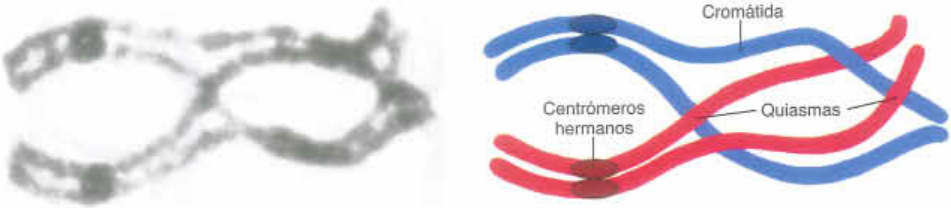


Fig. 19-13. Micrografía electrónica de un bivalente, y su interpretación. Se observan dos quiasmas y la posición de los centrómeros hermanos, que se hallan unidos entre sí.

nismo destinado a distribuir al azar los genes paternos y maternos en los gametos, tanto por la recombinación genética como por la segregación de los cromosomas homólogos.

En la figura 19-17 pueden observarse las consecuencias genéticas de la meiosis en una célula hipotética que contiene tres pares de cromosomas homólogos, en los cuales se produjeron una, dos y tres recombinaciones, respectivamente.

Las **recombinaciones** son señaladas por los quiasmas, y se ve que han tenido lugar sólo en uno de los dos pares de cromátidas homólogas. No obstante, como se señaló en la sección 19-11, la recombinación se produce no entre uno sino entre los dos pares de cromátidas homólogas, de modo que al concluir la meiosis todos los cromosomas de los gametos presentan segmentos maternos y paternos alternados (fig. 19-16).

La **segregación al azar** de los cromosomas paternos y maternos durante las anafases I y II también contribuye a la diversidad genética de los gametos, pero en distinto grado. Esto no se aprecia en la figura 19-17, ya que muestra el caso (teóricamente posible) en que los cromosomas maternos y paternos se segregan en bloque en ambas anafases. Dado que el varón posee 23 pares de cromosomas homólogos en las células predecesoras de los gametos, las combinaciones de segregación posibles alcanzan el número de 8.388.608 (2^{23}). A ellas deben sumarse las incontables posibilidades de segregación de los genes mediante la recombinación.

En síntesis, al examinarse las consecuencias derivadas de la asociación de ambos procesos —la recombinación genética y la segregación de los homó-

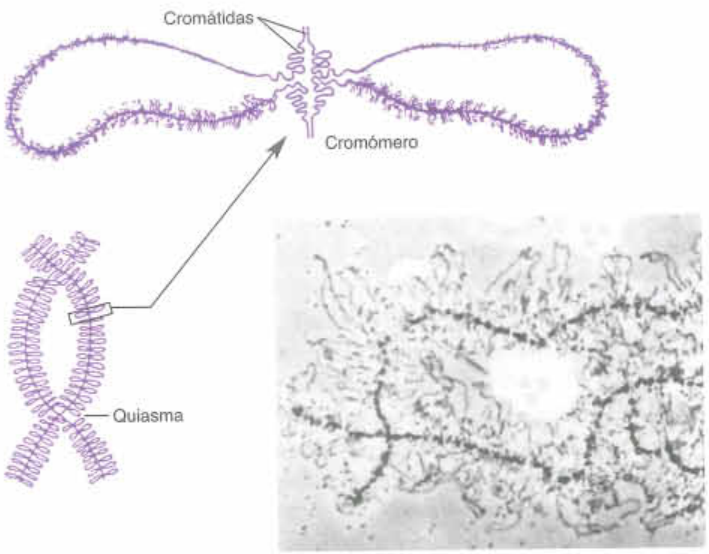


Fig. 19-14. Cromosomas plumulados o en cepillo. La figura de la izquierda es un esquema de poco aumento que muestra dos quiasmas y las asas de cromatina laterales. La figura de arriba ilustra dos asas laterales a mayor aumento y la compactación de las cromátidas a nivel del cromómero. (Cortesía de O. L. Miller Jr.) La micrografía (contraste de fase) permite observar la sucesión de cromómeros, que genera una imagen con aspecto de collar de cuentas. (Cortesía de U. Scheer.)

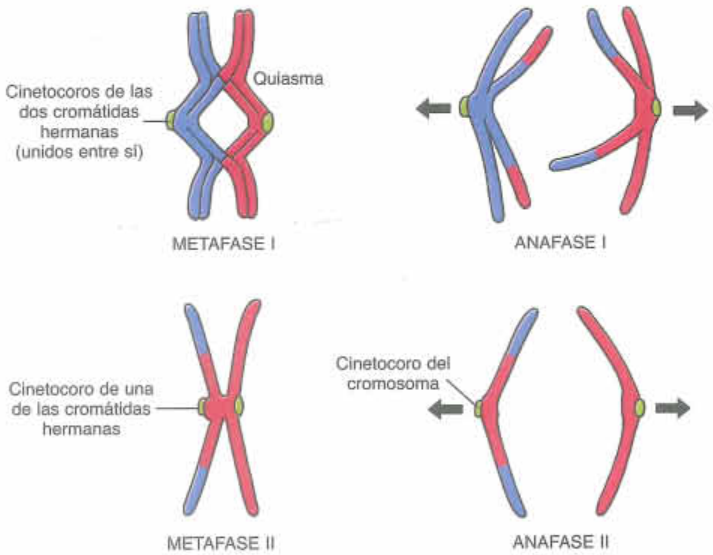


Fig. 19-15. Evolución seguida por las cromátidas hermanas y los cinetocoros durante la meiosis I y la meiosis II.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE BIBLIOTECA FILIAL CIUDAD DEL ESTE

logos—, se puede observar que cada uno de los gametos a los que da lugar la meiosis hereda conjuntos de genes diferentes.

Accidentalmente, la segregación de los homólogos puede fallar, de manera que los dos homólogos de un par no se separan y pasan juntos a una de las células hijas. Este fenómeno —llamado **no disyunción**— puede ocurrir en la anafase I o en la anafase II de la meiosis (cap. 20-9) y por su causa uno de los gametos contendrá un cromosoma de más (24) y el otro uno de menos (22). Si uno de estos gametos participa en la fecundación, las células somáticas del nuevo individuo poseerán un número anormal de cromosomas (47 y 45, respectivamente). Estos cuadros llevan el nombre de **aberraciones cromosómicas numéricas**, de las cuales el ***síndrome de Down*** es el ejemplo más conocido. En el síndrome de Down las células contienen 47 cromosomas, ya que existen tres unidades del cromosoma 21 en lugar de dos (cap. 20-13).

19-15. En la mujer la meiosis puede durar alrededor de 50 años

En el embrión humano las células germinativas primitivas aparecen en la pared del saco vitelino a los 20 días de la fecundación. De allí emigran a los esbozos gonadales, donde —en el embrión femenino— se dividen y se transforman en ovogonios. Entre el tercero y el séptimo mes de la vida prenatal los ovogonios entran en meiosis y se convierten en ovocitos I; permanecerán en el período diplonémico hasta el comienzo de la pubertad.

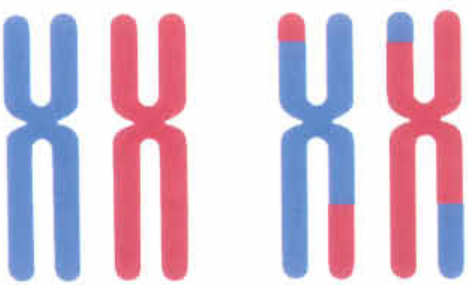


Fig. 19-16. Resultado de la recombinación genética al cabo de la anafase I.

Durante este diplonema tan prolongado los cromosomas experimentan un tipo especial de desenrollamiento que los asemeja —aunque lejanamente— a los cromosomas plumulados (secciones 19-9 y 19-14).

A partir de la pubertad, en cada ciclo menstrual varios ovocitos I reanudan la meiosis I, pero ésta se completa en uno solo, que se convierte en ovocito II. Los restantes ovocitos I degeneran en el ovario. Debe señalarse que a veces son dos los ovocitos I que completan la meiosis I, y que con menos frecuencia son más de dos.

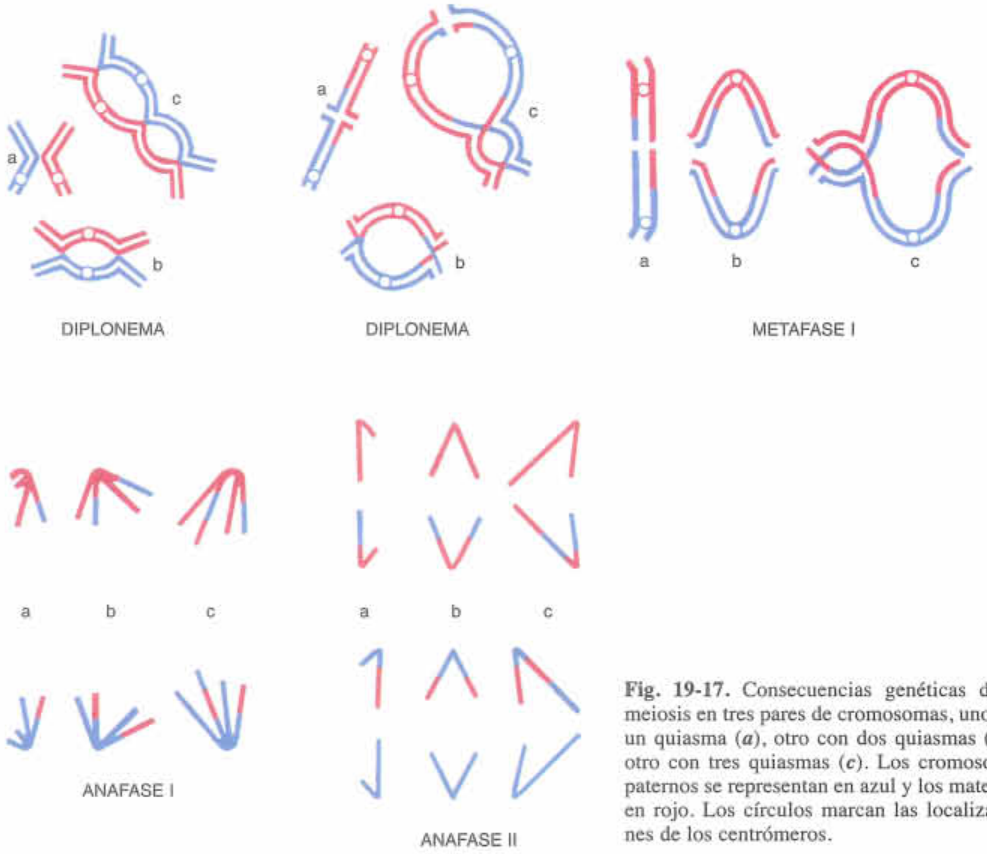


Fig. 19-17. Consecuencias genéticas de la meiosis en tres pares de cromosomas, uno con un quiasma (*a*), otro con dos quiasmas (*b*) y otro con tres quiasmas (*c*). Los cromosomas paternos se representan en azul y los maternos en rojo. Los círculos marcan las localizaciones de los centrómeros.

Cuando el ovocito II se libera del ovario (ovulación) e ingresa en la trompa de Falopio, ya ha iniciado la meiosis II, pero ésta prosigue sólo si el ovocito es fecundado por un espermatozoide; más aún, la falta de fecundación hace que el ovocito II muera en pocas horas. Contrariamente, la fecundación activa en el ovocito II algunos mecanismos que impulsan la continuación de la meiosis II, al cabo de la cual se generan el cigoto (o célula huevo) y el segundo cuerpo polar. Como se ve, el óvulo no se forma en ningún caso, aunque a menudo se emplea su nombre cuando se menciona al ovocito II.

En la recién nacida el número de ovocitos I es de alrededor de un millón. A la edad de 12 años se reducen a 300.000, de los cuales cerca de 400 alcanzarán la madurez total entre esa edad y la menopausia. Por lo tanto, en la mujer la meiosis puede durar alrededor de 50 años, lo que explica por qué a medida que aumenta la edad materna la proporción de aberraciones cromosómicas en la descendencia es cada vez mayor (cap. 20-13).

19-16. En el varón la meiosis comienza a partir de la pubertad

En el embrión masculino, las células germinativas primitivas provenientes del saco vitelino arriban a los esbozos gonadales y se incorporan a los túbulos seminíferos en formación, donde se convierten en espermatogonios. Estos entran en meiosis a partir de la pubertad. Como vimos, cada uno genera cuatro espermatozoides. La profase I dura unos 14 días y la meiosis se completa en

alrededor de 24 días. A diferencia de la ovogénesis, la espermatogénesis prosigue hasta una edad relativamente avanzada.

FECUNDACION

19-17. Características de los gametos en el momento de la fecundación

La fertilización del óvulo por el espermatozoide —o **fecundación**— es el paso que inicia el proceso del desarrollo embrionario, y por ese motivo es analizada en los libros de embriología. Aquí solamente ofreceremos una breve reseña de sus aspectos celulares y moleculares.

La fecundación suele producirse en el tercio externo de la trompa de Falopio, adonde arriba el ovocito II —sin haber completado la meiosis II— luego de la ovulación (fig. 19-18).

El ***ovocito*** es una célula de tamaño sumamente grande, que posee numerosísimas **microvellosidades** y se halla envuelta por la membrana pelúcida y las células foliculares de la corona radiada (fig. 19-18). La **membrana pelúcida** contiene abundante cantidad de glicoproteínas, entre las cuales se destacan la **ZP2** y la **ZP3** (por *zona pellucida*). Por su lado, las células de la **corona radiada** se hallan unidas entre sí por un material cementante rico en **ácido hialurónico**.

El ***espermatozoide*** posee una cabeza, un cuello y una cola. La figura 19-19 muestra la cabeza y parte del cuello con sus respectivos componentes. En la cabeza debe resaltarse la presencia del **acrosoma**, un derivado lisosómico que contiene varias clases de enzimas hidrolíticas, dos de las cuales, la **hialuronidasa** y la **acrosina**, desempeñan importantes funciones durante la fecundación.

Las dos últimas etapas de la diferenciación de los espermatozoides —llamadas **maduración** y **capacitación**— tienen lugar en el epidídimo y en el tracto genital femenino, respectivamente. En su transcurso evolucionan, a nivel molecular, algunas características de los espermatozoides, imprescindibles para que uno de ellos pueda fecundar al ovocito II y se forme la ***célula huevo*** o ***cigoto***. Por ejemplo, durante la maduración los espermatozoides son cubiertos por una proteína secretada en el epidídimo —la **DEFB126** (por *defensin-beta126*)—, que los protege de la acción destructora del sistema inmunológico de la mujer desde el momento en que ingresan a la vagina hasta que arriban a las trompas de Falopio. Se ha comprobado que una de las principales causas de infertilidad masculina obedece a la existencia de defectos en ambos alelos del gen de la proteína DEFB126.

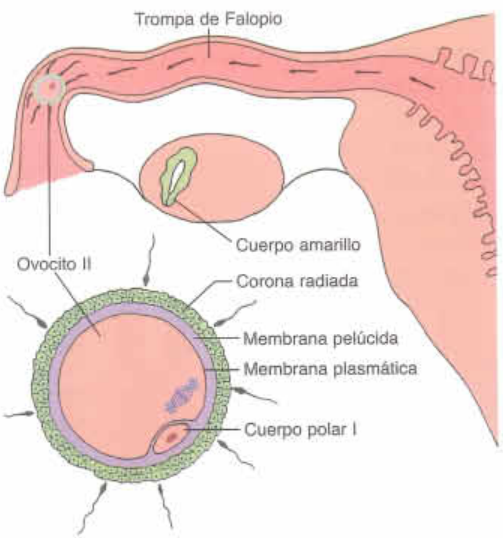


Fig. 19-18. Corte frontal de la trompa de Falopio, que muestra el encuentro de los espermatozoides con el ovocito II.

19-18. Los espermatozoides adquieren movimientos de hiperactivación

Entre otros cambios, la capacitación da lugar a la aparición de movimientos muy enérgicos en la cola de los espermatozoides, los cuales se distinguen con el nombre de **hiperactivación**. Así, abruptamente, los espermatozoides pasan de un tipo de movimiento delica-

do y lineal a otro vigoroso y errático, aunque intercalado con breves episodios de desplazamientos lineales.

Los mecanismos moleculares desencadenantes de la hiperactivación pueden observarse en la figura 19-20. Como se ve, una sustancia inductora o **factor capacitante** (hasta ahora desconocido) interactúa con un **receptor** de la membrana plasmática del espermatozoide —situado probablemente a la altura de su cuello— y el dominio citosólico del receptor activa a una proteína G (cap. 11-14). Esta, a su vez, abre un canal de Ca^{2+} e induce la entrada del ion desde el medio extracelular al citosol. Dado que la proteína G activa también a la enzima adenilato ciclasa, se incrementa el AMPc citosólico y se activa la quinasa A (cap. 11-15). A su turno, la quinasa A desencadena una cascada de reacciones que culmina con la fosforilación de una **proteína de 15 kDa** asociada a los microtúbulos del axonema (cap. 5-12). Finalmente, ante la presencia de ATP —que provee energía—, tanto el Ca^{2+} como la proteína de 15 kDa activan el deslizamiento de las dineínas entre los microtúbulos, y con ello los movimientos de hiperactivación en la cola del espermatozoide.

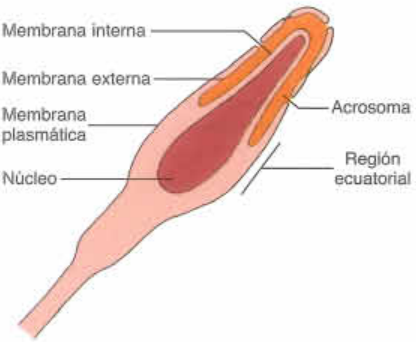


Fig. 19-19. Dibujo que muestra algunas estructuras de la cabeza del espermatozoide. Obsérvense el acrosoma y la aparición de áreas de fusión entre la membrana acrosómica externa y la membrana plasmática, con la consiguiente formación de poros (reacción acrosómica).

19-19. La fecundación se divide en varias fases

La fecundación se inicia a partir del momento en que no más de cien espermatozoides completamente diferenciados —ése es el número que llega al tercio externo de la trompa de Falopio— establecen contacto con las células foliculares que envuelven al ovocito II.

Para su mejor comprensión, se suele dividir al proceso de la fecundación en las siguientes fases (fig. 19-21):

1) ***Penetración de la corona radiada***. Una vez que toma contacto con la corona radiada, cada espermatozoide —con su acrosoma intacto— trata de

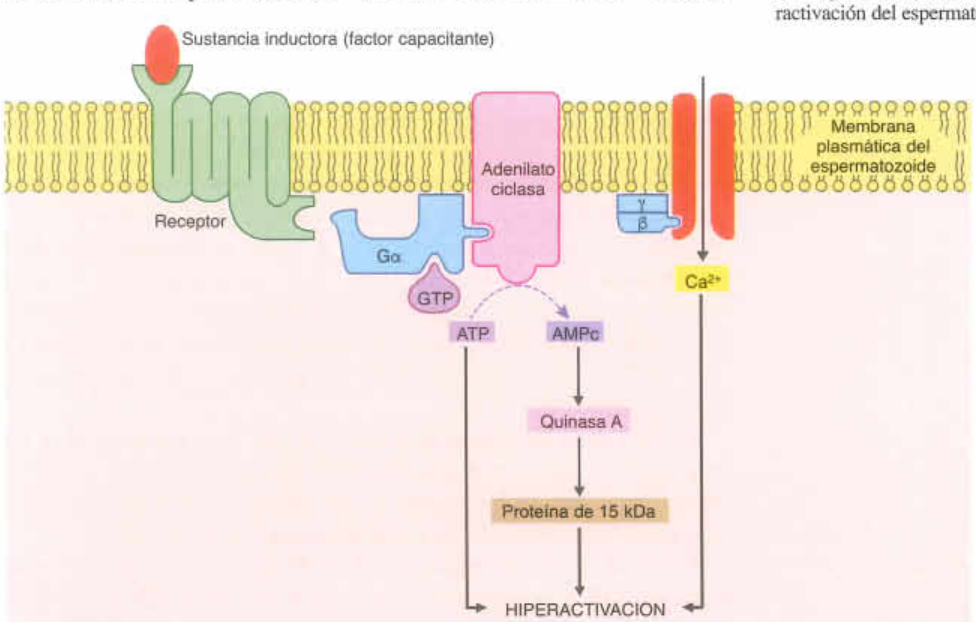


Fig. 19-20. Mecanismo molecular que desencadena la hiperactivación del espermatozoide.

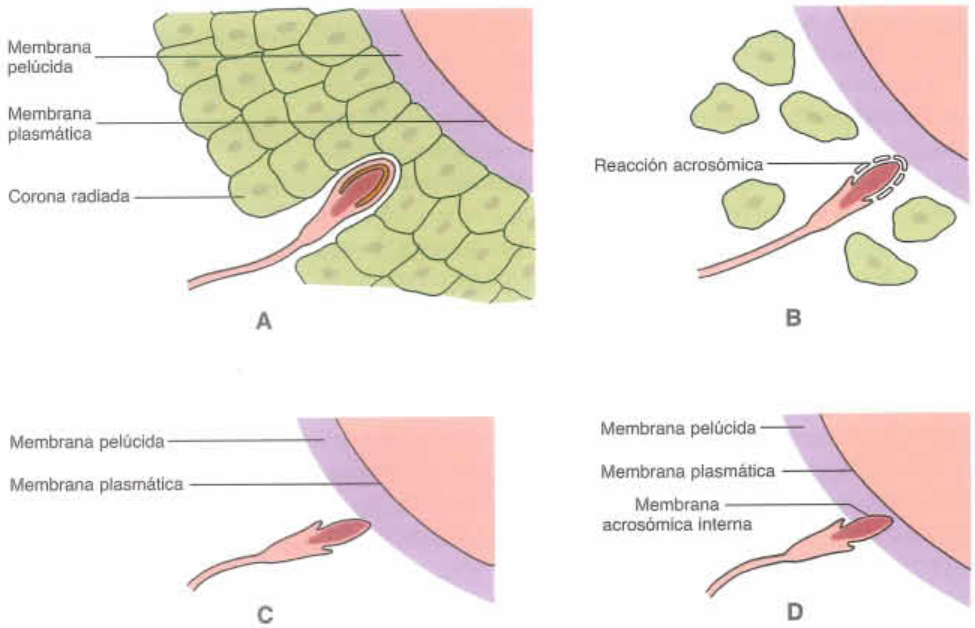


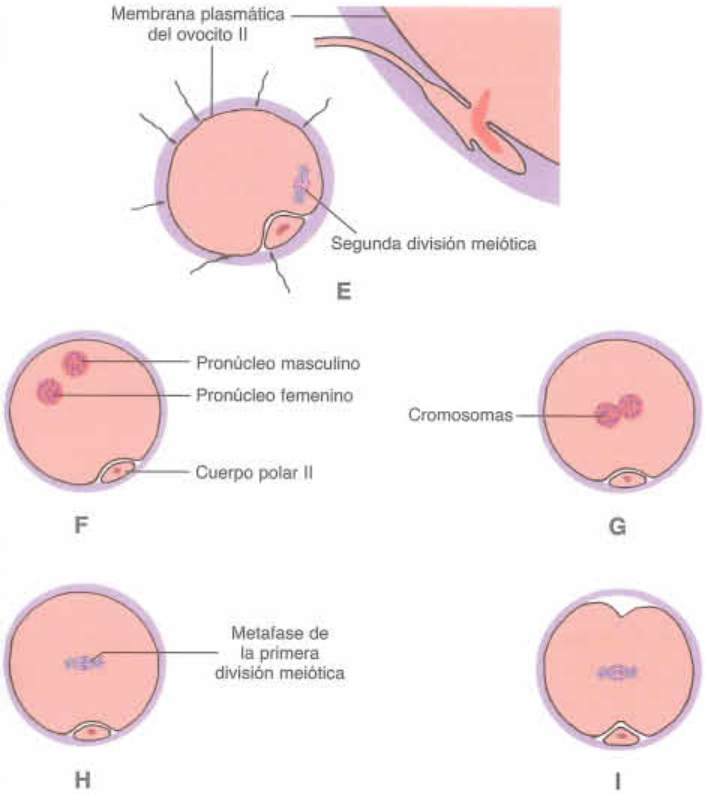
Fig. 19-21. Fases de la fecundación. **A.** Penetración de la corona radiada. **B.** Reacción acrosómica. **C.** Denudación. **D.** Penetración de la membrana pelúcida. **E.** Fusión de las membranas plasmáticas de los gametos y reanudación de la meiosis II por parte del ovocito II. **F.** Formación de los pronúcleos masculino y femenino. **G.** Unión de los pronúcleos (singamia). **H.** Metafase de la primera división mitótica (anfimixis). **I.** Comienzo de la primera división de segmentación de la célula huevo.

alcanzar la membrana pelúcida avanzando entre las células foliculares (fig. 19-21A). Para ello construye una especie de **túnel** en el ácido hialurónico que las une, con la ayuda de pequeñas cantidades de **hialuronidasa** que lleva en su membrana plasmática (esta enzima es químicamente idéntica a la contenida en el acrosoma). La fuerza mecánica derivada de los movimientos de **hiperactivación** impulsa el avance del espermatozoide. Así, mientras la hialuronidasa digiere localmente el cemento intercelular, los movimientos de hiperactivación hacen avanzar al espermatozoide. Es posible que este mecanismo actúe como un filtro selectivo para que lleguen a la membrana pelúcida sólo los espermatozoides más aptos.

2) ***Reacción acrosómica***. Cuando el espermatozoide alcanza la membrana pelúcida y se pone en contacto con ella, en su parte frontal se desencadena un proceso llamado reacción acrosómica, que da lugar a múltiples áreas de fusión entre la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática del gameto. Ello genera la formación de poros —por los que se escapan las enzimas acrosómicas— y luego la **desaparición de ambas membranas** (figs. 19-19 y 19-21BC). Por consecuencia, en la región frontal del espermatozoide, en reemplazo de la desaparecida membrana plasmática queda expuesta al exterior una nueva membrana, la acrosómica interna (fig. 19-21C). El mecanismo molecular que lleva a la reacción acrosómica es el siguiente (fig. 19-22):

La **ZP3** de la membrana pelúcida se acopla a un **receptor** de la membrana plasmática del espermatozoide, que activa a una proteína G. Esta hace lo propio con la enzima fosfolipasa C, que genera inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol difosfato (PIP_2).

Como se vio en el capítulo 11-18, el IP_3 abre canales de Ca^{2+} en la membrana del REL y permite que el ion pase de ese organoide al citosol. Debido a que en el espermatozoide la mayor parte del IP_3 se convierte en inositol te-



trafosfato (IP_4) y a que éste abre canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, el ion ingresa desde el exterior y se incrementa aún más su concentración en el citosol. El pH citosólico también aumenta porque la entrada de Ca^{2+} desde el exterior se halla acoplada a la salida de H^+.

Por su parte, el DAG activa a la quinasa C, que desencadena una sucesión de fosforilaciones en varias proteínas.

La figura 19-22 muestra la activación de las fosfolipasas A y D por medio de la proteína G. Dado que la primera elimina un ácido graso de la fosfatidilcolina y la segunda remueve la colina, generan lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico (fig. 2-13), respectivamente.

Aunque no se ilustra en la figura 19-22, la proteína G activa también a la enzima adenilato ciclasa, que forma AMPc a partir de ATP. A su vez, el AMPc activa a la quinasa A, que fosforila a varias proteínas.

Finalmente, todos los cambios mencionados hacen que se formen múltiples áreas de fusión entre la membrana acrosómica externa y la membrana plasmática del espermatozoide, y que esas fusiones den origen a orificios de diámetros crecientes que eliminan a las membranas. En síntesis, dichos cambios desencadenan la reacción acrosómica (figs. 19-19 y 19-21BC).

En los puntos que siguen se verá cómo la reacción acrosómica hace posible el desprendimiento de la corona radiada del ovocito II, el pasaje del espermatozoide a través de la membrana pelúcida y la fusión de las membranas plasmáticas de los gametos.

3) ***Denudación***. La denudación consiste en el desprendimiento de la corona radiada del ovocito II. Las células foliculares de la corona son separa-

das por la **hialuronidasa** que sale de los acrosomas, ya que esta enzima hidroliza al ácido hialurónico que las mantiene unidas (fig. 19-21BC).

4) ***Penetración de la membrana pelúcida***. Como se vio, la membrana acrosómica interna queda expuesta cuando desaparecen la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa de la cabeza del espermatozoide. Posee el **receptor PH20** (por *posterior head*), que interactúa con la **ZP2** de la membrana pelúcida. Ello le permite al espermatozoide atravesar la membrana pelúcida en busca de la membrana plasmática del ovocito II. Lo consigue merced a la **acrosina**, pues esta enzima hidroliza el material que compone la membrana pelúcida y fabrica en ella un **túnel** que sigue una trayectoria diagonal (fig. 19-21D).

De igual manera que en la penetración de la corona radiada, el avance del espermatozoide se debe a la fuerza mecánica generada por los movimientos de **hiperactivación**. Esa fuerza es del orden de las 3.000 microdinas, suficiente para romper cualquier unión covalente.

Volviendo a la acrosina, no hidroliza masivamente a la membrana pelúcida, como cabría esperar de una enzima hidrolítica liberada abruptamente en el medio. Dijimos que fabrica un túnel, lo cual se explica porque hidroliza pequeñas y sucesivas porciones de la membrana pelúcida por delante del espermatozoide. La hidrólisis controlada se debe a que la enzima se libera como un precursor, la ***proacrosina***, la cual, a medida que el PH20 interactúa con nuevas ZP2 halladas en el camino, da lugar, en dos pasos, a las formas activas de la enzima, la α-acrosina y la β-acrosina. Como vemos, al igual que en la penetración de la corona radiada, el espermatozoide realiza esta tarea delicadamente y avanza por el derrotero que él mismo va creando.

5) ***Fusión***. Si bien la membrana pelúcida es atravesada por muchos espermatozoides, sólo uno establece íntimo contacto con el ovocito II, al cabo de lo cual cesan sus movimientos de hiperactivación. De inmediato, un sector de la membrana plasmática del espermatozoide ***se adhiere*** firmemente a la

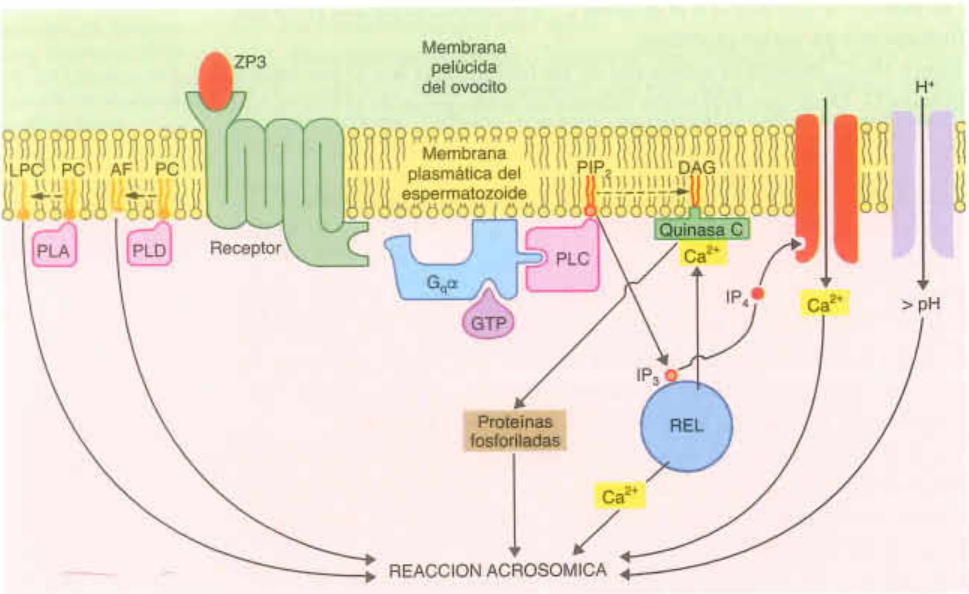


Fig. 19-22. Mecanismo molecular que desencadena la reacción acrosómica. *PLC, PLA* y *PLD*, fosfolipasas C, A y D, respectivamente; *PC*, fosfatidilcolina; *AF*, ácido fosfatídico; *LPC*, lisofosfatidilcolina.

membrana plasmática del ovocito II, para lo cual antes ambos gametos ***deben reconocerse***. Este suceso tiene lugar porque una proteína de la membrana del espermatozoide —llamada **Izumo** por el santuario japonés dedicado al matrimonio— interactúa con otra complementaria de la membrana del ovocito II —designada **Juno** por la diosa romana de la maternidad—.

Una vez producido el reconocimiento —imposible si los gametos fueran de especies diferentes—, las membranas adheridas se fusionan, por lo que entre ambos citoplasmas se establece la continuidad que permite la incorporación del contenido del espermatozoide en el interior del ovocito II (fig. 19-21E).

De parte del espermatozoide, la membrana plasmática involucrada en la fusión corresponde a la región ecuatorial de la cabeza (fig. 19-19). De parte del ovocito interviene cualquier zona de su extensa superficie, excepto la aledaña al núcleo (éste se halla detenido en la meiosis II). Recordemos que la membrana del ovocito posee numerosísimas microvellosidades, y es precisamente con ellas que se fusiona la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.

Una vez establecida la continuidad entre ambos citoplasmas, ingresan —en el siguiente orden— la parte posterior de la cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide. Luego lo hace la parte anterior de la cabeza, que es introducida en el ovocito mediante un proceso que remeda una fagocitosis. El material incorporado tiene una evolución dispar. Así, mientras el ADN y el centríolo del espermatozoide sobreviven, las mitocondrias y las fibras axonémicas no tardan en desaparecer.

La fusión de las membranas es mediada por **proteínas fusógenas** presentes en las dos bicapas lipídicas (cap. 7-41). Se han descubierto varias de estas proteínas en la membrana del espermatozoide; por ejemplo, las denominadas DE y fertilina, halladas en la rata y en el cobayo, respectivamente. La **DE** está integrada por dos proteínas de 37 kDa (*D* y *E*), adquiridas durante el paso del espermatozoide por el epidídimo. La **fertilina** también está integrada por dos proteínas —ambas transmembranosas—, una que se liga a la proteína complementaria del ovocito y otra que es responsable de la fusión.

Se sabe muy poco sobre las proteínas fusógenas de la membrana plasmática del ovocito; no se encontrarían en la región aledaña al núcleo, donde tampoco existen microvellosidades.

6) ***Bloqueo de la polispermia***. Un solo espermatozoide debe fusionarse con el ovocito. Para que sea así, tras la fusión de los gametos se producen cambios en algunas estructuras del ovocito, a fin de neutralizar la entrada de nuevos espermatozoides y evitar la polispermia. El origen de estos cambios se encuentra en un proceso denominado **reacción cortical**, que consiste en la exocitosis de las enzimas hidrolíticas contenidas en las numerosísimas vesículas de secreción —llamadas **gránulos corticales**— que la célula huevo posee por debajo de su membrana plasmática. Como todas las vesículas de secreción, son generadas en el complejo de Golgi.

Entre las enzimas expulsadas desde los gránulos corticales se encuentra una proteasa que modifica a la ZP3 e hidroliza a la ZP2. Tales cambios alteran la estructura de la membrana pelúcida, lo que provoca la inmovilización y la ulterior expulsión de los espermatozoides atrapados en ella.

Otro impedimento para la polispermia reside en la membrana de la célula huevo, que pierde la capacidad para fusionarse con las membranas de los

nuevos espermatozoides que se le acercan. La inhabilitación dependería de la presencia de algunos componentes recibidos de las membranas de los gránulos corticales, que se integran a la membrana plasmática de la célula huevo al producirse la exocitosis.

La secreción de los gránulos corticales es regulada (cap. 7-23) y se produce a consecuencia de un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. Como muestra la figura 19-23, este aumento es inducido por el IP_3, que libera el Ca^{2+} del REL (cap. 11-18). Obsérvese que el proceso se desencadena en el momento en que se produce la fusión entre los gametos, y que la sustancia inductora que activa al receptor de la membrana plasmática del todavía ovocito es una proteína de la membrana plasmática del espermatozoide. El receptor estimula a una proteína G asociada a la fosfolipasa C, que como se sabe actúa sobre el PIP_2 y genera DAG y el citado IP_3 (cap. 11-17). En el próximo punto se analizará el significado funcional del DAG.

El aumento del Ca^{2+} en el citosol comienza a producirse a los 10 segundos de iniciada la fusión de los gametos, mientras que la exocitosis de los gránulos corticales se desencadena casi 2 minutos después.

7) ***Reasunción de la segunda división meiótica por parte del ovocito II.*** Mientras bloquea la polispermia, el ovocito II reanuda la meiosis II. Esta genera dos células haploides, el óvulo —que no llega a formarse porque el ovocito II fecundado se convierte directamente en célula huevo— y el segundo cuerpo polar (fig. 19-21EF).

Como ilustra la figura 19-23, la reanudación de la meiosis II es promovida por el DAG mencionado en el punto anterior. Este compuesto activa a la quinasa C, la cual fosforila a las proteínas responsables del proceso.

8) ***Formación de los pronúcleos masculino y femenino.*** En la célula huevo los núcleos haploides del espermatozoide y del óvulo pasan a llamarse

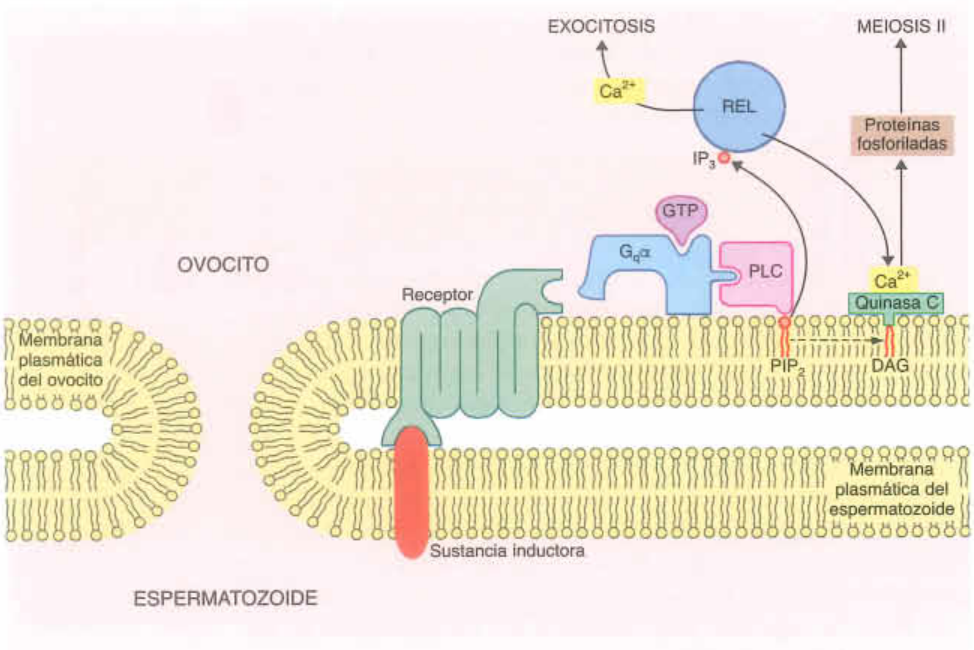


Fig. 19-23. Mecanismo molecular que desencadena la reacción cortical y la reanudación de la meiosis II en el ovocito II.

pronúcleo masculino y **pronúcleo femenino**, respectivamente (fig. 19-21F). Mientras se tornan esféricos, ambos se dirigen a la región central de la célula, donde se desenrollan sus cromosomas y se replica el ADN.

La descondensación de los cromosomas en el pronúcleo masculino merece una consideración especial. Es que en los espermatozoides el ADN no se halla asociado a histonas sino a otro tipo de proteínas básicas —llamadas **protaminas**—, que compactan al ADN mucho más que las histonas. Cuando el espermatozoide ingresa en el ovocito, las histonas reemplazan a las protaminas apenas concluye la descondensación de los cromosomas, y lo hacen muy rápidamente, en menos de 5 minutos.

9) ***Singamia***. Los pronúcleos se colocan uno muy cerca del otro en el centro de la célula huevo y pierden sus cariotecas (fig. 19-21G).

10) ***Anfimixis***. Finalmente, los cromosomas se vuelven a condensar y se ubican en el plano ecuatorial de la célula, del mismo modo que en una metafase mitótica común (fig. 19-21H).

Durante la anfimixis existe un par de centríolos en cada polo de la célula huevo. Debido a que los cuatro centríolos derivan de uno solo —el aportado por el espermatozoide (véase *Fusión*)—, éste debió duplicarse y más tarde debieron hacerlo sus dos centríolos hijos (cap. 18-12).

La anfimixis representa el fin de la fecundación; con ella se inicia la primera división de segmentación de la célula huevo, es decir, el desarrollo embrionario (figs. 19-3 y 19-21I) (véanse los capítulos 18-22 y 21-7).

LA MEIOSIS EN LAS CELULAS VEGETALES Y LA REPRODUCCION DE LAS PLANTAS

19-20. Los mecanismos celulares responsables de la reproducción de las plantas son diferentes de los existentes en los animales

Los mecanismos celulares que llevan a la reproducción de las plantas son bastante diferentes de los observados en los animales. En las plantas superiores el proceso comienza en los órganos reproductores masculino (antera) y femenino (ovario), los cuales generan **microsporocitos** y **megasporocitos**, respectivamente. Estos se dividen por meiosis, que es espórica y ocurre en un momento intermedio entre la formación de los gametos y la fecundación.

Como se observa en la figura 19-24, al cabo de la meiosis cada microsporocito origina cuatro **microsporos** haploides funcionales. Por su lado, a partir de cada megasporocito se forman cuatro **megasporos** haploides, tres de los cuales degeneran.

Los microsporos se convierten en **gametofitos masculinos**, conocidos comúnmente como **granos de polen**. En cambio, el megasporo que sobrevive pasa por tres divisiones mitóticas y da lugar al **gametofito femenino**, que contiene ocho núcleos haploides. En la fecundación participan tres de estos núcleos, el de la ***célula ovular*** y los dos ***núcleos polares***.

Por su lado, cada grano de polen genera una estructura accesoria llamada tubo polínico y dos ***espermatozoides*** haploides, uno de los cuales fecunda al núcleo de la célula ovular. Se forma así la **célula huevo** diploide, de la que se origina —en el interior de la semilla— el embrión de la nueva planta. El otro espermatozoide se une a los dos núcleos polares, lo que da lugar a un núcleo

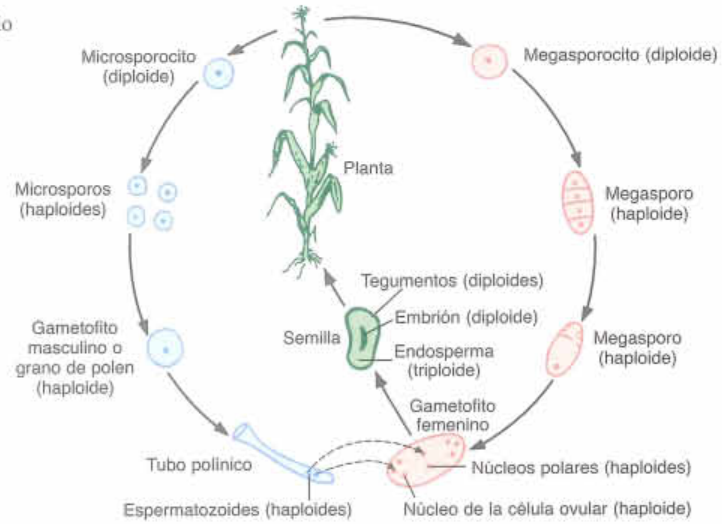


Fig. 19-24. Esquema que muestra el ciclo vital de una planta fanerógama.

triploide que al cabo de varias divisiones mitóticas genera el **endosperma** de la semilla, es decir, el material nutritivo del embrión. Como se ve, la semilla es un mosaico de tejidos en el que el embrión es diploide, el endosperma es triploide y los tegumentos poseen células diploides de origen materno.

BIBLIOGRAFIA

Börner G.V., Kleckner N. and Hunter N. (2004) Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. Cell 117:29.

Burks D.J., Carballada R., Moore H.D.M. and Saling P.M. (1995) Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. Science 269:83.

Carpenter A.T.C. (1979) Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 75:259.

Conrad M.N., Domínguez A.M. and Dresser M.E. (1997) Ndj1p, a meiotic telomere protein required for normal chromosome synapsis and segregation in yeast. Science 276:1252.

De Jonge C. (2005) Biological basis for human capacitation. Hum. Reprod. Update 11:205.

Dressler D. and Potter H. (1982) Molecular mechanism of genetic recombination. Annu. Rev. Biochem. 51:727.

Grindley N.D., Whiteson K.L. and Rice P.A. (2006) Mechanisms of site specific recombination. Annu Rev Biochem 75:567

Hauf S. and Watanabe Y. (2004) Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. Cell 119:317.

Hib J. (2006) Embriología Médica, 8ª Ed. Editorial Clareo, Buenos Aires.

Hib J. (2009) Histología de Di Fiore. Texto y atlas. 2ª Ed. Editorial Promed, Buenos Aires.

Jordan P. (2006) Initiation of homologous chromosome pairing during meiosis. Biochem. Soc. Trans. 34:545.

Messelsohn M.S. and Radding C.M. (1975) A general model for genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:358.

Moens P.B. (1987) Meiosis. Academic Press, New York.

Moreno R.D. and Alvarado C.P. (2006) The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. Mol. Reprod. Dev. 73:1430.

Moses M.J. (1968) Synaptonemal complex. Annu. Rev. Genet. 2: 363.

Murray A.W. and Szostak J.W. (1985) Chromosome segregation in mitosis and meiosis. Annu. Rev. Cell Biol. 1:289.

Roeder G.S. (1990) Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. Trends Genet. 6:385.

Sathananthan A.H. et al. (1991) Centrioles in the beginning of human development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4806.

Solari A.J. (1974) The behavior of the XY pair in mammals. Int. Rev. Cytol. 38:273.

Stein K.K., Primakoff P. and Myles D. (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. J. Cell Sci. 117:6269.

Tsaadon A., Eliyahu E., Shtraizent N. and Shalgi R. (2006) When a sperm meets an egg: block to polyspermy. Mol. Cell Endocrinol. 252:107.

Wassarman P.M. (2005) Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. J. Cell Physiol. 204:388.

Wassarman P.M., Jovine L. and Litscher E.S. (2004) Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. Cytogenet. Genome Res. 105:228

Wassarman P.M. and Mortillo S. (1991) Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. Int. Rev. Cytol. 130:85.

Whitaker M. (2006) Calcium at fertilization and in early development. Physiol. Rev. 86:25.

Yudin, A.I. et al. (2005) Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. Biol. Reprod. 73:1243

Citogenética 20

20-1. La unión de la biología celular con la genética dio origen a la citogenética

La **citogenética** se ocupa de las bases cromosómicas y moleculares de la herencia y ayuda a resolver importantes problemas en el campo de la medicina, la ganadería y la agricultura. Puesto que estos temas son abordados por los textos de genética, en este capítulo nos ocuparemos sólo de los que conciernen a la biología celular. Así, se analizarán las bases cromosómicas sobre las cuales se asientan los principios de la herencia, algunas aberraciones cromosómicas que ocurren en la especie humana —las mutaciones genéticas fueron estudiadas en el capítulo 17— y el papel que desempeñan los cromosomas en la evolución de las especies.

LEYES DE LA HERENCIA MENDELIANA

20-2. Mendel descubrió las leyes que llevan su nombre en el año 1865

Las bases que rigen la transmisión de los caracteres hereditarios deben buscarse en el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y en las consecuencias genéticas de este tipo de división (cap. 19-14). Sin embargo, cuando en 1865 Gregor J. Mendel descubrió las leyes fundamentales de la herencia nada se sabía sobre los cromosomas y la meiosis. Sus descubrimientos derivan de resultados de cruzamientos de plantas, analizados en forma cuantitativa aplicando un pensamiento abstracto genial.

Mendel realizó cruzamientos entre arvejas (*Pisum sativum*) que tenían pares de características diferentes y contrastantes. Utilizó plantas con semillas amarillas y verdes, con semillas lisas y rugosas, con flores blancas y rojas, con tallos altos y bajos, etc. Después del primer cruzamiento observó los híbridos resultantes en la primera generación filial ($\mathbf{F_1}$), cruzó los híbridos F_1 entre sí y estudió los resultados en la segunda generación filial ($\mathbf{F_2}$).

20-3. La ley de la segregación enuncia que los genes se distribuyen sin mezclarse

En un cruzamiento realizado entre progenitores (**P**) con semillas amarillas y verdes encontró, en la primera generación (F_1), que todos los híbridos tenían semillas amarillas y, por lo tanto, sólo la característica de uno de los padres. En el segundo cruzamiento (F_2), las plantas presentaban las caracterís-

ticas de sus antepasados con una proporción del 75% para las semillas amarillas y del 25% para las verdes, o sea, con una relación 3:1.

Mendel sostuvo que el color de las semillas era controlado por un "factor" que se transmitía a la descendencia por medio de los gametos, y que ese "factor" —conocido ahora como gen— podía transmitirse sin mezclarse con otros genes. Mendel enunció que los genes se separan en los híbridos F_1, entran en gametos diferentes y se distribuyen en los híbridos F_2. A causa de ello, este principio se denomina **ley de la segregación de los genes**.

Posteriormente observó que las plantas con semillas amarillas en la F_2 poseen diferentes constituciones genéticas. Un tercio de este grupo siempre da semillas amarillas en la generación F_3, pero los otros dos tercios originan plantas con semillas amarillas y verdes en la proporción 3:1. El 25% de plantas de la F_2 con semillas verdes, cuando se cruzan entre sí, producen siempre semillas verdes en la generación F_3. Ello demuestra que existen dos líneas puras para ese carácter.

Si en los cruzamientos se representa a los genes por medio de letras y se designa con la ***A*** al gen para el carácter amarillo y con la ***a*** al gen para el carácter verde, se obtiene el siguiente resultado:

Genes parentales	AA × aa		
Generación F_1	Aa × Aa		
Generación F_2	1 AA (homocigota dominante)	2 Aa (heterocigotas)	1 aa (homocigota recesiva)
Fenotipo	3 amarillas		1 verde

La generación F_1 posee ambos genes —***A*** y ***a***—, pero sólo el ***A*** es visible (color amarillo) porque es **dominante**. El gen ***a*** permanece oculto y se denomina **recesivo**. En los órganos reproductores los dos genes se separan y pasan a gametos diferentes. Así, la mitad de los gametos recibe el gen ***A*** y la otra mitad el gen ***a***. Dado que en ambos sexos las plantas generan los dos tipos de gametos, en la generación F_2 se producen tres combinaciones genéticas posibles en una relación 1:2:1. El 25% corresponde a plantas ***AA*** con semillas amarillas puras, el 50% a plantas ***Aa*** con semillas amarillas híbridas, y el 25% a plantas ***aa*** con semillas verdes puras.

Ahora es posible explicar los resultados de Mendel sobre la base del comportamiento de los cromosomas y de los genes. Estos se encuentran de a pares —uno en cada cromosoma homólogo— y los dos miembros de cada par se denominan **alelos**. En cada cromosoma homólogo el alelo ocupa un lugar particular llamado ***locus*** (plural, ***loci***).

En el caso ilustrado en la figura 20-1 se analiza el comportamiento de dos alelos homólogos en el ratón, los dominantes ***GG*** en el ratón gris y los recesivos ***gg*** en el ratón blanco. Como se sabe, ambos se separan en la meiosis y entran en los gametos. En la generación F_1 los ratones resultan híbridos, pues llevan los alelos ***G*** y ***g*** en los cromosomas homólogos. No obstante, todos son grises. Cuando se cruzan los híbridos F_1, sus gametos se unen en las combinaciones que muestra la figura 20-1. Los individuos que tienen alelos iguales

PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA

—*GG* o *gg*— se denominan **homocigotos**, y los que tienen alelos diferentes —*Gg*—, **heterocigotos**.

El término **genotipo** define la constitución genética del individuo; el término **fenotipo**, las características visibles. Por ejemplo, en las semillas analizadas anteriormente existen dos fenotipos en la F_2: el color amarillo y el color verde, tres amarillas por cada verde. Sin embargo, hay tres genotipos —*AA*, *Aa* y *aa*—, en proporción 1:2:1. Esto significa que existen dos proporciones mendelianas, la fenotípica (3:1) y la genotípica (1:2:1). El concepto de fenotipo se extiende a todas las expresiones de los genes, tanto a las visibles (por ejemplo, el color de la piel, el color de los ojos, etc.) como a las que no se detectan por la observación directa (por ejemplo, las distintas clases de hemoglobina, los grupos sanguíneos, etc.).

Si se cruzan ciertas plantas que tienen flores rojas y blancas, como la *Mirabilis jalapa*, es posible encontrar en la F_2 tres fenotipos y no dos: flores rojas, blancas y rosadas, que corresponden a los tres genotipos. Estos casos de herencia intermedia se deben a que en los heterocigotos (flores rosadas) la dominancia es incompleta. Aquí existe, por lo tanto, una **codominancia**. Como vemos, no siempre se cumple la regla de la dominancia y la recesividad. La codominancia es menos frecuente que la dominancia y la recesividad completas. En la codominancia se da un fenotipo con características intermedias respecto de los fenotipos de los progenitores, aunque sin que se mezclen los alelos.

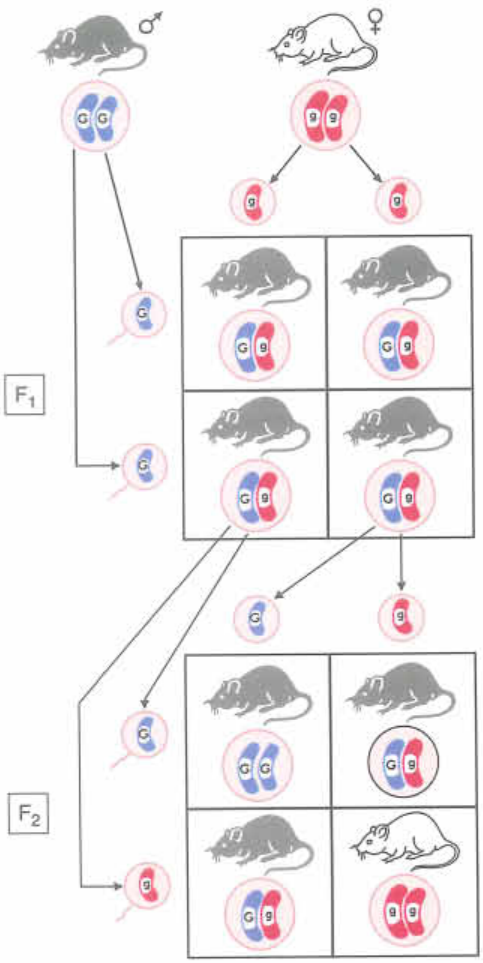


Fig. 20-1. Cruza monohíbrida entre un ratón gris (rasgo dominante) y uno blanco (rasgo recesivo). Se indica el paralelismo entre la distribución de los genes y los cromosomas, lo mismo que los genotipos resultantes en las generaciones F_1 y F_2.

20-4. La ley de la distribución independiente enuncia que los genes que se hallan en cromosomas diferentes se distribuyen independientemente

Mientras que el principio de la segregación se aplica al comportamiento de un solo par de genes, la **ley de la distribución independiente** describe el comportamiento simultáneo de dos pares de alelos cuando están localizados en cromosomas diferentes. Los genes que no están localizados en un mismo cromosoma se distribuyen independientemente en los gametos, de modo que la descendencia resulta híbrida en dos *loci*.

La figura 20-2 muestra el cruzamiento entre un cobayo negro de pelo corto (***BBSS***) con otro pardo de pelo largo (***bbss***). El animal ***BBSS*** produce sólo gametos ***BS*** y el animal ***bbss*** produce sólo gametos ***bs***. En la generación F_1 todos los cobayos son negros de pelo corto, pero heterocigotos (***BbSs***).

Cuando dos de los dihíbridos de la F_1 se aparean entre sí, debido a que cada uno produce cuatro tipos de gametos (***BS***, ***Bs***, ***bS*** y ***bs***), al producirse la fecundación se originan 16 combinaciones diferentes en los cigotos. Nueve individuos de la F_2 son de pelo negro y corto, tres de pelo negro y largo, tres de pelo pardo y corto, y uno de pelo pardo y largo. Esta relación fenotípica de 9:3:3:1 es característica del cruzamiento de dos pares de genes.

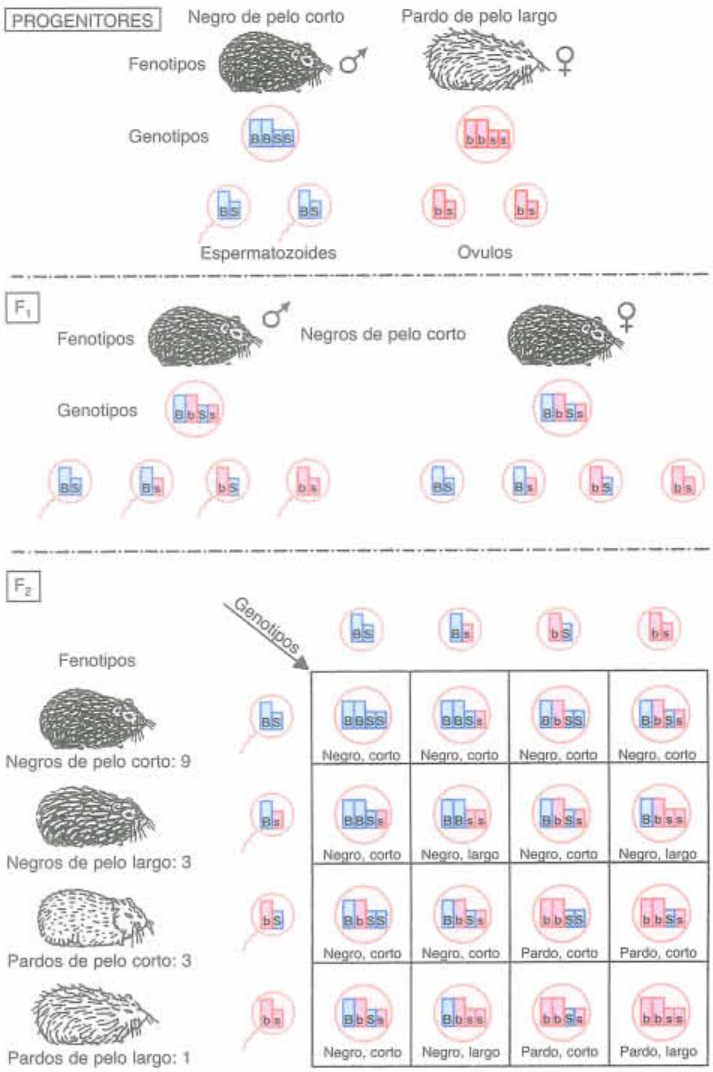


Fig. 20-2. Cruzamiento de un cobayo negro de pelo corto (rasgos dominantes) con otro pardo de pelo largo (rasgos recesivos). Obsérvese que los genes se segregan independientemente. (De C. A. Villée.)

20-5. Cuando los genes están en un mismo cromosoma se producen ligamientos entre ellos

Los ejemplos de cruzamientos genéticos anteriormente mencionados responden al hecho de que durante la meiosis los cromosomas —y con ellos los genes— se distribuyen al azar en las células de los descendientes (cap. 19-14). Empero, cuando se realizan estudios con objetivos semejantes en la mosca *Drosophila melanogaster*, se observa que la ley de la distribución independiente no tiene aplicación universal. Así, en los cruzamientos de dos o más pares de alelos existe una acentuada tendencia por parte de esos genes a quedar ligados, de modo que se produce entre ellos una proporción de combinaciones diferente de la esperada.

La *Drosophila* posee sólo cuatro pares de cromosomas, lo que eleva la posibilidad de que sus genes se encuentren en un mismo cromosoma. Si dos genes distintos —por ejemplo, ***A*** y ***B***— se localizan en un mismo cromoso-

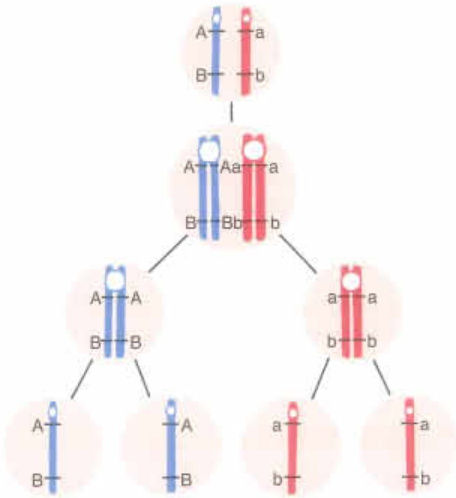


Fig. 20-3. Segregación de dos pares de genes (*AB* y *ab*) localizados en sendos cromosomas homólogos. Dado que durante la meiosis no se ha producido ninguna recombinación génica, se forman dos clases de gametos diferentes: *AB* y *ab*.

ma, y sus correspondientes recesivos —***a*** y ***b***— en el cromosoma homólogo, se obtienen, para esos genes, dos clases de gametos: ***AB*** y ***ab*** (y no los cuatro esperados: ***AB***, ***Ab***, ***aB*** y ***ab***).

La coexistencia de dos o más genes en el mismo cromosoma se denomina **ligamiento**. La figura 20-3 ilustra el mecanismo de la meiosis y la formación de los gametos en esos casos.

20-6. El ligamiento puede romperse por recombinación genética

Estudios posteriores demostraron que el ligamiento no es absoluto y que se rompe con relativa frecuencia. Esto se ilustra en la figura 20-4, que muestra una recombinación entre los genes ***A*** y ***B*** durante la meiosis. Por consecuencia, se forman cuatro clases de gametos, dos de los cuales poseen cromosomas que han experimentado **recombinación genética**. Es evidente que el intercambio de segmentos entre las cromátidas homólogas ha roto el ligamiento.

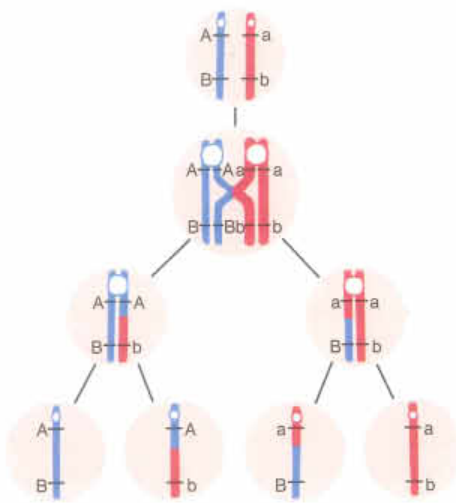


Fig. 20-4. Segregación de dos pares de genes (*AB* y *ab*) localizados en sendos cromosomas homólogos. Dado que durante la meiosis se ha producido una recombinación génica, se forman cuatro clases de gametos diferentes: *AB*, *Ab*, *aB* y *ab*.

La frecuencia de recombinación entre dos genes ligados en un cromosoma depende de la distancia que los separa. Los que se hallan próximos entre sí se recombinan con una frecuencia menor respecto de los que se encuentran apartados. Más aún, las proporciones de ligamientos permiten estimar la distancia entre los genes y averiguar sus posiciones relativas en el cromosoma.

En el capítulo 19-7 se señaló que la recombinación genética no es detectable microscópicamente. Sin embargo, los quiasmas que se observan en el diplonema son una representación de los sitios donde se produjo el intercambio. Por lo tanto, el número de recombinaciones puede ser estimado mediante el recuento de los quiasmas meióticos. En las especies con más quiasmas la posibilidad de recombinaciones es más elevada, y ello da lugar a mayores variaciones en la descendencia.

ABERRACIONES CROMOSOMICAS

20-7. Accidentalmente pueden producirse cambios en el cariotipo

El funcionamiento normal del sistema genético se mantiene por la constancia del material hereditario en los cromosomas. En los capítulos 12-12 y 19-1 se dijo que las células somáticas tienen un número diploide de cromosomas —dos juegos haploides de 23 cromosomas cada uno— y se analizó el cariotipo.

Accidentalmente pueden producirse ***cambios en el cariotipo***, que tienen diversas consecuencias genéticas. Así, los cromosomas pueden cambiar en su número o sufrir alteraciones en sus estructuras. Tales cuadros se denominan, respectivamente, **aberraciones cromosómicas numéricas** y **aberraciones cromosómicas estructurales**.

20-8. En las poliploidías las células contienen múltiplos del número haploide de cromosomas, diferentes del diploide

La tabla 20-1 muestra las dos clases principales de cambios en el número de cromosomas. En las **poliploidías** existe un número superior de conjuntos haploides —más de dos—, pero cada conjunto se presenta equilibrado. Así, en las células triploides existen tres conjuntos haploides normales, en las tetraploides, cuatro, etc. En las células somáticas las poliploidías pueden originarse por la reduplicación de los cromosomas (caps. 17-4 y 18-24); en los gametos, por la no separación de los cromosomas en cualquiera de las dos divisiones meióticas.

20-9. En las aneuploidías está afectado el número diploide de uno de los pares de cromosomas homólogos

En las **aneuploidías** hay ganancia o pérdida de uno o más cromosomas, por lo que el conjunto deja de ser equilibrado. Como la alteración es cuantitativa, el mensaje genético contenido en los cromosomas se mantiene intacto, aunque, como se verá, las aneuploidías pueden causar graves alteraciones en el organismo.

Las aneuploidías se producen por una falla en la separación de los cromosomas homólogos —denominada **no disyunción**— durante la división celular. La causa inmediata de la no disyunción es la falta de separación de una de las cromátidas hermanas en la anafase; así, al arribar la célula a la telofase, esa cromátida permanece en una de las células hijas junto a la cromátida

Tabla 20-1. Fórmulas y complementos cromosómicos en células poliploides y aneuploides

Cuadro clínico	*Fórmula*	*Complemento cromosómico**
Poliploidías		
Triploidía	3n	(ABCD) (ABCD) (ABCD)
Tetraploidía	4n	(ABCD) (ABCD) (ABCD) (ABCD)
Aneuploidías		
Monosomía	2n – 1	(ABCD) (ABC)
Trisomía	2n + 1	(ABCD) (ABCD) (B)
Tetrasomía	2n + 2	(ABCD) (ABCD) (B) (B)
Doble trisomía	2n + 1 + 1	(ABCD) (ABCD) (AC)
Nulisomía	2n – 2	(ABC) (ABC)

* Con el propósito de simplificar, en este ejemplo se utilizan sólo cuatro cromosomas, llamados A, B, C y D.

hermana. Ello da lugar a una célula con un cromosoma de menos y a otra con uno de más (fig. 20-5). La no disyunción se produce generalmente en la meiosis, pero también puede ocurrir en la mitosis.

La meiosis no disyuntiva da origen a un gameto aneuploide que, cuando se une a un gameto normal, forma un cigoto portador de una aneuploidía. Si al gameto aneuploide le falta un cromosoma, el cigoto resultará **monosómico**. Si le sobra un cromosoma, el cigoto será **trisómico**. Así, en los individuos monosómicos se produce la pérdida de uno de los cromosomas, mientras que en los trisómicos hay un cromosoma de más (tabla 20-1).

La mitosis no disyuntiva puede ocurrir en la división mitótica que precede a la formación de los gametos o en las células derivadas de la división del cigoto. En el primer caso, los efectos son similares a los producidos por la meiosis no disyuntiva. En el segundo —dado que la no disyunción tiene lugar en los primeros estadios del desarrollo embrionario— se originan **mosaicos**, es decir, individuos que exhiben líneas celulares somáticas con cariotipos diferentes.

20-10. Existen varias clases de aberraciones cromosómicas estructurales

Las aberraciones cromosómicas estructurales deben ser diferenciadas de las mutaciones génicas, en las cuales los cambios se producen a nivel molecular, al alterarse el código genético (cap. 17-16).

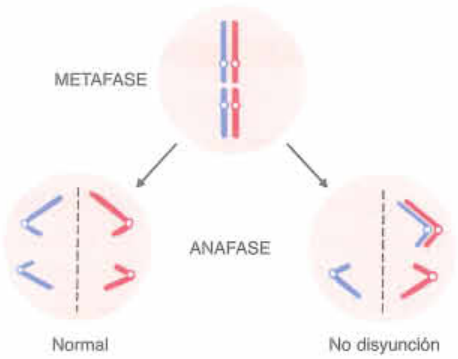


Fig. 20-5. No disyunción mitótica. **Arriba.** Metafase normal. **Abajo izquierda.** Anafase normal. **Abajo derecha.** Anafase no disyuntiva (da lugar a una célula hija con una trisomía y a otra con una monosomía).

Para comprender los mecanismos que dan lugar a las aberraciones cromosómicas estructurales es necesario recordar que los cromosomas contienen una sola molécula de ADN (cap. 12-1). En las aberraciones cromosómicas estructurales se produce una alteración en la composición o en la organización de uno o más cromosomas. Así, la ruptura de uno de ellos puede conducir, según el caso, a la pérdida de un segmento cromosómico —fenómeno denominado **deleción**—, a la **duplicación** de un segmento, a la **translocación** de segmentos entre cromosomas no homólogos o a la **inversión** de un segmento dentro del propio cromosoma. Estos defectos pueden ser detectados si se analiza a los cromosomas en su estado de máxima compactación, es decir, en la metafase (cap. 12-12) (fig. 12-15).

Deleción. La pérdida de material cromosómico puede ser terminal —en un extremo del cromosoma— o intersticial —en un segmento intermedio del cromosoma— (fig. 20-6A). En el primer caso la aberración es el resultado de una sola rotura; en el segundo, de dos. Usualmente las deleciones son letales en la condición homocigota, lo cual indica que la mayoría de los genes son imprescindibles para el desarrollo del organismo.

Duplicación. En esta aberración un segmento cromosómico está representado más de una vez en un mismo cromosoma (fig. 20-6B). Las duplicaciones producen efectos menos graves para los individuos que las deleciones.

Inversión. Aquí un segmento de un cromosoma se invierte 180°. Las inversiones se denominan pericéntricas cuando el segmento afectado incluye al centrómero, y paracéntricas cuando no lo incluye (fig. 20-6C).

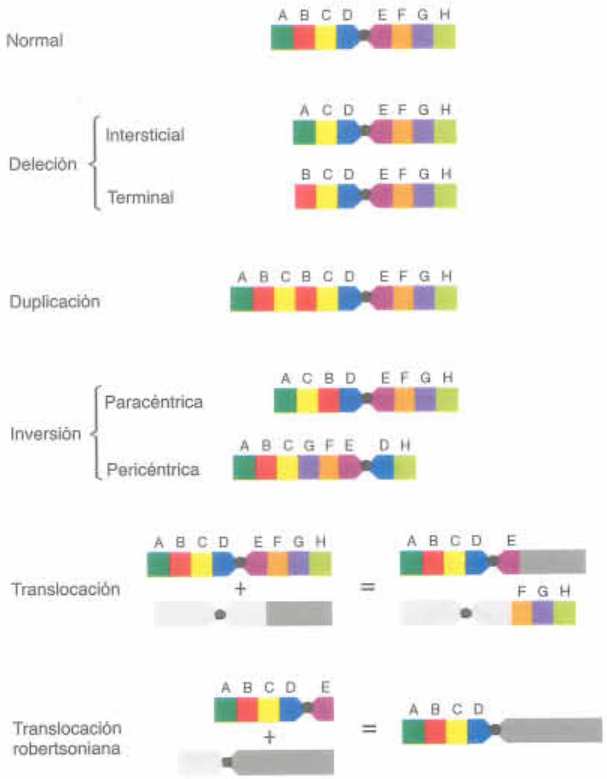


Fig. 20-6. Esquemas que muestran algunas de las aberraciones cromosómicas más comunes.

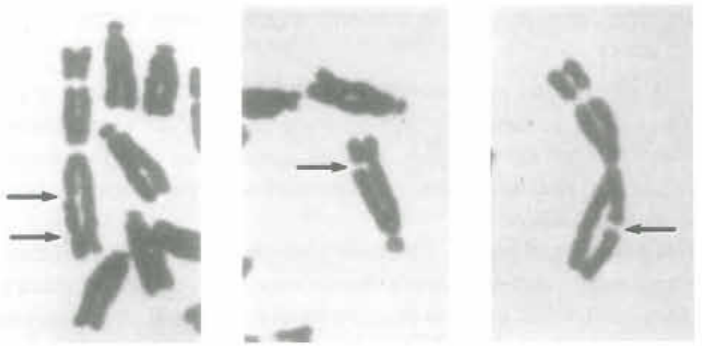


Fig. 20-7. Rupturas (*flechas*) de cromátidas producidas por radiación. (De H. Evans.)

Translocación. Esta aberración cromosómica se produce al romperse dos cromosomas no homólogos e intercambiarse sus segmentos (fig. 20-6D). Cuando la rotura se registra al lado del centrómero, ambos cromosomas pueden fusionarse y dar origen a un cromosoma metacéntrico más grande (fig. 20-6E). Este proceso —denominado ***translocación robertsoniana***— ha acontecido durante la filogenia de muchas especies, en las cuales han aparecido cromosomas nuevos pero su número se ha reducido.

20-11. Las radiaciones y los mutágenos químicos pueden producir roturas en los cromosomas

Igual que las mutaciones génicas, las aberraciones cromosómicas estructurales pueden producirse espontáneamente. No obstante, su frecuencia aumenta por la acción de agentes químicos mutágenos, ciertos virus o por efecto de las radiaciones ionizantes (rayos X, β, γ, luz ultravioleta) (fig. 20-7).

ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN LA ESPECIE HUMANA

20-12. Las células humanas pueden ser afectadas por aberraciones cromosómicas

Las alteraciones cromosómicas más comunes en el hombre están representadas por aneuploidías (monosomías y trisomías) y por aberraciones estructurales. Producen malformaciones congénitas graves, retardo mental y esterilidad, situaciones que actúan como mecanismos selectivos para eliminar de la población esos graves desequilibrios genéticos.

El diagnóstico de las aberraciones cromosómicas puede hacerse antes del nacimiento, mediante el estudio de unas pocas células fetales obtenidas del líquido amniótico (**amniocentesis**) o de las vellosidades coriónicas (**biopsia**) (fig. 20-8).

20-13. Una de las aneuploidías autosómicas más difundidas es el síndrome de Down

Entre las aneuploidías más difundidas se encuentra el ***síndrome de Down*** o ***mongolismo***, en el que existen tres cromosomas del par 21 (trisomía) en lugar de dos. Los afectados presentan un profundo defecto en el desarrollo del sistema nervioso central, retardo mental y otras malformaciones.

Esta aberración cromosómica es más frecuente a medida que aumenta la edad de la madre (caps. 19-4 y 19-15). Además, no se observan recurrencias familiares.

20-14. Otras aneuploidías se dan en los cromosomas de los pares 18 y 13

En la trisomía del par 18 —llamada ***síndrome de Edwards***— el niño es pequeño y débil, su cabeza se halla achatada lateralmente, los pabellones auriculares están mal desarrollados, las manos son cortas y las impresiones digitales son sumamente simples; presenta evidente retraso mental y la muerte ocurre antes del año de vida.

En la trisomía del par 13 —llamada ***síndrome de Patau***— aparecen múltiples malformaciones somáticas y retardo mental profundo. La cabeza es pequeña y a menudo los ojos son chicos o están ausentes; también son frecuentes el labio leporino y el paladar hendido. En la mayoría de los casos la muerte se produce poco después del nacimiento.

20-15. Las aneuploidías también pueden afectar a los cromosomas sexuales

En la tabla 20-2 se indican las aneuploidías más frecuentes en los cromosomas sexuales, junto con los nombres de los síndromes clínicos y la indicación de la presencia o ausencia de la cromatina sexual o cuerpo de Barr (caps. 12-11 y 14-12).

Síndrome de Klinefelter. Estos individuos poseen 47 cromosomas (44 autosomas + XXY y, por ende, cromatina sexual positiva). Son de apariencia normal, pero presentan testículos pequeños, ginecomastia, tendencia a una talla elevada, obesidad y menor desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. La espermatogénesis no se produce, lo cual determina la esterilidad que padecen. Se han detectado varones con 48 cromosomas (44 autosomas + XXXY), dos cuerpos de Barr, los signos del síndrome de Klinefelter que se acaba de mencionar y retardo mental. Menos frecuentes son los pacientes que tienen 49 cromosomas (44 autosomas + XXXXY), tres cuerpos de Barr, defectos esqueléticos, hipogenitalismo extremo y un coeficiente mental marcadamente bajo.

Síndrome XYY. Los individuos afectados poseen 47 cromosomas (44 autosomas + XYY). Se trata de varones de aspecto normal, altos, con trastornos de la personalidad.

Síndrome XXX. Se debe a la presencia de 47 cromosomas (44 autosomas

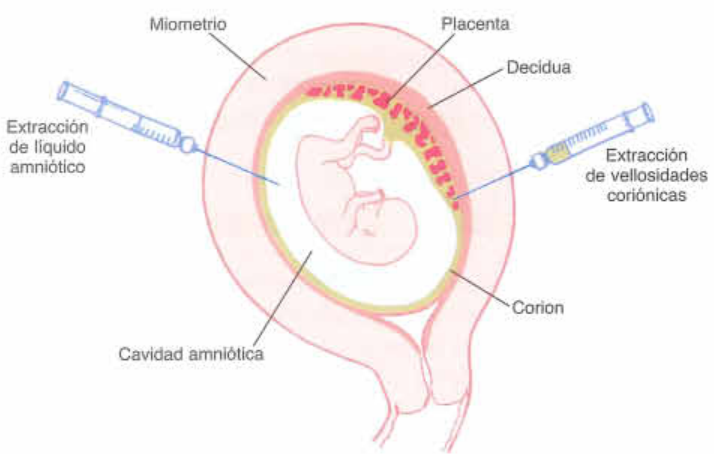


Fig. 20-8. Esquema que ilustra la realización de una amniocentesis para extraer células fetales del líquido amniótico, y de una punción biopsia para extraer vellosidades coriónicas.

Tabla 20-2. Aneuploidías sexuales en el hombre

	Cuadro clínico			*Cromatina sexual*
	Monosomía XO Turner 2n = 45	Disomía XY Normal 2n = 46	Trisomía XYY Síndrome XYY 2n = 47	0
	Disomía XX Normal 2n = 46	Trisomía XXY Klinefelter 2n = 47	Tetrasomía XXYY Klinefelter 2n = 48	1
	Trisomía XXX Metahembra 2n = 47	Tetrasomía XXXY Tipo Klinefelter 2n = 48		2
	Tetrasomía XXXX Metahembra 2n = 48	Pentasomía XXXXY Tipo Klinefelter 2n = 49		3
Fenotipo	Femenino	Masculino	Masculino	

+ XXX) y da lugar a mujeres con fenotipo prácticamente normal. Algunas presentan distintos grados de retardo mental o características psicóticas. En sus células se observan dos cuerpos de Barr. También se han detectado pacientes con 48 cromosomas (44 autosomas + XXXX), tres cuerpos de Barr y severo retardo mental.

Síndrome de Turner. En el cariotipo de estas pacientes existen 45 cromosomas (44 autosomas + X) y no aparece la cromatina sexual. Los individuos tienen fenotipo femenino, suelen ser de pequeña estatura, poseen membranas cervicales (pliegues de la piel que se extienden desde las mastoides hasta los hombros) y sus órganos sexuales internos son infantiles. El ovario no completa su formación y a causa de esta disgenesia ovárica no se desarrollan los caracteres sexuales secundarios.

Mosaicos. En los tejidos de estos individuos conviven células con distintos complementos cromosómicos. La tabla 20-3 ilustra los mosaicos de cromosomas sexuales más frecuentes, tanto en varones como en mujeres.

20-16. Existen varios cuadros producidos por aberraciones cromosómicas estructurales

La aberración cromosómica estructural más común en el ser humano se produce por la translocación de un segmento de uno de los cromosomas del par 21 a un cromosoma del par 13, 14 o 15 (fig. 20-9). Genera ***síndromes de Down***, pero menos graves y menos frecuentes —representan el 2% de los casos—, y su aparición no guarda relación con el aumento de la edad materna. A veces la presencia del segmento translocado se halla compensada por la ausencia del mismo segmento en un cromosoma del par 21. En este caso los individuos son fenotípicamente normales pero portadores de la aberración, por lo que pueden transferir la malformación a sus descendientes.

Tabla 20-3. Mosaicos cromosómicos sexuales

		Síndrome clínico	*Cromatina sexual*
Mujeres	XO / XY	Turner	–
	XO / XXY	Turner	– / +
	XO / XXX	Variable	– / ++
Varones	XX / XXY	Klinefelter	+
	XY / XXY	Klinefelter	+
	XXXY / XXXXY	Organos sexuales poco desarrollados	++ / +++
	XO / XY	Hermafrodita	–

El ***síndrome del maullido de gato*** se produce a consecuencia de una deleción en el brazo corto del cromosoma 5. Da lugar a múltiples malformaciones y a un acentuado retraso mental. Además, el niño emite un llanto extraño, semejante a un maullido.

Otros cuadros de aberraciones cromosómicas estructurales se originan por la deleción de una parte de uno de los cromosomas X (genera un cuadro semejante al ***síndrome de Turner***) o por la deleción del brazo corto o largo de uno de los cromosomas del par 18 (produce alteraciones faciales, esqueléticas y oftálmicas junto con un profundo retardo mental).

20-17. Algunos tumores muestran aberraciones cromosómicas en sus células

Las células cancerosas frecuentemente presentan aneuploidías, cromosomas rotos y aberraciones cromosómicas estructurales (translocaciones) (cap. 18-30). Por ejemplo, en la ***leucemia mieloide crónica*** aparece el llamado **cromosoma Filadelfia**, producto de una translocación entre los cromosomas 9 y 22 (cap. 18-31). En el ***retinoblastoma***, el defecto en ambos alelos del gen Rb puede deberse a deleciones en el brazo largo de los dos cromosomas del par 13 (cap. 18-32). En el ***linfoma de Burkitt*** se transloca una parte del cromosoma 8 al cromosoma 14. En algunos ***cánceres de pulmón*** se observa una deleción en el cromosoma 3.

PAPEL DESEMPEÑADO POR LOS CROMOSOMAS EN LA EVOLUCION

20-18. La citogenética impulsó el estudio de la evolución de las especies

El estudio de la evolución tomó gran impulso gracias al desarrollo de la citogenética, al poder compararse los genomas de especies emparentadas. La sistemática también experimentó un progreso considerable por el aporte de la citogenética, pues ésta le ha proporcionado muchos recursos para dilucidar interrelaciones entre diferentes categorías taxonómicas (como se sabe, las familias, géneros y especies se caracterizan por tener sistemas genéticos distintos).

El estudio del cariotipo de diversas especies ha permitido establecer una serie de hechos de gran interés, tanto en el reino animal como en el vegetal. En poblaciones salvajes se demostró que los individuos son, en cierto grado,

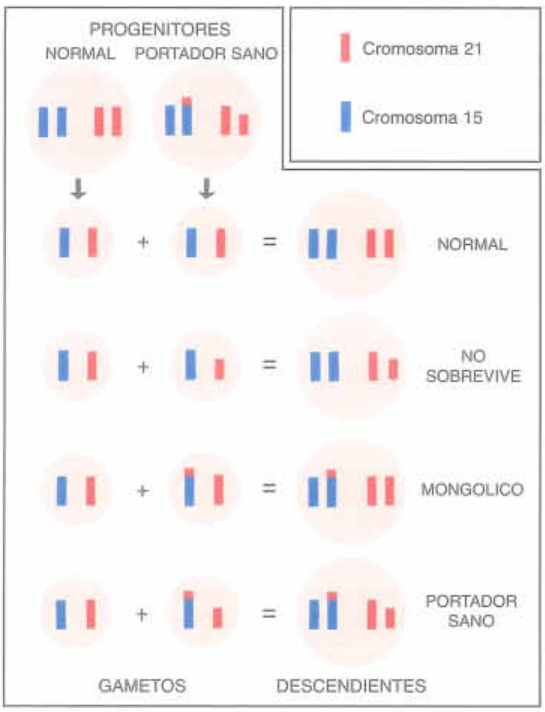


Fig. 20-9. Células somáticas (diploides) y gametos (haploides) de los progenitores cuando en el genotipo de uno de ellos existe una translocación de un segmento de un cromosoma del par 21 en un cromosoma del par 15. A la derecha se muestran las posibles células somáticas (diploides) de los descendientes.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

genéticamente heterocigotos. En algunos casos, los genes, aun cuando son idénticos, están ordenados de manera distinta a causa de alteraciones ocurridas en los segmentos cromosómicos. Estos cambios desempeñaron un papel preponderante en el mecanismo de formación de las especies.

La organización de los cromosomas y de los cariotipos observada en los individuos, las especies, los géneros y los grupos sistémicos mayores indica que en la evolución han intervenido diversos mecanismos cromosómicos. Las principales fuentes de variación han sido la aneuploidía y la poliploidía. La poliploidía no es tan importante en el reino animal. Entre los vertebrados, diversas clases de peces tienen distintos números de cromosomas. Los anfibios, en especial los anuros, se caracterizan por la presencia de un número fijo para cada familia. La variación en las aves y en los mamíferos se debe más a cambios en los cromosomas individuales y a mutaciones génicas que a modificaciones en el contenido total del material genético.

20-19. Se ha estudiado la evolución del cariotipo en los primates

Muchos de los trabajos sobre la evolución se refieren a la relación citogenética entre el hombre y los grandes monos (chimpancé, gorila, orangután). Dado que el hombre tiene 23 pares de cromosomas y los grandes monos poseen 24, en su evolución pudo haber tenido lugar por lo menos una translocación robertsoniana (sección 20-10). Se cree que el cromosoma 2 del hombre es el resultado de tal translocación a partir de dos cromosomas de los monos. Por otra parte, trece pares de cromosomas humanos son casi idénticos a otros tantos pares de cromosomas del chimpancé, y en los restantes cromosomas se observan inversiones pericéntricas y adición de material cromosó-

mico. En suma, en los primates la evolución de los cromosomas ha sido consecuencia de fusiones, translocaciones y, fundamentalmente, inversiones pericéntricas de segmentos cromosómicos, todo lo cual permitió seleccionar a los genes que dieron origen al *Homo sapiens*.

El análisis de la secuencia del ADN mitocondrial también tuvo un importante impacto en los estudios taxonómicos. Permitió establecer relaciones genealógicas entre especies íntimamente relacionadas —como la humana y la de los monos— y reconstruir el posible árbol evolutivo de esas especies.

BIBLIOGRAFIA

Brinkley B. R. and Hittelman W. N. (1975) Ultrastructure of mammalian chromosome aberrations. Int. Rev. Cytol. 42:49.

Bühler E. M. (1980) A synopsis of the human Y chromosome. Human Genet. 55:145.

Dutrillaux B. (1979) Chromosomal evolution in primates. Human Genet. 48:251.

Dutrillaux B. (1981) Les chromosomes des primates. La Recherche 12:1246.

Fuchs F. (1980) Genetic amniocentesis. Sci. Am. 242:47.

Gethart E. (1981) Sister chromatid exchange and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. Human Genet. 58:235.

Greagan R. P. and Ruddle F. H. (1977) New approaches to human gene mapping by somatic cell genetics. In: Molecular Structure of Human Chromosomes. Academic Press, New York.

Harnden D. (1982) Human cytogenetic nomenclature. Human Genet. 59:269.

Hasold T. J. and Jacobs P. A. (1984) Trisomy in man. Annu. Rev. Genet. 18:69.

Henderson S. A. (1969) Chromosome pairing, chiasmata, and crossing over. In: Handbook of Molecular Cytology. North-Holland Publishing, Amsterdam.

Hib J. (2006) Embriología Médica, 8ª Ed. Editorial Clareo, Buenos Aires.

Hook E. B. (1973) Behavioral implication of the human XYY genotype. Science 179:139.

John B. and Lewis K. R. (1973) The meiotic mechanism. In: Readings in Genetics and Evolution. Oxford University Press, Oxford.

Jukes T. (1983) Mitochondrial codes and evolution. Nature 301:19.

Kolata G. (1983) First trimester prenatal diagnosis. Science 221: 1031.

Latt S. A. and Schreck R. R. (1980) Sister chromatid exchange analysis. Human Genet. 32:297.

Levan A., Levan G. and Mitelman F. (1977) Chromosomes and cancer. Hereditas 86:15.

Lewin B. (2008) Genes, 9th Ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, USA.

Lewis K. R. and John B. (1964) The Matter of Mendelian Heredity. J. & A. Churchill, London.

Lyon M. F. (1972) X-chromosome inactivation and development patterns in mammals. Biol. Rev. 47:1.

Martin G. R. (1982) X-chromosome inactivation in mammals. Cell 29:721.

Olby R. C. (1966) Origins of Mendelism. Constable, London.

Ott J. (1985) Analysis of Human Genetic Linkage. University Press, Baltimore.

Pearson P. L. (1977) Banding patterns, chromosome polymorphism, and primate evolution. In: Molecular Structure of Human Chromosomes. Academic Press, New York.

Rowley J. D. (1983) Human oncogene locations and chromosome aberrations. Nature 301:290.

Sánchez O. and Yunis J. J. (1977) New chromosome techniques and their medical application. In: New Chromosome Syndromes. Academic Press, New York.

Sing L., Purdom I. F. and Jones K. W. (1980) Sex chromosome associated satellite DNA. Evolution and conservation. Chromosoma 79:137.

Solari A.J. (2004) Genética Humana, 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Stahl F. W. (1969) The Mechanics of Inheritance, 2nd Ed. Prentice-Hall, New Jersey.

Suzuki D. T., Griffiths A. J. F., Miller J. H. and Lewontin R. C. (1989) An Introduction to Genetic Analysis. W. H. Freeman & Co, San Francisco.

Swanson C. P., Metz T. and Young W. J. (1981) Cytogenetics: The Chromosome in Division, Inheritance, and Evolution. Prentice-Hall, New Jersey.

Taylor J. H. (1967) Meiosis. In: Encyclopaedia of Plant Physiology. Springer-Verlag, Berlin.

von Wettstein D. et al. (1984) The synaptonemal complex in genetic segregation. Annu. Rev. Genet. 18:331.

Wolff S. (1977) Sister chromatid exchange. Annu. Rev. Genet. 11: 183.

Yunis J. J., Tsai M. Y. and Willey A. M. (1977) Molecular Organization and Function of the Human Genome. Academic Press, New York.

Yunis J. J. and Prakash O. (1982) The origin of man: A chromosomal pictorial legacy. Science 215:1525.

Diferenciación celular 21

21-1. Introducción

En la primera parte de este capítulo, después de exponer las características generales de las diferenciaciones celulares, analizaremos los posibles mecanismos que generan las diferencias iniciales entre las células de los embriones más jóvenes. Luego veremos cómo se forma el cuerpo del embrión y estudiaremos los mecanismos que dan lugar a las diferenciaciones celulares —y el modo como se mantienen— en las etapas ulteriores del desarrollo. Finalmente, nos ocuparemos de los genes responsables del establecimiento del plan corporal en la mosca *Drosophila melanogaster* y de sus posibles equivalentes en los embriones de los vertebrados.

21-2. Características generales de la diferenciación celular

Cuando con la ayuda del microscopio se examinan las formas y las estructuras de las células del cuerpo humano, se concluye que existen alrededor de 200 tipos celulares diferentes. No obstante, el empleo de métodos que permiten estudiar las características bioquímicas y funcionales de las células revela que muchos de esos tipos celulares se subdividen en varios subtipos. El ejemplo más destacado es el de los linfocitos, ya que si bien son todos morfológicamente iguales, entre ellos existen diferencias bioquímicas y funcionales que permiten clasificarlos como linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T colaboradores y linfocitos NK. Pero eso no es todo, pues cada uno estos subtipos de linfocitos se subdividen en innumerables variedades, cada una portadora de una singularidad bioquímica diseñada para defender al organismo del ataque de un antígeno particular.

En términos moleculares, **diferenciación celular** significa actividad génica diversa en los distintos tipos de células de un organismo.

La especialización de las células implica la síntesis de proteínas específicas (como la hemoglobina en los eritrocitos, los anticuerpos en los linfocitos, los neurofilamentos en las neuronas, etc.); así, en cada tipo celular se expresa un gen singular, distinto de los expresados en los otros tipos celulares (en realidad, las diferencias no son determinadas por un solo gen sino por conjuntos de genes distintos). En el capítulo 14 se analizaron los mecanismos que regulan la expresión de los genes. Muchas de las actuales investigaciones en biología molecular procuran interpretar cómo se expresan los genes en las distintas clases de células.

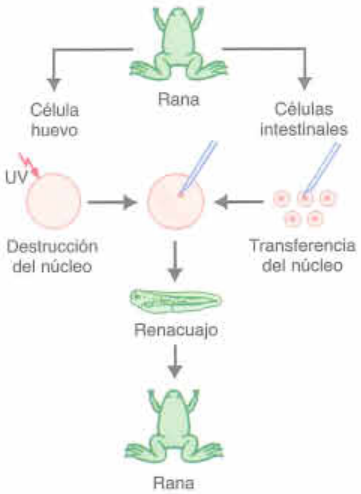


Fig. 21-1. Trasplante nuclear en la rana *Xenopus laevis*. Se extraen núcleos de células del intestino y se trasplantan a huevos cuyos núcleos son previamente destruidos con rayos ultravioletas. Puesto que se obtienen ranas adultas, puede afirmarse que las células somáticas contienen los genes que se necesitan para formar un organismo completo.

Obviamente, no todos los genes que se expresan en un determinado tipo celular lo hacen en forma exclusiva. Algunos se activan en todos los tipos celulares; se llaman **genes de mantenimiento** y son necesarios para construir los componentes comunes a todas las células (por ejemplo, las membranas celulares, los ribosomas, las mitocondrias, las enzimas glucolíticas, etc.). En cambio, los genes que se expresan en forma diferencial (como los de la hemoglobina, los anticuerpos, los neurofilamentos, etc.) ejercen las llamadas —en la jerga de la biología celular— **funciones de lujo**.

21-3. En las células diferenciadas el genoma permanece constante

La diferenciación celular no acarrea pérdida de información genética, de modo que en todas las células del organismo —cualquiera que sea su estado de diferenciación— existen conjuntos de genes idénticos, que son los mismos que se hallaban en la célula huevo. Una prueba rigurosa de ello provino de experimentos de **trasplante nuclear** en huevos de la rana *Xenopus*. Se destruyeron sus núcleos con luz ultravioleta y se les inyectaron núcleos somáticos de células intestinales completamente diferenciadas, provenientes del mismo animal. Como se observa en la figura 21-1, los huevos que recibieron un núcleo de célula intestinal se desarrollaron hasta formar ranas adultas normales, que además resultaron fértiles. Esto demuestra que las células somáticas conservan todos los genes requeridos para completar el ciclo vital de la rana, incluida la formación de sus células germinativas.

El trasplante nuclear es posible también en mamíferos. En el ratón el procedimiento se basa en la introducción de un núcleo somático de un embrión temprano en un cigoto recientemente fertilizado al que se le extraen con la misma pipeta los pronúcleos femenino y masculino (fig. 21-2). Como es lógico, la cría que resulta es genéticamente idéntica al embrión que aportó el núcleo. Procedimientos similares permiten la **clonación** de mamíferos de mayor tamaño, aunque con ellos la cría se gesta a partir de un ovocito al que se le extraen los cromosomas y se le introduce el núcleo diploide de una célula somática tomada generalmente de otro animal adulto.

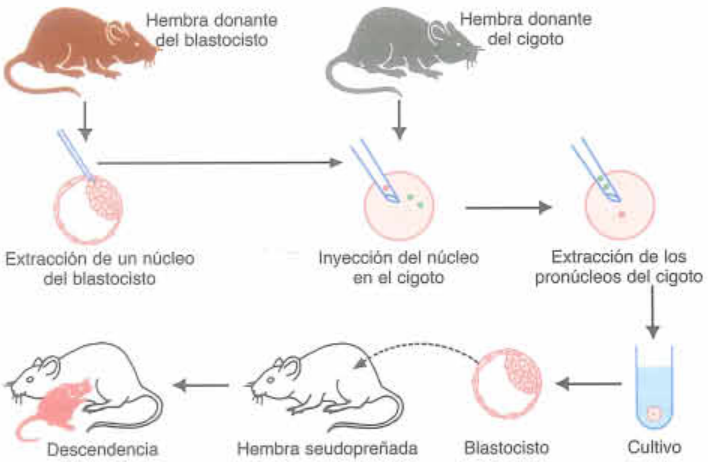


Fig. 21-2. Esquema de un trasplante nuclear en el ratón. Se toma un blastocisto de una hembra preñada y con una micropipeta se extrae el núcleo de una de sus células. Con la misma micropipeta ese núcleo se introduce en un cigoto recién formado aportado por otra hembra, al que posteriormente se le extraen los pronúcleos masculino y femenino. El embrión así obtenido se desarrolla *in vitro* hasta el período de blastocisto y se implanta en el útero de una hembra seudopreñada, donde evoluciona hasta el nacimiento.

21-4. El estudio de las interacciones nucleocitoplasmáticas ha aportado conocimientos sobre los mecanismos que establecen y mantienen las diferenciaciones celulares

Fig. 21-3. Formación de carioplastos y citoplastos a partir de células adheridas a una superficie de plástico y tratadas con citocalasina B.

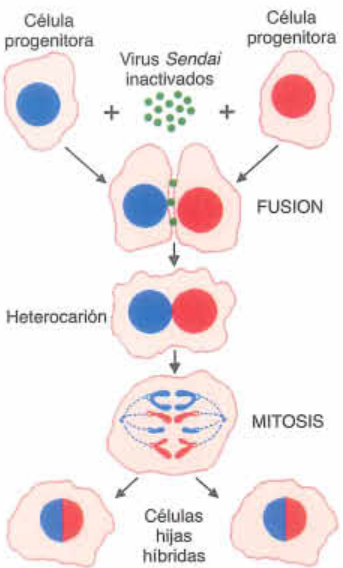
El núcleo y el citoplasma son interdependientes: uno no sobrevive sin la presencia del otro. Por ejemplo, mientras que el citoplasma posee las moléculas de ARN para la síntesis proteica y provee la mayor parte de la energía de la célula mediante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, el núcleo aporta la información genética que da lugar a esos ARN.

Las células *HeLa* —una línea celular indiferenciada derivada de un carcinoma uterino de una paciente llamada Henrietta Lacks— tienen la propiedad de multiplicarse indefinidamente en medios de cultivo. Pueden ser enucleadas por centrifugación tras el agregado de ***citocalasina B***, una droga que desarma los filamentos de actina (cap. 5-8). El tratamiento hace que los núcleos tiendan a escaparse de los citoplasmas, aunque inicialmente quedan conectados por un pequeño istmo (fig. 21-3). Cuando se desprenden se forman núcleos rodeados por una delgada envoltura citoplasmática (**carioplastos**) y citoplasmas sin núcleo (**citoplastos**). Ambos sobreviven muy poco tiempo. No obstante, los citoplastos, que permanecen viables por lo menos dos días después de la enucleación, realizan las principales funciones de las células normales. Esto indica que las funciones citoplasmáticas no dependen del núcleo celular, al menos durante un tiempo.

La interdependencia entre el núcleo y el citoplasma ha sido demostrada mediante experimentos de **fusión celular**. La fusión de células con ayuda del virus *Sendai* permite colocar núcleos en citoplasmas ajenos a ellos. El producto de la fusión de dos células diferentes se denomina **heterocarión** (cap. 3-6), que es una célula con dos núcleos de distinto origen. Como se ve en la figura 21-4, ambos núcleos pueden entrar en mitosis, formar una placa metafásica común, dividirse y producir células hijas híbridas con cromosomas de los dos núcleos progenitores.

Fig. 21-4. Fusión celular mediante el virus *Sendai*, que lleva a la producción de un heterocarión con dos núcleos. La célula híbrida es el resultado de una división sincrónica de ambos núcleos, los cuales son portadores de los cromosomas de las dos células progenitoras. (De N. R. Ringertz y R. E. Savage.)

Al fusionarse eritrocitos de pollo con células HeLa, los núcleos inactivos de los primeros se reactivan. Debe recordarse que los eritrocitos tienen una vida muy breve (cap. 18-1). Si bien en los mamíferos estas células pierden el núcleo cuando culmina su diferenciación, ello no ocurre en las aves, que lo retienen en forma inactiva. Así, los eritrocitos de pollo son células diferenciadas con un núcleo muy condensado, que no sintetiza ADN ni ARN. El interés de este heterocarión reside en que después de la fusión el núcleo del eritrocito aumenta su volumen unas 20 veces, dispersa su cromatina, comienza a sintetizar ARN, forma un nucléolo y su ADN llega a replicarse. En consecuencia, es capaz de reanudar la síntesis de ARN y de ADN a pesar de provenir de una célula en la que ambas actividades no se producen jamás.



La revelación más importante de este experimento de fusión celular es que la síntesis del ARN y del ADN en el núcleo es controlada por el citoplasma. Dicho de otro modo, sustancias presentes en el citoplasma ingresan en el núcleo e inducen la duplicación del ADN y la producción de los ARN.

21-5. El control de la actividad génica se cumple en varios niveles

Los experimentos de fusión de células y de trasplante nuclear han demostrado que los genes no se pierden en el curso de la diferenciación celular y que las diferencias entre las células especializadas se deben a que en cada una se expresan conjuntos de genes distintos. Por añadidura, los resultados obtenidos con los experimentos de fusión celular no dejan dudas de que el citoplasma contiene componentes capaces de regular la actividad de los genes. En la sección 21-7 se verá que si en la célula huevo esos componentes se distribuyeran asimétricamente en el citoplasma y, por lo tanto, se repartieran entre las células embrionarias hijas en forma despareja, podrían tener un papel fundamental en el establecimiento de las primeras diferenciaciones celulares en el embrión.

Como se señaló en los capítulos 14, 15 y 16, el control de la actividad génica se cumple en varios niveles, aunque el más generalizado es el control transcripcional. Debe recordarse cómo actúan los factores de transcripción, la importancia del grado de enrollamiento de la cromatina y los efectos regulatorios de la metilación de las citosinas. Vinculando este tema con el ***reparto asimétrico de los componentes citoplasmáticos de la célula huevo*** entre las primeras células embrionarias, diversas experiencias sugieren que algunos de esos componentes son factores de transcripción específicos que activan a genes especiales en las sucesivas células hijas a medida que la célula huevo se segmenta.

21-6. La aparición de las diferenciaciones celulares en el embrión y el modo como se desarrolla el plan corporal constituyen unos de los principales enigmas de la biología actual

La cuestión de cómo aparecen las diferencias entre las células en el curso de la embriogénesis constituye uno de los mayores enigmas de la biología del desarrollo. Si bien en los últimos años se han adquirido importantes conocimientos sobre el tema, los interrogantes esenciales continúan sin respuesta, aunque van cediendo a medida que progresa su investigación.

Otra cuestión que desvela a los investigadores es conocer cómo se establece la organización espacial del cuerpo. Se sabe que, conforme se reproducen y diferencian, las células embrionarias no quedan mezcladas para ordenarse

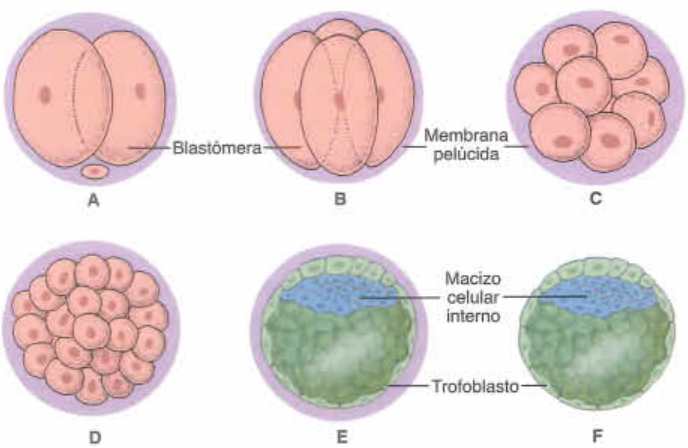


Fig. 21-5. Segmentación o clivaje de la célula huevo hasta la formación del blastocisto.

después, sino que paso a paso van construyendo el cuerpo a pequeña escala. Ello se debe a que las células arman una especie de andamiaje o modelo corporal, que constituye el basamento de la estructura definitiva del cuerpo.

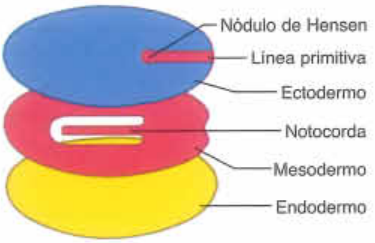


Fig. 21-6. Esquema de las hojas del embrión trilaminar de 21 días.

21-7. Los determinantes citoplasmáticos se reparten asimétricamente en la célula huevo

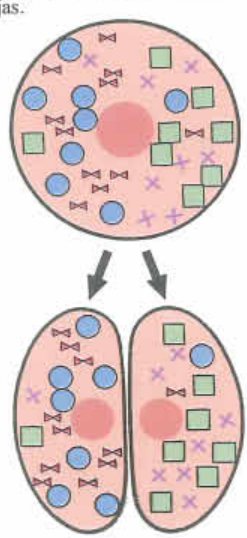
Los organismos multicelulares se desarrollan a partir de una célula huevo que, tras sucesivas divisiones y diferenciaciones, da origen a la totalidad de las células que componen los tejidos corporales. En primer término el cigoto experimenta una serie de divisiones rápidas en las cuales se duplica sólo el ADN (fig. 19-3). Debido a que el citoplasma de las sucesivas células hijas se va reduciendo o segmentando con cada ciclo divisional, a estas divisiones se las denomina de **segmentación** o **clivaje** (cap. 18-22) (fig. 21-5).

Cabe señalar que a partir del estadio de 16 células los citoplasmas se vinculan por uniones comunicantes (cap. 6-14) y las células periféricas se enlazan entre sí por uniones oclusivas (cap. 6-11). Cuando el embrión alcanza ese estadio adquiere la forma de una esfera sólida con aspecto de mora, motivo por el cual recibe el nombre de **mórula** (fig. 21-5D).

Posteriormente el embrión se convierte en una esfera hueca —denominada **blastocisto** (fig. 21-5EF)— en la que se visualizan dos tipos de tejidos, el **macizo celular interno**, primordio del futuro cuerpo del individuo, y el **trofoblasto**, que interviene en la formación de la placenta. Una semana después el macizo celular interno da lugar a un embrión plano discoidal compuesto por dos capas epiteliales superpuestas. Estas se llaman **epiblasto** e **hipoblasto** y existen entre ellas inequívocos signos de diferenciación. Al cabo de otra semana el embrión posee no dos sino tres capas epiteliales diferentes, denominadas **ectodermo**, **mesodermo** y **endodermo** (fig. 21-6).

Nos ocuparemos ahora de describir cómo surgen las diferencias iniciales entre las células del embrión primitivo. Dado que las células más tempranas no escapan a la regla de contener los mismos genes que la célula huevo, las desigualdades iniciales entre ellas deben buscarse en las moléculas distribuidas en sus citoplasmas, que heredan al segmentarse la célula huevo. En efecto, se considera que el citoplasma de la célula huevo contiene —asimétricamente distribuidas— moléculas que se reparten de manera desigual entre las primeras células del embrión y que influyen en la actividad de sus genes (fig. 21-7). Así, esas moléculas —que llevan el nombre de **determinantes citoplasmáticos** del desarrollo— actuarían como factores de transcripción específicos (cap. 14-7 y sección 21-5).

Fig. 21-7. Arriba. Determinantes citoplasmáticos del desarrollo en la célula huevo. **Abajo.** Obsérvese su reparto asimétrico entre las células hijas.



21-8. La idea de la distribución asimétrica de los determinantes citoplasmáticos fue presentada hace más de 100 años

La idea de que el citoplasma de la célula huevo contiene determinantes que se distribuyen en forma desigual entre las células hijas y afectan la actividad nuclear no es nueva. En la edición de 1896 de la clásica obra de E. B. Wilson, *The Cell in Development and Heredity*, el desarrollo embrionario primitivo aparece resumido de la siguiente manera:

"Si la cromatina fuese el idioplasma [término antiguo aplicado a los genes] en el cual se reuniera la suma total de las fuerzas de la herencia, y se distribuyera por igual con cada división celular, ¿de qué manera podría variar su modo de acción en las distintas células para causar diferencias de estructuras [es decir, diferenciación]? Por la influencia del idioplasma, el citoplasma de la célula huevo, o de los blastómeros derivados de ésta, experimenta cambios específicos y progresivos, y cada cambio reacciona sobre el núcleo e incita un nuevo cambio. Estos cambios difieren en las distintas regiones de la célula huevo debido a diferencias preexistentes —químicas y físicas— en la estructura citoplasmática, y éstas constituyen las condiciones bajo cuya influencia actúa el núcleo".

Como vemos, algunos de nuestros conceptos sobre el desarrollo han cambiado poco en el curso de los años. Por otro lado, a lo largo del camino hemos aprendido bastante acerca de cómo se controlan los genes. Los métodos de estudio actuales han hecho del control de la actividad génica uno de los campos de la ciencia biológica que avanza con mayor celeridad. Así, la sensación de optimismo de quienes creen que se llegará muy pronto a comprender detalladamente cómo se controlan los genes durante el desarrollo embrionario parece justificada.

21-9. La segregación de los determinantes citoplasmáticos es fácilmente detectable en algunas especies

En algunas especies la segregación de los componentes citoplasmáticos de la célula huevo es evidente. Un buen ejemplo lo proporcionan los huevos de anfibios (y otras especies), ya que contienen en sus citoplasmas una región llamada ***plasma germinativo***, que puede reconocerse porque posee unos gránulos especiales. Al culminar la segmentación, esa región del citoplasma de la célula huevo da origen a las células germinativas del nuevo organismo. Por lo tanto, cuando se irradia con luz ultravioleta el plasma germinativo de los huevos, los animales resultan estériles. En cambio, si se inyectan plasmas germinativos en otros puntos del huevo, en el individuo adulto aparecen células germinativas en localizaciones anormales.

21-10. Los ovocitos acumulan sustancias para ser usadas durante el desarrollo incipiente del nuevo individuo

En general, los ovocitos —y por ende, los cigotos— son muy voluminosos, ya que acumulan muchas de las moléculas y de las estructuras celulares que se necesitan para que se concreten las primeras etapas del desarrollo embrionario. Por ejemplo, el ovocito de la rana ***Xenopus laevis*** contiene 100.000 veces más ARN polimerasas, histonas, mitocondrias y ribosomas que una célula somática del mismo animal adulto. Una de las razones para acumular estos materiales —y no tener que fabricarlos durante la embriogénesis temprana— es la extraordinaria rapidez de las divisiones celulares durante la segmentación o clivaje de la célula huevo. La velocidad es tan alta que no da tiempo para que se sinteticen nuevos ARN y proteínas. Se sabe que la mayoría de estas moléculas se forman durante la ovogénesis, de modo que están en el citoplasma del ovocito mucho antes de que se produzca la fecundación. Obviamente, tales moléculas son codificadas por genes pertenecientes a la madre, no al embrión.

El ovocito de *Xenopus laevis* presenta una evidente asimetría, pues uno de sus hemisferios está pigmentado y el otro no debido a que es rico en vitelo (fig. 21-9A). Ambos hemisferios son conocidos como ***polo animal*** y ***polo vegetal***, respectivamente (fig. 21-9B). Esto le permite al huevo camuflarse cuando es depositado en lagunas.

La primera división de segmentación de la célula huevo tiene lugar 90 minutos después de la fertilización. Las once divisiones siguientes se producen cada 30 minutos, en forma sincrónica. Compárese este tiempo con el de 24 horas utilizado por una célula común para dividirse. La producción de ciclos celulares tan cortos se debe a que en el ADN de las primeras células embrionarias aparecen muchos más orígenes de replicación (lo que acorta la fase S) y a que las células omiten las fases G1 y G2. Así, cada mitosis es seguida por otra en forma inmediata. El ARN del embrión recién comienza a sintetizarse a partir de la duodécima división de segmentación (4.000 células).

21-11. En los embriones de mamíferos las primeras ocho células son totipotentes

A partir de la primera división de segmentación, la dispar distribución de las moléculas contenidas en la célula huevo prosigue —diversificándose cada vez más— en las sucesivas generaciones de células, lo cual se prolongaría hasta la formación del embrión de tres capas.

No obstante, en los mamíferos lo antedicho no es aplicable hasta la cuarta división de segmentación, ya que al cabo de las tres primeras, al formarse el embrión de 8 células, entre éstas y el cigoto aparentemente no existe diferenciación. Así, hasta ese estadio cada una de las células es **totipotente**, es decir, puede generar un organismo completo, como la propia célula huevo. Esta condición es la que hace posible el desarrollo de gemelos idénticos. En síntesis, es probable que en los citoplasmas de las primeras 8 células embrionarias existan moléculas cuantitativa y cualitativamente equivalentes a las de la célula huevo, lo cual indicaría que hasta ese momento su reparto fue parejo.

21-12. En las etapas más primitivas del desarrollo embrionario las células se diferenciarían de acuerdo con sus posiciones

En los embriones de mamíferos no se descarta el siguiente mecanismo para la generación de las primeras diferenciaciones celulares. Durante el traslado del embrión por la trompa de Falopio, sus células serían alcanzadas por diferentes concentraciones de sustancias presentes en el medio, de acuerdo con las posiciones que ocupan en la mórula. Así, cuanto más profunda es la ubicación de una célula en la mórula, menos concentradas le llegarían tales sustancias, y esa disimilitud podría contribuir al desencadenamiento de las primeras diferenciaciones celulares. Cabe señalar que las sustancias que ingresan en el embrión se propagan de una célula a otra a través de las uniones comunicantes, aparecidas apenas se constituye la mórula, cuando se alcanza el estadio de 16 células (sección 21-7).

Lleva el nombre de **morfógeno** toda sustancia difusible que produce respuestas diferentes en células idénticas según el nivel de concentración con

que llega a ellas. La calidad de la respuesta —en este caso, el tipo de diferenciación— se debería a que en las células inducidas se activarían genes distintos cuando el morfógeno se halla por debajo o por encima de sucesivos umbrales de concentración.

21-13. Los valores posicionales de las células embrionarias crean las bases para la aparición de los fenómenos inductivos

Las sustancias involucradas en la generación de las primeras diferenciaciones tienen una responsabilidad adicional: dejar establecidos los cimientos que condicionan la aparición de las diferenciaciones futuras. En efecto, a medida que los grupos celulares se ubican en sus correspondientes emplazamientos corporales, esas sustancias les confieren a las células determinados **valores posicionales**, distintos entre sí.

Estos valores comienzan a expresarse en las células de ambas capas del **embrión plano bilaminar**, y a expandirse a partir del momento en que se establecen las tres capas superpuestas del **embrión plano trilaminar** (sección 21-7) (fig. 21-6), lo cual da lugar a relaciones de vecindad entre grupos celulares diferentes que hacen posible la aparición de interacciones de unos sobre otros.

En ese contexto una célula puede actuar sobre otra, la primera emitiendo una señal y la segunda diferenciándose, al posibilitar sus respectivos valores posicionales tal acción y tal reacción. En otras palabras, los valores posicionales crean las bases para la aparición de los **fenómenos inductivos** propulsores de la mayor parte de las diferenciaciones venideras. Los estudiaremos después de analizar cómo se establece el modelo corporal en los embriones de los mamíferos.

21-14. El plan corporal se establece muy temprano en los embriones

En los embriones de los mamíferos, las ***polaridades corporales*** —o sea, los ejes cefalocaudal, dorsoventral y mediolateral del cuerpo— se instauran apenas comienza a formarse el mesodermo, la tercera en aparecer de las capas epiteliales que integran el disco embrionario de 21 días (fig. 21-6). Los puntos de referencia para esas coordenadas son el **nódulo de Hensen** y **la línea primitiva**, donde se originan la notocorda y las restantes partes del mesodermo, es decir, la placa precordal, la placa cardiogénica, el mesodermo branquial, los somitas, los gononefrótomos y los mesodermos laterales (fig. 21-8).

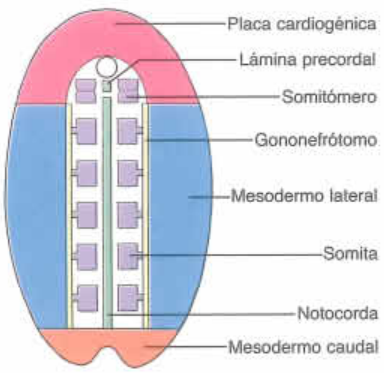


Fig. 21-8. Distintos sectores en que se segmenta la hoja mesodérmica del embrión de 21 días, al que le confieren una evidente polaridad corporal.

El embrión plano trilaminar no tarda en ingresar en una etapa saliente de su desarrollo y a la vez crucial para el establecimiento del modelo a partir del cual se formará el cuerpo del futuro individuo. En ella el disco embrionario se pliega tanto longitudinal como transversalmente, lo que genera un **cuerpo cilíndrico**, con sus extremos cefálico y caudal, sus caras ventral y dorsal y sus lados derecho e izquierdo perfectamente identificables. Más aún, en su dorso —previa aparición de un surco ectodérmico— se forma el **tubo neural**, donde es posible distinguir una sutil **metamerización** (o segmentación), particularmente en el prosencéfalo y en el rombencéfalo. Los segmentos en que se divide el prosencéfalo se denominan ***prosómeras***; los del rombencéfalo, ***rombómeras***. Una vez formado el tubo

neural, a los lados de la médula espinal quedan situados los **somitas**, cuyos bloques le confieren al cuerpo una segunda metamerización (fig. 21-8).

Junto con el establecimiento del plan general del cuerpo comienzan a aparecer los esbozos y a diferenciarse las células y tejidos de prácticamente todos los órganos corporales. El primer sistema orgánico que aparece —y funciona— es el cardiocirculatorio, cuya sangre en poco tiempo más ha de transportar, entre otros elementos, a las sustancias inductoras de múltiples diferenciaciones (sección 21-18).

21-15. Las diferenciaciones generadas por fenómenos inductivos comienzan en el embrión bilaminar

Las **inducciones** son procesos por los cuales las células de algunos tejidos incitan a las células de otros tejidos a que se diferencien, es decir, a que se transformen en otros tipos celulares (según la oportunidad, también pueden hacer que mueran, cambien su ritmo de proliferación o se movilicen). La manifestación de este mecanismo biológico revela la existencia de por lo menos tres grupos celulares distintos: unos que se comportan como **inductores**, otros que son **inducidos** y otros que no inducen ni se dejan inducir.

Para que las células puedan ser inducidas tienen que ser **competentes**, es decir, deben tener la capacidad de reaccionar con un cambio (diferenciación) ante la presencia de una **sustancia inductora**. Tal competencia abarca un período de tiempo muy preciso, de modo que si el inductor actúa antes o después del momento adecuado, su influencia es nula; no obstante, en algunos casos una misma célula puede seguir distintas vías de diferenciación según el momento en que la influye el inductor. Por su parte, a menudo los tejidos inductores también tienen un tiempo limitado para ejercer sus acciones inductivas.

Un ejemplo de inducción y de competencia lo ofrecen la notocorda y el ectodermo situado por encima (fig. 21-6): la notocorda carece de acción inductiva sobre el endodermo y el resto del mesodermo debido a que estos tejidos no son competentes como lo es el ectodermo. Parte de éste se diferencia en tejido nervioso al ser inducido precisamente por la notocorda, único tejido habilitado para tal fin. Vemos entonces que la notocorda y el ectodermo son diferentes entre sí y respecto de los otros tejidos no sólo por sus localizaciones y características morfológicas sino también por sus comportamientos inductivos. Estos estados de diferenciación derivan de las historias previas de los grupos celulares, que poseyeron distintos valores posicionales según los determinantes citoplasmáticos que heredaron de la célula huevo.

En los embriones tempranos, el tipo de inducción que acabamos de analizar exige que los tejidos participantes sean vecinos, ya que el tejido inductor ejerce su influencia a través de moléculas difusibles que secreta en el medio y que alcanzan al tejido competente si éste se encuentra en las inmediaciones (secreción paracrina). Cabe agregar que el tejido vecino reaccionará —es decir, se comportará como competente— únicamente si sus células poseen receptores específicos para las moléculas inductoras.

Los fenómenos inductivos suelen producirse en forma encadenada. Un ejemplo de inducción en cadena lo provee el desarrollo del ojo. El proceso comienza con la notocorda, que como se acaba de ver induce al ectodermo situado por encima para que se convierta en tejido nervioso. A continuación,

del tubo neural surge la vesícula óptica, que induce al ectodermo adyacente para que se convierta en el cristalino del ojo. Luego, el cristalino y la vesícula óptica inducen al mesodermo circundante para que se transforme en la coroides y la esclerótica, y así sucesivamente. Como se ve, después de ser inducidos, los tejidos recién formados se comportaron como inductores.

21-16. El conocimiento de las bases moleculares del desarrollo de los vertebrados proviene principalmente de estudios realizados en la rana *Xenopus laevis*

La mayor parte del conocimiento de las bases moleculares del desarrollo embrionario de los vertebrados proviene de estudios realizados en la rana *Xenopus laevis*, gracias a los cuales se descubrieron numerosas moléculas con probada capacidad inductora. Para analizar la actuación de esas moléculas es necesario hacer una breve descripción del desarrollo temprano de *Xenopus* a partir del ovocito estudiado en la sección 21-10.

Cuando el espermatozoide fecunda al ovocito —lo hace en un punto de su polo animal (fig. 21-9A)—, la parte más superficial de la corteza de la célula huevo forma microtúbulos y gira sobre el citoplasma subyacente desplazando al polo animal unos 30°. Como consecuencia, aparece una zona con distinta pigmentación y forma de medialuna entre los polos animal y vegetal de la célula huevo (fig. 21-9B). Esta medialuna marca el futuro lado dorsal del embrión.

La fecundación desencadena en la célula huevo el inicio de las divisiones de segmentación o clivaje (cap. 18-22 y sección 21-10), al cabo de las cuales se forma la **blástula**, cuyas células se llaman **blastómeras**. Como muestra la figura 21-9C2, en el interior del polo animal de la blástula existe una cavidad denominada **blastocele**.

Cuando concluyen las divisiones de segmentación, en el lado dorsal de la blástula aparece una incipiente invaginación curva llamada **blastoporo**, que crece progresivamente hasta convertirse en un círculo. El labio dorsal del blastoporo se localiza en las antípodas del punto de entrada del espermatozoide —en la medialuna dorsal antes mencionada—, donde determina la posición del lado dorsal del embrión (fig. 21-9C2). Más tarde el blastoporo determina también el lado caudal, pues al concluir la gastrulación se transforma en el ano (fig. 21-9G). Las referencias espaciales de los lados dorsal y ventral permiten trazar, respectivamente, los ejes dorsoventral y anteroposterior del cuerpo y, con ambas coordenadas, establecer las ubicaciones de sus lados derecho e izquierdo.

El blastoporo es la estructura cardinal de la **gastrulación**, pues hacia él se movilizan las células superficiales de la blástula para ingresar en el interior del embrión. Las primeras células que se incorporan son las del futuro endodermo, después de las cuales lo hacen las del futuro mesodermo.

El producto de la gastrulación es la **gástrula**, que como muestra la figura 21-9DEF sigue siendo esférica y posee una cavidad en continuo crecimiento. Esta corresponde al intestino primitivo con su pared de **endodermo**, en torno del cual se encuentran el **mesodermo** y el **ectodermo**.

El endodermo y el ectodermo derivan —respectivamente— de las células de los polos vegetal y animal de la blástula, a la que es necesario volver para estudiar el origen del mesodermo. Es que en su polo vegetal se sintetiza la proteína **VegT** (por *vegetal-T factor*), que tiene la función de promover la sín-

tesis de varias moléculas pertenecientes a la familia TGF-β —por ejemplo, las proteínas **Xnr-1**, **-2** y **-4** (por *Xenopus nodal related*)—, las cuales inducen a la franja de células de la corteza situada entre los polos animal y vegetal a que se convierta en mesodermo (fig. 21-9C1).

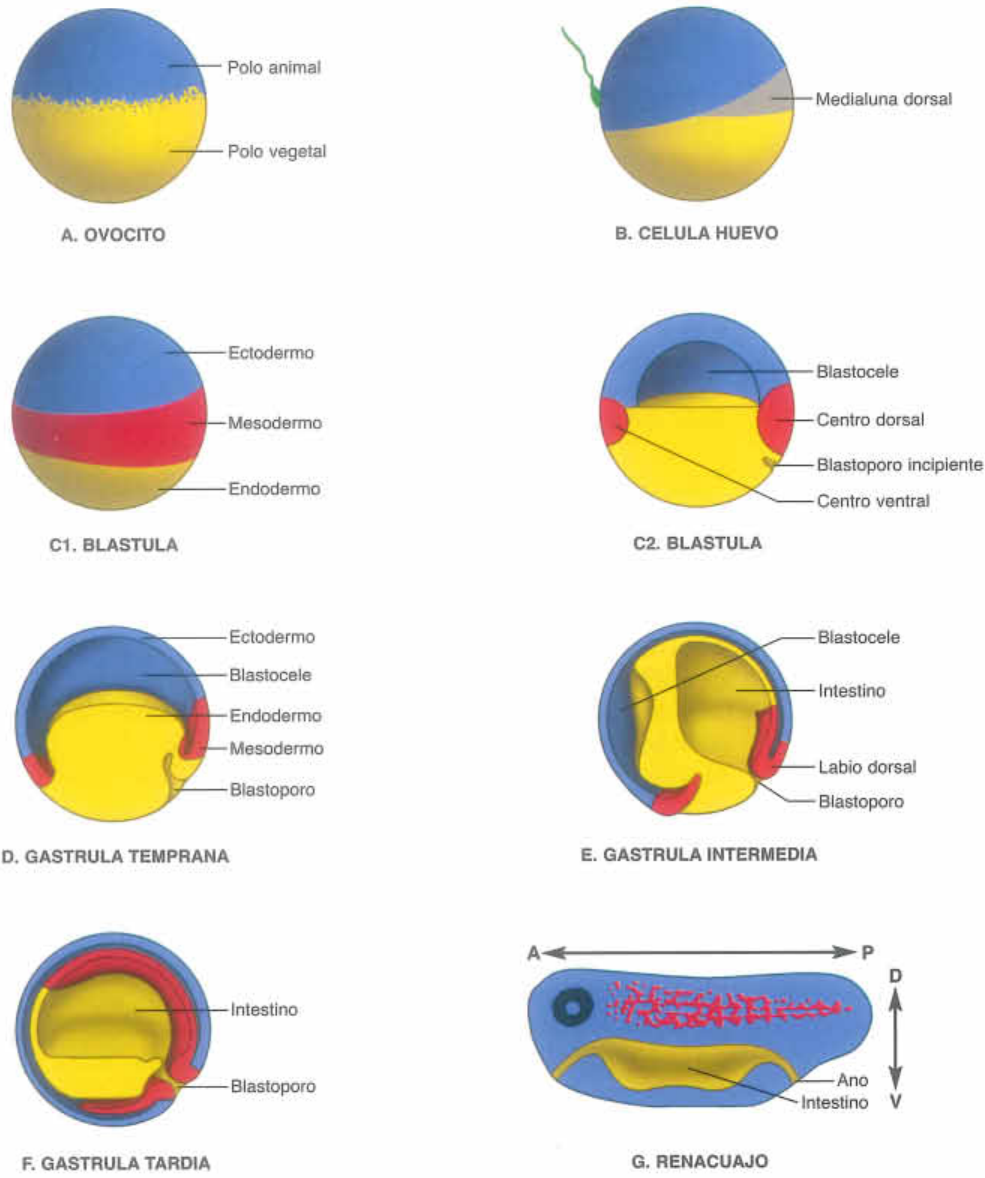


Fig. 21-9. Ilustraciones que muestran las etapas del desarrollo embrionario de la rana *Xenopus laevis*. **A**, **B** y **C1** corresponden a vistas externas; **C2**, **D**, **E**, **F** y **G**, a cortes sagitales. Se destacan: la asimetría del ovocito (**A**); la medialuna dorsal del huevo fertilizado, en las antípodas del lugar de entrada del espermatozoide (**B**); el anillo mesodérmico situado en la corteza de la blástula, entre el ectodermo y el endodermo (**C1**); el blastocele en el polo animal de la blástula, cerca de los centros morfogenéticos dorsal y ventral (**C2**); el blastoporo en el lado dorsal de la gástrula temprana (**D**); las localizaciones del ectodermo, el mesodermo y el endodermo en las gástrulas intermedia y tardía, tras los extensos desplazamientos celulares causados por la gastrulación (**E**, **F**); los ejes anteroposterior (A-P) y dorsoventral (D-V) del renacuajo (**G**).

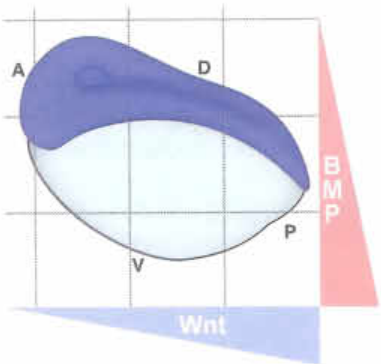


Fig. 21-10. Vista externa del embrión de *Xenopus* en la etapa de néurula, al final de la gastrulación. La estructura de color azul corresponde al futuro sistema nervioso central. La información posicional provista por las coordenadas cartesianas muestra cómo los ejes dorsoventral (D-V) y anteroposterior (A-P) del embrión son determinados por los gradientes de concentración de BMP y Wnt, respectivamente. (De E. M. F. De Robertis.)

Simultáneamente, otras sustancias provenientes del polo vegetal de la blástula —entre las que sobresale una de la familia de proteínas inductoras **Wnt** (por *wingless/int*)— crean un campo morfogenético especial en el mesodermo del **labio dorsal del blastoporo** (fig. 21-9C2). Debido a que organizará el curso de las próximas inducciones —y con el fin de homenajear a su descubridor— ese tejido es llamado ***Organizador de Spemann***, aunque se lo conoce también como ***centro dorsal***.

Recientemente se ha revelado la existencia de un segundo campo morfogenético, complementario del anterior, que lleva el nombre de ***centro ventral*** porque se localiza en el lado opuesto al del centro dorsal (fig. 21-9C2).

Los centros dorsal y ventral son esenciales para la consecución de los próximos pasos del desarrollo debido a que sintetizan las moléculas que promueven la diferenciación de los distintos sectores del mesodermo, a cada uno de los cuales le imprimen una identidad dorsoventral y anteroposterior propia. Esas identidades van concretándose a medida que el mesodermo ingresa y se expande en el interior del embrión durante la gastrulación. Por ejemplo, los primeros sectores que ingresan se colocan en las zonas más cefálicas del cuerpo, y los que les siguen se distribuyen en las zonas intermedias y caudales.

Estudios recientes demostraron que las deformidades anatómicas que aparecen en los embriones de anfibios como consecuencia de ciertas manipulaciones experimentales se autocorrigen merced a una especie de "diálogo" que se establece entre las moléculas sintetizadas en los centros dorsal y ventral. También demostraron que este mecanismo de autocorrección —o de ***autorregulación***— ajusta los desarreglos funcionales que pueden ocurrir durante el desarrollo normal del embrión.

Las principales moléculas que se sintetizan en el centro dorsal se llaman **Cordina**, **Nogina**, **Folistatina**, **BMP-2** (por *bone morphogenetic protein*), **ADMP** (por *anti-dorsalizing morphogenetic protein*), **Crescent** (vocablo inglés que significa *medialuna*, zona de la célula huevo que posee esa forma), **Dkk** (por *Dickkopf*, cabezón en alemán) **Frzb-1** (por *frizzled-bone protein*), **sFRP-2** (por *secreted frizzled-related protein*) y **Cerberus** (por *kerberus*, perro vigía de tres cabezas de la mitología griega). En cambio, las que se sintetizan en el centro ventral son **Xlr** (por *xolloid related*), **Sizzled**, **BMP-4**, **BMP-7** y **CV-2** (por *crossveinless*). Veamos algunos ejemplos de cómo actúan estas moléculas:

La proteína Cordina se une a los factores de crecimiento de la familia BMP

—particularmente a los llamados BMP-2 y ADMP— y los inactiva, pues impide que se acoplen a sus respectivos receptores en la membrana celular. De inmediato, los complejos binarios Cordina/BMP-2 y Cordina/ADMP abandonan el lado dorsal del embrión y se desplazan hacia el lado ventral. Debe añadirse que este flujo de moléculas es esencial para que tengan lugar los ajustes autorreguladores anteriormente mencionados.

La proteína CV-2 tiene una estructura similar a la Cordina, pero no difunde y reside en el lado ventral, donde une entre sí a los complejos Cordina/BMP, concentrándolos. A continuación, siempre en el lado ventral, la proteasa Xlr separa a los factores BMP-2 y ADMP de la Cordina, con lo cual desaparece el obstáculo que les impedía acoplarse a sus respectivos receptores. Como vemos, paradójicamente los factores BMP-2 y ADMP no actúan en el lado dorsal —donde se sintetizan— sino en el lado ventral del embrión. El propósito de esta red de proteínas es generar un gradiente de actividad de BMP, máximo en el lado ventral (fig. 21-10).

Cuando las concentraciones de los factores BMP superan ciertos umbrales, se produce en el lado ventral la proteína Sizzled, que inhibe a la proteasa Xlr. Como consecuencia, se eleva la concentración de Cordina, que según se vio inactiva a los factores BMP. Este tipo de regulación negativa se da también en el lado dorsal del embrión, donde la proteína Crescent desempeña una actividad similar a la de la proteína Sizzled.

En síntesis, para que el embrión se desarrolle normalmente, durante el establecimiento de la polaridad dorsoventral deben producirse ajustes compensatorios recíprocamente opuestos —muy complejos— entre los centros dorsal y ventral.

La formación del gradiente de actividad de BMP determina las diferenciaciones del ectodermo y el mesodermo. A niveles bajos los factores BMP inducen al ectodermo a que se diferencie en sistema nervioso central, a niveles intermedios en crestas neurales, y a niveles altos en epidermis. Con el mesodermo ocurre algo similar, pues distintos niveles de BMP inducen su diferenciación en notocorda, en músculos, en tejido conectivo de la pared abdominal y en sangre.

Resta mencionar algunas funciones de las proteínas Nogina, Folistatina, Dkk, Frzb-1, sFRP-2 y Cerberus. Las dos primeras son antagonistas de los factores BMP, promueven nuevos cambios en el mesodermo e inducen la transformación de un sector especial del ectodermo en tejido neural. En cambio, las proteínas Dkk, Frzb-1 y sFRP-2 son antagonistas de las moléculas inductoras Wnt, al igual que Cerberus, que además es antagonista de los factores de crecimiento BMP-4 y **Nodal**.

Así como un gradiente de actividad de BMP —máximo en el lado ventral del embrión— forma el eje dorsoventral del cuerpo, recientes investigaciones revelaron que el eje anteroposterior es determinado por un gradiente de Wnt, cuyo máximo nivel se halla en el lado posterior del embrión, donde se expresan varias proteínas Wnt. Investigaciones adicionales revelaron que en el lado anterior las Wnt son inhibidas por las proteínas Dkk, Frzb-1 y sFRP-2.

La figura 21-10 muestra al embrión de *Xenopus* en la etapa final de la gastrulación (néurula), colocado sobre un sistema de coordenadas perpendiculares, llamadas también cartesianas en honor al matemático René Descartes.

Las líneas verticales corresponden al gradiente de actividad de los factores BMP a lo largo del eje dorsoventral del cuerpo, y las horizontales al gradiente de proteínas Wnt a lo largo del eje anteroposterior. Como se ve, los niveles máximos de BMP y Wnt se hallan en los lados ventral y posterior del embrión, respectivamente.

La información proporcionada por las coordenadas permite deducir que la formación de los distintos órganos embrionarios y sus posiciones en el cuerpo resultan de las múltiples combinaciones que se dan entre los diferentes niveles de BMP y Wnt. Este sistema —empleado por primera vez en la rana *Xenopus*— ha sido universalmente adoptado para el análisis de todas las especies animales, como planarias, insectos y mamíferos.

21-17. Algunos inductores se comportan como morfógenos

En algunos casos las sustancias inductoras se comportan como morfógenos, ya que, tras ser secretadas por el tejido inductor, sus concentraciones disminuyen a medida que fluyen por los citoplasmas de las células. Según sus posiciones en el tejido inducido, las células reciben distintas concentraciones del morfógeno, motivo por el cual se convierten en tipos celulares diferentes. Más aún, cada umbral de concentración del morfógeno les provee a las células un **valor posicional** singular. Este se conserva en forma indeleble independientemente de que las células se mantengan juntas en el tejido o se separen y se sitúen en puntos distantes del embrión. Los distintos valores posicionales crean las bases para las conductas futuras de las células, incluida la aparición de nuevas diferenciaciones.

21-18. En etapas más avanzadas del desarrollo se producen inducciones entre tejidos distantes

En etapas más avanzadas del desarrollo embrionario aparecen inducciones mediadas por **hormonas** —es decir, entre tejidos distantes—, que se agregan a las anteriores. Una vez elaboradas por las células inductoras, las hormonas llegan a los lugares de destino transportadas por la sangre (secreción endocrina). Como en las inducciones mediadas por secreciones paracrinas, las células competentes son aquellas que poseen receptores específicos.

Cabe advertir que los procesos inductivos —por vecindad o a distancia— continúan hasta el nacimiento y durante toda la vida posnatal, ya que son imprescindibles para el funcionamiento y la supervivencia del organismo. El modo como actúan las moléculas inductoras sobre los receptores celulares y la forma como se propagan las señales en el interior de las células fueron analizados en el capítulo 11.

21-19. La determinación para el cambio se fija en las células antes que revelen estar diferenciadas

Las células adquieren el "compromiso" de cambiar antes que pueda descubrirse que están diferenciadas. Este compromiso previo, llamado **determinación**, es irreversible y puede ser fijado por un determinante citoplasmático o por una sustancia inductora. Existe, entonces, un **período de latencia** —que varía en cada tipo celular— entre el instante en que la célula queda determinada y el momento en que se hace evidente su diferenciación.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
CIUDAD DEL ESTE

21-20. Cuanto menos diferenciada se halle una célula, mayor es su potencialidad evolutiva

Lleva el nombre de **potencialidad evolutiva** la condición biológica que le permite a una célula generar un número determinado de células diferentes; así, cuanto más grande es el número de tipos celulares que una célula es capaz de originar, mayor es su potencialidad (fig. 21-11). La célula huevo, por ser la predecesora de todos los tipos celulares del organismo, es la que posee la potencialidad evolutiva más alta. Conforme avanza el desarrollo y aparecen los sucesivos tejidos embrionarios, la potencialidad de las células declina. Los somitas, por ejemplo, dan origen a un número más restringido de tipos celulares.

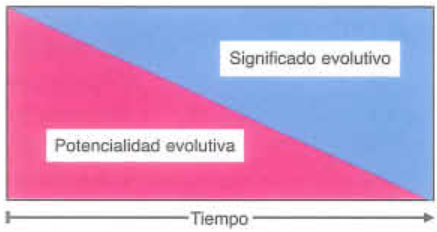


Fig. 21-11. Diagrama que representa la disminución de la potencialidad evolutiva y el aumento inversamente proporcional del significado evolutivo en los tejido embrionarios.

Cuando una célula alcanza su máximo grado de diferenciación —o sea, cuando adquiere las características de uno de los tipos celulares presentes en el organismo adulto—, su potencialidad desaparece. Se dice, entonces, que ha alcanzado su **significado evolutivo** final. Las células embrionarias aumentan su significado evolutivo (se acercan al tipo celular que han de alcanzar al final de su evolución) al mismo tiempo que restringen sus potencialidades evolutivas (conforme se diferencian, pueden originar un número menor de clases de células).

En algunos tipos celulares la potencialidad se mantiene relativamente elevada en forma permanente aun en la vida posnatal. Por ejemplo, en la médula ósea existe una célula multipotencial que da origen a los eritrocitos, a los granulocitos, a los linfocitos, a los monocitos y a las plaquetas.

Por otro lado, en situaciones vinculadas con la reparación de tejidos, células que ya han alcanzado su significado evolutivo final suelen desdiferenciarse y retroceder a un estado más primitivo, imprescindible para su multiplicación. Veamos el siguiente ejemplo: si se extirpa una parte del hígado, algunas células del sector no extirpado **se desdiferencian** y se multiplican (cap. 18-28); recuperado el tamaño del órgano, vuelven a diferenciarse y recobran las características de las células hepáticas originales.

No existen constancias de que una célula pueda desdiferenciarse hasta reasumir un grado de potencialidad evolutiva tal que le permita volver a diferenciarse en otro sentido, esto es, en un tipo celular distinto de aquel al que pertenecía. Es que, una vez que las células fueron determinadas, sus estados diferenciales quedan establecidos a perpetuidad. Veremos en seguida que si la célula se divide, la estabilidad de su diferenciación se transmite a las células hijas, hecho que se repite de generación en generación.

21-21. Los estados de diferenciación se mantienen estables y se transmiten a las células hijas

Una de las características de la diferenciación celular en los organismos superiores es que, una vez que se instaura, se mantiene estable y persiste hasta la muerte de la célula. Por ejemplo, las células que no se dividen (neuronas, etc.) permanecen como tales durante toda la vida del individuo. Algo similar ocurre con las células que se dividen asiduamente; si bien mueren en poco tiempo, lo hacen sin cambiar su estado de diferenciación.

Las células diferenciadas no pueden convertirse en otros tipos celulares

bajo ninguna condición, ni siquiera cuando son sometidas a las más complejas manipulaciones experimentales (por lo menos, con los recursos actuales). Esta característica biológica se conoce con el nombre de **memoria celular**. Depende de la persistencia en la célula de las causas que controlan la expresión de los genes, es decir, de los factores de transcripción, de la metilación del ADN y del grado de enrollamiento de la cromatina (caps. 12-6, 12-12 y 12-13). Estos mecanismos se mantienen a lo largo de toda la vida de las células mediante procesos biológicos no muy bien comprendidos. Seguramente están relacionados con sustancias citoplasmáticas específicas para cada tipo celular. Esta presunción es avalada por los experimentos de trasplante nuclear descritos en la sección 21-3, ya que en la célula trasplantada no se expresan los genes que estaban activos cuando el núcleo se hallaba en el citoplasma original y sí se expresan los que lo hacían en el núcleo eliminado.

Los estados de diferenciación pasan a las células hijas de generación en generación hasta la última de las células descendientes. Esta **herencia de la memoria celular** se debe a que, cuando el ADN se replica, los elementos que controlan la expresión de los genes, más que mantenerse, también se duplican, de modo que en las células hijas aparecen los mismos factores de transcripción, los mismos patrones de metilación del ADN y los mismos modelos de condensación de la cromatina que en las células progenitoras (caps. 14-12 y 14-13).

21-22. El establecimiento del plan corporal en la *Drosophila* es el resultado de decisiones escalonadas tomadas por una serie de genes

Al iniciarse el desarrollo embrionario, el genoma, además de codificar la síntesis de las proteínas que dan lugar a los distintos tipos celulares, aporta el programa que lleva al establecimiento del **modelo tridimensional del cuerpo**. Las informaciones contenidas en ese programa y sus consecuencias —que aparecen apenas el espermatozoide fecunda al óvulo y continúan hasta etapas relativamente avanzadas del desarrollo embrionario— han comenzado a develarse, ya que se ha descubierto la forma como las claves unidimensionales encerradas en los genes dan lugar a organismos tridimensionales. Los datos más reveladores provienen de trabajos realizados en la mosca *Drosophila melanogaster*, cuyo desarrollo embrionario pasamos a reseñar (muy sucintamente) con el propósito de facilitar la comprensión del tema que nos ocupa (fig. 21-12).

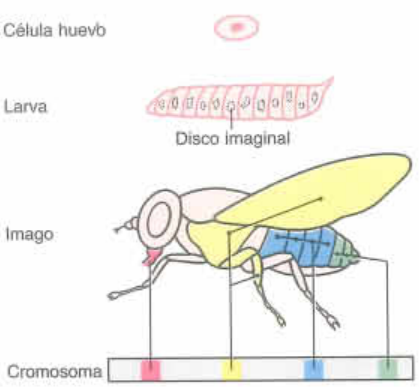


Fig. 21-12. Desarrollo de la mosca *Drosophila melanogaster*. En la parte inferior aparece uno de los cromosomas de la mosca, en el que se localizan varios genes con caja homeótica. Obsérvese cómo el orden de los genes se corresponde con el orden de los segmentos corporales en que esos genes se expresan.

La *Drosophila* se desarrolla —luego de formarse la **célula huevo** tras la fecundación y atravesarse el período embrionario— a partir de una **larva**. Esta se halla compuesta por una sucesión de **segmentos** —uno cefálico, tres torácicos y ocho abdominales—, los cuales le confieren una clara polaridad espacial, pues tan pronto aparecen quedan configurados los ejes cefalocaudal, dorsoventral y mediolateral del cuerpo larvario.

La larva se convierte en **mosca** a partir de varios grupos celulares que aparecen y se asientan debajo de la epidermis de los segmentos larvarios. Estos grupos celulares se conocen con el nombre de **discos imaginales** (por *imago*, insecto adulto que

se forma a partir de una larva); existen nueve pares colocados a los lados de la línea media de la larva más uno impar situado en el extremo caudal (19 discos en total). Cada disco da origen a una de las estructuras exteriores de la mosca. Así, de un par de discos surgen los ojos y las antenas, de otro la boca, de otro las alas y parte del tórax, de otros las patas unidas al resto del tórax, de otros las estructuras que componen el abdomen, etc. Estas partes, adecuadamente ensambladas, forman un cuerpo adulto también segmentado, como el de la larva.

Si bien desde el principio las células de todos los discos imaginales son morfológicamente idénticas, ya están determinadas, pues generan —cualquiera que sea la manipulación experimental a que se las someta— sólo las estructuras pertenecientes a sus segmentos de origen. En efecto, si se trasplanta un par de discos imaginales a la posición de otro par, al formarse la mosca adulta los discos injertados desarrollan las estructuras correspondientes a sus emplazamientos originales, independientemente de su nueva localización.

El desarrollo del plan corporal que acabamos de describir se halla controlado por una compleja red de genes reguladores, que comienzan a ejercer sus funciones apenas se forma la célula huevo. Los primeros en actuar son los llamados **genes de la polaridad de la célula huevo**, que pertenecen a la madre; tienen por misión establecer los ejes cefalocaudal, dorsoventral y mediolateral del cuerpo. Luego lo hacen tres conjuntos de genes agrupados bajo el nombre de **genes segmentarios**; son los que dan lugar a la formación de los segmentos larvarios. Finalmente actúan los denominados **genes homeóticos**, de los cuales deriva la formación de los discos imaginales y, por consiguiente, el desarrollo de las estructuras exteriores de la mosca adulta (ojos, antenas, boca, alas, patas, tórax, abdomen, etcétera).

La polaridad del cuerpo se instala desde el comienzo del desarrollo embrionario por la presencia de ciertas moléculas —heredadas del ovocito— que, como en éste antes de la fecundación, se concentran y distribuyen en forma desigual en los distintos sectores de la célula huevo. Tras las divisiones de segmentación esas moléculas son heredadas —también en forma desigual— por las primeras células embrionarias, lo cual fija las polaridades espaciales del futuro cuerpo larvario. Es obvio que tales moléculas, al provenir del ovocito, no son codificadas por genes del embrión sino por genes de la madre, concretamente los **genes de la polaridad de la célula huevo**, pertenecientes al ovocito. En realidad algunos de estos genes corresponden a las células foliculares que rodean al ovocito, las cuales —durante la permanencia del ovocito en el ovario— sintetizan las moléculas a que hacemos referencia (ARNm y proteínas) y las vuelcan en el citoplasma de la célula germinativa.

Dijimos que existen tres clases de **genes segmentarios**; se denominan ***genes de hendidura***, ***de regla par*** y ***de la polaridad de los segmentos***. Se expresan, en ese orden, al ser activados por señales posicionales establecidas en las células embrionarias con anterioridad. De estos genes depende la formación de los segmentos larvarios y, en ellos, el desarrollo de detalles cada vez más finos.

Por último se expresan los **genes homeóticos**, después de ser activados por los productos de algunos genes que actuaron precedentemente. Definen la formación de las partes adultas de la *Drosophila*. Así, según los discos ima-

ginales en que se expresan, algunos forman la cabeza, otros los segmentos torácicos, otros los segmentos abdominales, etc. Estos genes están alineados en el cromosoma en el mismo orden que los segmentos corporales de la mosca, comenzando por los que se expresan en la cabeza y terminando con los que lo hacen en la cola (fig. 21-12).

Los tres tipos de genes que participan en la construcción del plan corporal lo hacen mediante activaciones sucesivas en forma de cascada, de modo que cada gen (por medio de la proteína que codifica) produce la diferenciación que le compete y prepara al gen que habrá de activarse en el próximo paso. Los episodios se suceden ordenadamente, no sólo en el tiempo (vimos el orden con que se expresan los genes) sino también en el espacio, ya que siempre ocurren en dirección cefalocaudal. Además, el producto de cada gen influye sobre los genes que actuaron precedentemente, lo cual imprime en las células de cada segmento un determinado e indeleble valor posicional. El conjunto de estos valores, además de afianzar la organización del plan corporal, crea las bases para la aparición de las diferenciaciones futuras.

21-23. Los genes que participan en la formación del plan corporal contienen una secuencia de nucleótidos conservada, llamada caja homeótica

Los genes que participan en la formación del plan corporal pertenecen a la categoría de **genes rectores**, pues controlan la expresión de varios genes subordinados que se suceden en un definido orden jerárquico. Los genes rectores codifican **factores de transcripción específicos** (cap. 14-5) cuyas moléculas proteicas suelen ser diferentes entre sí. No obstante, casi todas tienen en común un segmento similar de 60 aminoácidos llamado **homeodominio**. Ello es porque el ADN de los genes que codifican a esos factores posee una secuencia de 180 pares de nucleótidos con muy pocas variaciones entre un gen y otro, conocida como **caja homeótica**. Su nombre se debe a que fue descubierta en los genes homeóticos.

Se han descubierto genes con caja homeótica en todas las especies estudiadas —incluida la humana—, ordenados en los cromosomas de modo semejante a los de la *Drosophila*. Tal hallazgo ha llevado a suponer que los mecanismos genéticos responsables del desarrollo del plan corporal se encuentran difundidos en la mayor parte de los organismos multicelulares. Refuerza esta hipótesis el hecho de que en los embriones de los vertebrados se expresan varios genes con caja homeótica en las células de los somitas y del tubo neural, órganos que presentan una organización metamérica análoga a la de los segmentos de la *Drosophila*. No obstante, las extrapolaciones en torno a este punto deben realizarse con cautela, por un lado porque para muchos tal analogía no existe y, por otro, porque en el armado del modelo que lleva a la formación del cuerpo de los vertebrados parecen prevalecer los fenómenos inductivos.

BIBLIOGRAFIA

Agius E., Oelgeschläger M., Wessely O., Kemp C. and De Robertis E.M. (2000) Endodermal nodal-related signals and mesodem induction in *Xenopus*. Development 127:1173.

Bard J. and Lehtonen E. (1996) Introduction: The contempo rary view of induction. Semin. Cell Dev. Biol. 7:145.

Boncinelli E. and Mallamaci A. (1995) Homeobox genes in vertebrate gastrulation. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:619.

Cho K.W.Y., Blumberg B., Steinbeisser H. and De Robertis

E.M. (1991) Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* development. Development 115:573.
De Robertis E.M. (2006) Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 4:296.
De Robertis E.M. (2008) Evo-Devo: Variations on Ancestral themes. Cell 132:185.
De Robertis E.M. and Gurdon J.B. (1977) Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2470
De Robertis E.M. and Gurdon J.B. (1979) Gene transplanation and the analysis of development. Sci. Am. 241:74
De Robertis E.M. (2009) Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. Mech. Dev. 126:925.
De Robertis E.M. and Kuroda H. (2004) Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20:285.
De Robertis E.M., Larraín J. et al. (2000) The establishment of Spemann's Organizer and patterning of the vertebrate embryo. Nature Rev. Genet. 1: 171.
De Robertis E.M., Oliver G. and Wright C.V.E. (1990) Homeobox genes and the vertebrate body plan. Sci. Am. 263 (1):46.
De Robertis E.M. and Sasai Y. (1996) A common plan for dorsoventral patterning in *Bilateria*. Nature 380:37.
Dubnau J. and Struhl G. (1996) RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. Nature 379:694.
Edelman G.M. (1992) Morphoregulation. Develop. Dynam. 193:2.
Fristrom D. (1988) The cellular basis of epithelial morphogenesis. Tissue Cell 20:645.
Fuentealba L.C., Eivers E. et al. (2008) Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:7732.
Gehring W.J. (1992) The homeobox in perspective. TIBS 17:277.
Gilbert S.F. (2006) Developmental Biology. 8th Ed. Sinauer, Sunderland, MA.
Giraldez A.J., Cinalli R.M., Glasner M.E. et al. (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. Science 308:833.
Gregor T., Bialek W. et al. (2005) Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:18403.
Gurdon J.B. (1968) Transplanted nuclei and cell differentiation. Sci. Am. 219 (6):24.
Gurdon J.B. (2000) The future of cloning. Nature 402:743.
Heasman J. (2006) Maternal determinants of embryonic cell fate. Semin. Cell Dev. Biol. 17:93.
Hib J. (2006) Embriología Médica, 8ª Ed. Editorial Clareo, Buenos Aires.
Hirokawa N. Tanaka Y. et al. (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. Cell 125:33.
Ingham P.W. (1988) The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. Nature 335:25.
Kelly S.J. (1977) Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. 200:365.
Kimble J. (1994) An ancient molecular mechanism for establishing embryonic polarity? Science 266:577.
Kintner C. (1992) Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. Cell 69:225.
Lander A.D. (2007) Morpheus unbound: reimagining the morphogen gradient. Cell 128:245.
Larraín J., Bachiller D., Lu B., Agius E., Piccolo S. and De Robertis E.M. (2000) BMP-binding modules in chordin: a model for signallin regulation in the extracellular space. Development 127:821.
Lemaire P. and Gurdon J.B. (1994) Vertebrate embryonic inductions. Bioessays 16:617.
Lemons D. and McGinnis W. (2006) Genomic evolution of Hox gene clusters. Science 313:1918.
Lumsden A. (1990) The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. Trends Neurosci. 13:329.
Lyon M.F. (1993) Epigenetic inheritance in mammals. Trends Genet. 9:123.
Madem M. et al. (1995) Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. Curr. Biol. 6:417.
McGinnis W. and Krumlauf R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. Cell 68:283.
McGinnis W. and Kuziora M. (1994) The molecular architects of body design. Sci. Am. 270 (2):36.
McMahon A.P. (1992) The Wnt family of developmental regulators. Trends Genet. 8:236.
Morriss-Kay G.M. and Sokolova N. (1996) Embryonic development and pattern formation. FASEB J. 10:961.
Nüsslein-Volhard C. (1996) Gradients that organize embryo development. Sci. Am. 275 (2):38.
Nüsslein-Volhard C., Frohnhöfer H.G. and Lehmann R. (1987) Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. Science 238:1675.
Patel N.H. (1994) Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation. Science 266:581.
Piccolo S. et al. (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. Nature 397:707.
Placzek M. (1995) The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:499.
Rebagliati M.R., Weeks D.L., Harvey R.P and Melton D.A. (1985) Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. Cell 42:769.
Reversade B. and De Robertis E.M. (2005) Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. Cell 123:1147.
Ringrose L. and Paro R. (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. Development 134:223.
Rogulja D. and Irvine K.D. (2005) Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. Cell 123:449.
Rubenstein J.L.R. et al. (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the model. Science 266:579.
Schier A.F. (2007) The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. Science 316:406.
Smith W.C., Knecht A.K., Wu M. and Harland R.M. (1993) Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. Nature 361:547.
St. Johnston D. and Nüsslein-Volhard C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. Cell 68:201.
Tam P.P.L. and Quinlan G.A. (1996) Mapping vertebrate embryos. Curr. Biol. 6:104.
Thomsen G.H. and Melton D.A. (1993) Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. Cell 74:433.
Tickle C. (1995) Vertebrate limb development. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:478.

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

22 Muerte celular

22-1. La muerte celular programada es un fenómeno común en el organismo

La muerte de las células es un fenómeno común durante el desarrollo embrionario, necesario para remover tejidos provisorios (por ejemplo, las membranas interdigitales durante la formación de los dedos), eliminar células superfluas (como ocurre con casi la mitad de las neuronas en el curso de la neurogénesis), generar conductos, formar orificios, etc.

También se producen muertes celulares durante la vida posnatal, cuando el organismo necesita remodelar tejidos o remover células dañadas, innecesarias, redundantes, envejecidas o peligrosas para su salud, como lo son las células infectadas, las tumorales o las autorreactivas (por ejemplo, los linfocitos T que reaccionan contra el propio organismo).

Puesto que las células destinadas a morir suelen perecer para que sobrevivan las restantes del cuerpo, puede decirse que protagonizan una suerte de inmolación biológica. Estas muertes celulares fisiológicas o programadas ocurren al cabo de una serie de cambios morfológicos que reciben el nombre de **apoptosis** (del griego *apó*, separado de, y *ptôsis*, caída), término que se usa para diferenciarlas de las muertes celulares accidentales —producidas por traumatismos, sustancias tóxicas, obstrucciones vasculares, etc.—, que se denominan **necrosis**.

22-2. La apoptosis genera cambios celulares característicos

Los cambios que experimentan las células cuando mueren por apoptosis son característicos. Se deben a que se activan unas proteasas citosólicas especiales llamadas **caspasas** (por *cysteinyl aspartate proteinases*) y ocurren en el siguiente orden (fig. 22-1):

1) El citoesqueleto se desarma debido a la ruptura de sus filamentos. Como consecuencia, la célula pierde contacto con sus vecinas (o con la matriz extracelular) y se vuelve esférica.

2) La célula se encoge porque el citosol y los organoides se condensan sin ser afectadas sus estructuras. La condensación se debe a que se altera la permeabilidad de las membranas celulares.

3) Los laminofilamentos se disocian, con la consiguiente desintegración de la envoltura nuclear.

4) La cromatina se compacta y las moléculas de ADN se seccionan por acción de una endonucleasa, lo cual —al desintegrarse la envoltura nuclear— divide al núcleo en pequeños fragmentos que se distribuyen en el citoplasma.

5) De la superficie de la célula emergen numerosas protrusiones, casi todas con fragmentos nucleares en su interior.

6) Luego las protrusiones se desprenden, convertidas en fracciones celulares llamadas **cuerpos apoptósicos**. Cabe señalar que sus organoides se hallan relativamente bien conservados.

7) Las fosfatidilserinas de las membranas que envuelven a los cuerpos apoptósicos —previamente localizadas en la monocapa citosólica de la membrana plasmática (cap. 3-3)— se trasladan a la monocapa externa.

8) Finalmente, atraídos por estas fosfatidilserinas, numerosos macrófagos acuden al lugar de la apoptosis y fagocitan a los cuerpos apoptóticos.

Como se ve, a diferencia de la necrosis, la remoción de las células muertas por apoptosis preserva la arquitectura original de los tejidos, puesto que no da lugar a reacciones inflamatorias ni produce cicatrices.

22-3. La apoptosis se activa por distintas causas

La mayor parte de las muertes celulares por apoptosis se producen cuando: 1) se suprimen los factores tróficos que mantienen vivas a las células; 2) sustancias que inducen la muerte celular se unen a receptores específicos; 3) el ADN nuclear es afectado por mutaciones capaces de poner en peligro al organismo.

A continuación se verá que estas causas desencadenan vías de señales intracelulares diferentes entre sí, aunque todas convergen en un tramo final común.

22-4. La apoptosis que se activa cuando se suprimen los factores tróficos es la más generalizada

Generalmente, apenas nace, cada célula es mantenida viva por una sustancia inductora específica llamada ***factor trófico*** o ***factor de supervivencia***, que le llega desde células vecinas (cap. 11-1) (fig. 11-1B). La mayoría de las muertes celulares por apoptosis tienen lugar cuando esas sustancias dejan de actuar.

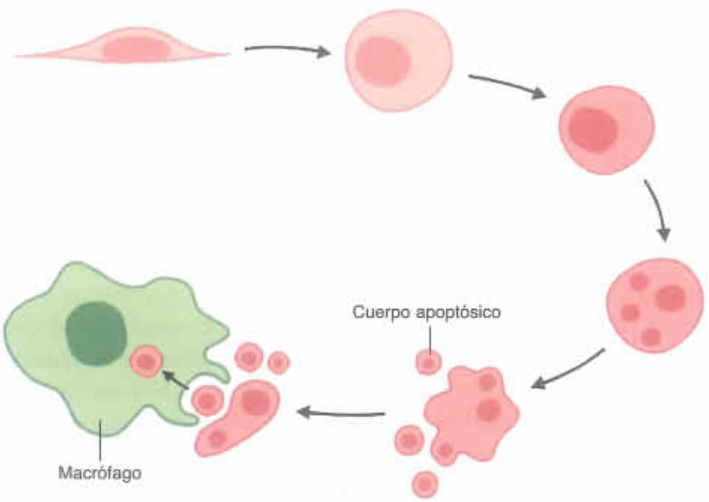


Fig. 22-1. Cambios celulares que ocurren durante la apoptosis. Obsérvese la fagocitosis de los cuerpos apoptósicos por parte de un macrófago.

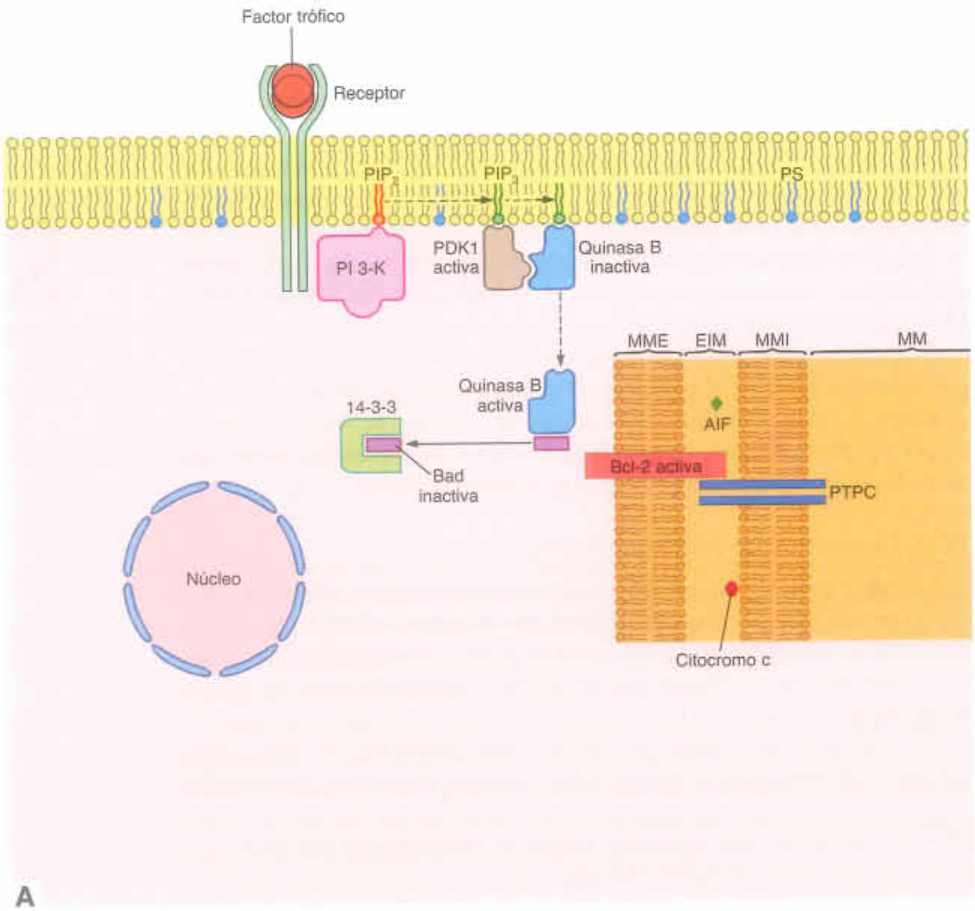


Fig. 22-2. A. Célula mantenida viva por la unión de un factor trófico a su receptor. *PS*, fosfatidilserina; *MME*, membrana mitocondrial externa; *MMI*, membrana mitocondrial interna; *EIM*, espacio intermembranoso; *MM*, matriz mitocondrial.

Los factores tróficos más estudiados son las glicoproteínas **CSF** (por *colony-stimulating factors*) y el grupo de sustancias llamadas **neurotrofinas**. Las CSF estimulan la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de las células sanguíneas. En cambio, las neurotrofinas —unas sustancias que secretan los tejidos inervados, a cuya familia pertenece el **NGF** visto en los capítulos 11-12 y 18-28— tienen por función mantener vivas a las neuronas y estimular el crecimiento de sus axones.

La figura 22-2A muestra el modo en que los factores tróficos interactúan con los receptores de las células inducidas, situados en la membrana plasmática. Cabe aclarar que si bien esa figura ilustra un factor trófico que interactúa con un receptor que posee actividad de tirosina quinasa (cap. 11-12) (fig. 11-11), existen factores que interactúan con receptores acoplados a las proteínas G_{13} o G_i (cap. 11-20) (fig. 11-21).

En los capítulos 11-12, 11-14 y 11-20 se vio que cuando son activados, esos receptores se unen y activan a distintas **fosfatidilinositol 3-quinasas** (**PI 3-K**). También se vio que con fosfatos de moléculas de ATP, las PI 3-K activadas fosforilan el inositol del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2) de la membrana plasmática y lo convierten en **fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato** (**PIP_3**) (figs. 11-11, 11-21 y 11-22).

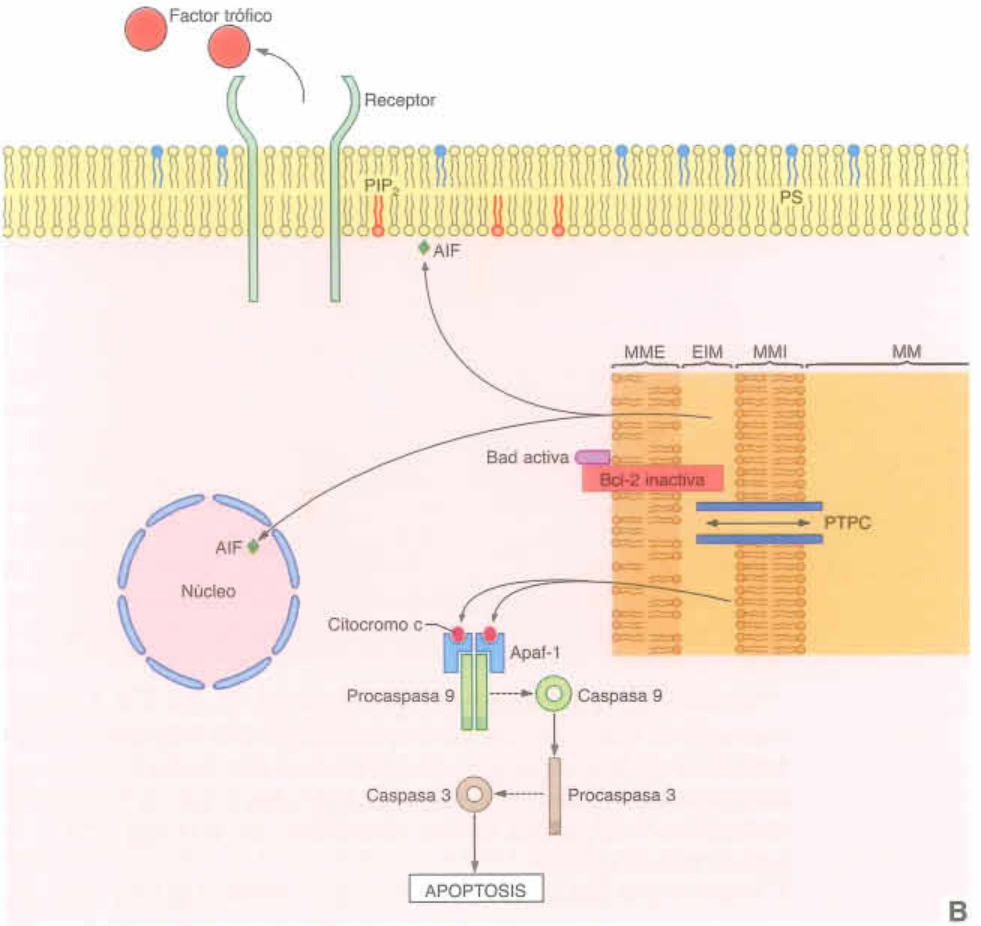


Fig. 22-2. B. Apoptosis producida por la supresión del factor trófico. *PS*, fosfatidilserina; *MME*, membrana mitocondrial externa; *MMI*, membrana mitocondrial interna; *EIM*, espacio intermembranoso; *MM*, matriz mitocondrial.

A continuación, sin abandonar la membrana plasmática, un PIP_3 se une a la quinasa **PDK1** (por *phosphatidylinositol dependent-protein kinase*) y otro a la serina-treonina **quinasa B**, lo que hace que ambas enzimas queden próximas entre sí.

La PDK1 fosforila a la quinasa B, que se separa del PIP_3, se activa y fosforila a una proteína llamada **Bad** (por *Bcl-2 antagonist of cell death*). Ello evita que la Bad se active; además, hace que se combine con la proteína citosólica **14-3-3**.

En la condición descrita la Bad se halla separada de la **Bcl-2** (por *B cell leukemia*), una proteína perteneciente a la membrana mitocondrial externa que deriva del protooncogén bcl-2. Debe agregarse que cuando no está unida a la Bad, la Bcl-2 se halla activa e impide que la célula muera por apoptosis. En breve se verá que previene la muerte celular porque mantiene cerrado un canal de la membrana mitocondrial interna llamado **PTPC** (por *permeability transition pore complex*).

Veamos cómo se desencadena la apoptosis. La figura 22-2B muestra que en ausencia del factor trófico, la Bad pierde el fosfato, se activa, se desvincula de la proteína 14-3-3 y se une a la Bcl-2 en el lado citosólico de la membrana mitocondrial externa.

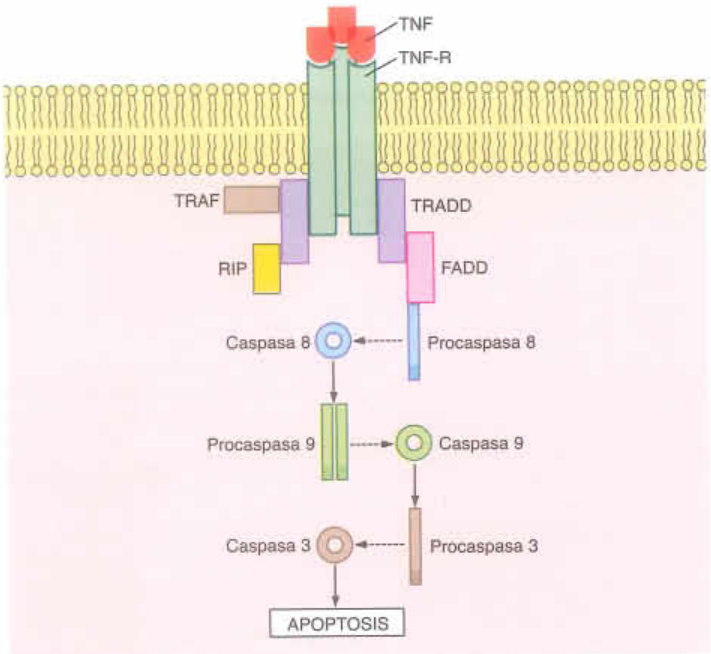


Fig. 22-3. Apoptosis producida por la activación del receptor TNF-R.

Debido a que la Bad inactiva a la Bcl-2, el PTPC se abre y se descontrola el pasaje de moléculas entre los compartimientos de la mitocondria, lo cual distorsiona la estructura de la membrana mitocondrial externa y permite que dos componentes presentes normalmente en el espacio intermembranoso de ese organoide —la proteína AIF y el citocromo c (cap. 8-11) (fig. 8-12)— se escapen hacia el citosol.

Una vez en el citosol, la **AIF** (por *apoptosis inducing factor*) se dirige a la membrana plasmática e invierte la posición de las fosfatidilserinas, que como se vio en la sección 22-2 se trasladan a la monocapa externa de la membrana y atraen a los macrófagos. Además, la AIF ingresa en el núcleo, induce la condensación de la cromatina y activa a la endonucleasa que degrada a las moléculas de ADN.

Respecto del **citocromo c**, se combina con la proteína adaptadora **Apaf-1** (por *apoptosis protease activating factor*). Ello la une a la procaspasa 9, que se escinde y convierte en **caspasa 9**. Luego ésta escinde a la procaspasa 3, la cual se transforma en **caspasa 3** y activa a las enzimas que producen los cambios apoptóticos enumerados en la sección 22-2.

Debe agregarse que en las células moribundas el Ca^{2+} citosólico aumenta considerablemente. Cuando se trata de células epiteliales, el Ca^{2+} cierra los conexones y evita el paso de elementos que pueden dañar a las células vecinas (cap. 6-14).

22-5. La apoptosis debida a la activación de receptores específicos es más rápida que la estudiada en la sección anterior

Durante algunas respuestas inmunológicas, en la membrana plasmática de ciertas células infectadas y cancerosas aparecen receptores especiales cuya activación conduce a la apoptosis de una manera mucho más rápida que la

analizada en la sección anterior. Algo similar ocurre en la membrana plasmática de los linfocitos T específicos que sobran al término de esas respuestas inmunológicas.

Los receptores que se están analizando se llaman TNF-R y Fas (figs. 22-3 y 22-4). Se componen de tres subunidades proteicas iguales entre sí y pertenecen a una categoría diferente de las reseñadas en el capítulo 11-9, ya que sus dominios citosólicos —que contienen una secuencia de aminoácidos conocida como ***dominio de muerte***— activan a caspasas, es decir, a enzimas proteolíticas.

Las sustancias inductoras que interactúan con esos receptores se llaman TNF y FasL (figs. 22-3 y 22-4). Son también homotriméricas y, como sus nombres sugieren, se combinan con los receptores TNF-R y Fas, respectivamente.

El **TNF** (por *tumor necrosis factor*) es secretado desde células situadas en la vecindad —principalmente macrófagos y linfocitos T— a causa de diversas infecciones (figs. 11-1B y 22-3). El punto de partida de la vía de señales inducida por el TNF es la unión de sus tres subunidades con los dominios externos de las tres subunidades del receptor **TNF-R** (fig. 22-3). Ello reúne a estas últimas —el receptor se trimeriza— y hace que sus dominios citosólicos se conecten con la proteína adaptadora **TRADD** (por *TNF receptor-associated death domain*), la que a su vez se une a otras tres proteínas adaptadoras, denominadas **FADD** (por *Fas receptor-associated death domain*), **RIP** (por *receptor-interacting protein*) y **TRAF** (por *TNF receptor-associated factor*).

Las dos últimas proteínas se relacionan parcialmente con la apoptosis, a diferencia de la FADD, que se une a la procaspasa 8, la escinde y transforma en **caspasa 8**. Luego esta enzima activa a la procaspasa 9 y la convierte en **caspasa 9**, que como se vio en la sección anterior escinde a la procaspasa 3 y la transforma en **caspasa 3**. Los pasos que siguen hasta que se llega a la apoptosis son similares a los descritos en la sección 22-4.

El **FasL** (por *fascicle ligated*) es elaborado por linfocitos T citotóxicos y linfocitos asesinos naturales a causa de algunos cánceres e infecciones. Debido a que el FasL no se secreta sino que se sitúa en la membrana plasmática, para que pueda interactuar con el receptor **Fas** es necesario que los linfocitos mencionados entablen contacto con las células cancerosas o infectadas (figs. 11-1E y 22-4).

La vía de señales inducida por el FasL se diferencia de la impulsada por el TNF porque es más corta, ya que los dominios citosólicos del receptor Fas se conectan con la proteína **FADD** no por intermedio de la TRADD sino directamente (fig. 22-4).

22-6. La apoptosis debida a mutaciones en el ADN evita la aparición de distintos tipos de cánceres

Otra condición biológica que lleva a la apoptosis ocurre cuando el ADN se altera por envejecimiento celular (cap. 17-9), por errores en la replicación (caps. 17-18 y 17-20), por la acción de diferentes tipos de agentes ambientales (rayos γ, rayos X, radiación solar ultravioleta, algunas sustancias químicas, ciertos virus, etc.) (cap. 17-19) o por la acumulación en la célula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o de aniones superóxido (O_2^-) (caps. 10-2 y 10-3).

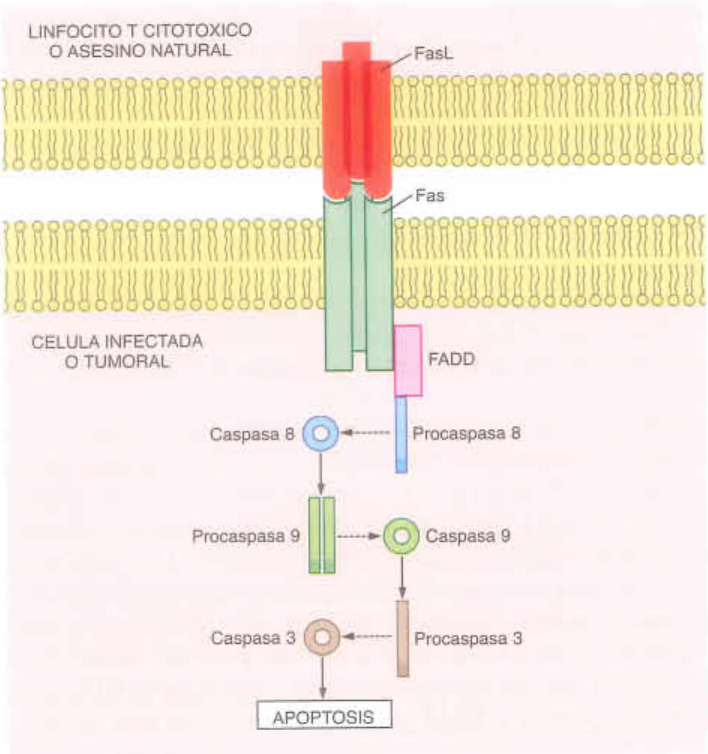


Fig. 22-4. Apoptosis producida por la activación del receptor Fas.

Ante la presencia de esas alteraciones suele intervenir la proteína **P53**, derivada del gen supresor de tumores p53. En el capítulo 18-29 se dijo que la proteína P53 estabiliza el ciclo celular en la fase G1 y controla la presencia de alteraciones en el ADN para procurar su reparación. Cuando no logra repararlas y son peligrosas para el organismo, la propia proteína P53 induce la muerte de la célula a fin de impedir el traspaso del ADN dañado a las células hijas. Para ello la P53 inactiva a la Bcl-2, lo cual pone en marcha el mecanismo que conduce a la apoptosis descrito en la sección 22-4 (fig. 22-2B).

A menudo se halla alterado el mismo gen p53, por lo que genera una proteína P53 defectuosa, incapaz de controlar el estado del ADN y de conducir a la célula "al suicidio". Por consecuencia, si se trata de un tipo de célula que se divide, las células que descienden de ella acumulan alteraciones a lo largo de las sucesivas divisiones. Este hecho es grave cuando se afectan genes implicados en la regulación de la proliferación celular, ya que pueden dar lugar a distintas clases de cánceres (cap. 18-32).

BIBLIOGRAFIA

Ashkenazi A. and Dixit V.M. (1998) Death receptors: Signaling and modulation. Science 281:1305.

Banin S. et al. (1998) Ehhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science 281:1674.

Barinaga M. (1994) Cell suicide: by ICE, not fire. Science 263:754.

Barinaga M. (1996) Forging a path to cell death. Science 273:735.

Barinaga M. (1998) Death by dozens of cuts. Science 280:32.

Beutler B. and van Huffel C. (1994) Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. Science 264:667.

Bissonnette R.P., Echeverri F., Mahboubi A. and Green D.R.

(1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. Nature 359:552.
Brenner C. and Kroemer G. (2000) Mitochondria: the death signal integrators. Science 289:1150.
Brown J.M. and Attardi L.D. (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. Nature Rev. Cancer 5:231.
Cardone M.H. et al. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science 282:1318.
Chang H.Y et al. (1998) Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. Science 281:1860.
Chen G. and Goeddel D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 296:1634.
Chen-Tzu K. et al. (2009) Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates denbinobin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. J. Biom. Sci. 16:43.
Cheng J. et al. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science 263:1759.
Chinnaiyan A.M. et al. (1997) Interaction of Ced-4 with Ced-9: a molecular framework for cell death. Science 275:1122.
Cohen J.J. (1993) Apoptosis. Immunol. Today 14:126.
Danial N.N. and Korsmeyer S.J. (2004) Cell death: critical control points. Cell 116:205.
Demaurex N. and Distelhost C. (2003) Apoptosis-The calcium connection. Science 300:65.
Duke R.C., Ojcius D.M. and Ding-E Young J. (1997) Cell suicide in health and disease. Sci. Am. 275 (6):48.
Ellis R.E., Yuan J.V. and Horvitz H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. Annu. Rev. Cell Biol. 7:663.
Enoch T. and Norbury C. (1995) Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. TIBS 20:426.
Fesik S.W. and Shi Y. (2001) Controlling the caspases. Science 294:1477.
Finkel E. (2001) The mitochondrion: is it central to apoptosis? Science 292:624.
Galonek H.L. and Hardwick J.M. (2006) Upgrading the BCL-2 network. Nature Cell. Biol. 8:1317.
Gerschenson L.E. and Rottello R.J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. FASEB J. 6:2450.
Goldstein P. (1997) Controlling cell death. Science 275:1081.
Goldstein P. (2000) FasL binds preassembled Fas. Science 288:2328.
Green D.R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. Cell 121:6 71.
Green D.R. and Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. Science 281:1309.
Hengartner M.O. (1995) Life and death decisions: ced-9 and programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. Science 270:931.
Hermeking H. and Eick D. (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. Science 265:2091.
Hunot S. and Flavell R.A. (2001) Death of a monopoly? Science 292:865.
Jacobson M.D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. TIBS 21:83.
Jiang Y. et al. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. Science 283:543.
Jiang X. and Wang X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. Annu. Rev. Biochem. 73:87.
Kumar S. (2007) Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ 14:32.
Lavrik I., Golks A. and Krammer P.H. (2005) Death receptor signaling. J. Cell Sci. 118:265.
Li C. and Thompson C.B. (2002) DNA damage, deamination and death. Science 298:1346.
Martin S.J., Green D.R. and Cotter T.G. (1994) Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. TIBS 19:26.
Marx J. (1994) New link found between p53 and RNA repair. Science 266:1321.
McCabe M.J., Nicotera P. and Orrenius S. (1992) Calcium-dependent cell death. Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:269.
Nagata S. and Goldstein P. (1995) The Fas death factor. Science 267:1449.
Nicholson D.W. and Thornberry N.A. (1997) Caspases: killer proteases. TIBS 22:299.
Rudel T. and Bokoch G.M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. Science 276:1571.
Soengas M.S. (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. Science 284:156.
Steller H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267:1445.
Vousden K.H. (2005) Apoptosis p53 and PUMA: a deadly duo. Science 309:1685.
Wajant H. (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science 296:1635.
Wang C.Y. (1998) NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science 281:1680.
Wright S.C. et al. (1997) Calmodulin-dependent protein kinase II mediated signal transduction in apoptosis. FASEB J. 11:843.

23 Métodos de estudio en biología celular

23-1. Introducción

La observación de las estructuras biológicas se ve dificultada por el hecho de que las células son muy pequeñas y transparentes. Más difícil aún es descubrir su organización molecular y establecer de qué manera actúan las moléculas para determinar las estructuras y las funciones celulares.

El extraordinario progreso experimentado por la biología molecular de la célula en los últimos años es consecuencia del desarrollo de nuevos métodos para el estudio de los componentes celulares, basados en la aplicación de técnicas bioquímicas y biofísicas de última generación. Debido a que actualmente el número de metodologías experimentales es muy grande, la idea de describirlas exhaustivamente en un libro de estas características resulta imposible. Así, el presente capítulo no es más que una reseña de los métodos generales que se emplean para descifrar las estructuras y las funciones celulares.

Se describirán los principios generales de la microscopia óptica y electrónica, algunos métodos especiales que hacen posible el estudio de la célula viva, diversos métodos de citoquímica, inmunoquímica, radioautografía y fraccionamiento celular, y las técnicas que se emplean para el análisis molecular de los ácidos nucleicos.

MICROSCOPIA OPTICA

23-2. Microscopio óptico

En el capítulo 1 se describieron los límites de resolución del ojo humano y de los distintos tipos de microscopios (fig. 1-1). El ojo es capaz de detectar variaciones en la longitud de onda y en la intensidad de la luz. Los adelantos de la microscopia permitieron aumentar ambas posibilidades, tanto mediante el uso de instrumentos que amplían el poder de resolución como de técnicas que contrarrestan la transparencia de las células aumentando el contraste de sus estructuras.

La mayoría de los componentes celulares son transparentes, a excepción de algunos pigmentos citoplasmáticos que absorben ciertas longitudes de onda de la luz. La baja absorción de esas longitudes por la célula viva se debe a su alto contenido de agua, aunque después de desecada sigue presentando un contraste muy escaso. Un medio para contrarrestar esta limitación consiste en emplear colorantes que tiñan selectivamente los distintos componentes celulares introduciendo diversos compuestos que absorben longitudes de onda es-

pecíficas. Sin embargo, en la mayoría de los casos las técnicas de coloración tienen el inconveniente de no poder utilizarse en células vivas. Más aún, antes de ser coloreados los tejidos deben ser fijados, deshidratados, incluidos y seccionados, y todos estos procedimientos generan cambios químicos y morfológicos en las células y en la matriz extracelular.

23-3. Poder de resolución del microscopio óptico

Como en cualquier tipo de microscopio, en el microscopio óptico (fig. 23-1) el **poder de resolución** —que es la capacidad del instrumento para brindar imágenes distintas de puntos muy cercanos— depende de la longitud de onda λ y de la apertura numérica (AN) del objetivo. Así, el límite de resolución, que se define como la distancia mínima que debe existir entre dos puntos para que puedan ser discriminados como tales, responde a la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de resolución} = \frac{0{,}61\ \lambda}{\text{AN}}$$

A su vez, la AN depende del índice de refracción del medio (n) y del seno del ángulo de apertura (α), según la fórmula:

$$\text{AN} = \text{n} \cdot \text{seno}\ \alpha$$

Debe agregarse que el límite de resolución es inversamente proporcional al poder resolutivo del instrumento utilizado, de manera que cuanto mayor sea éste, menor será el límite de resolución conseguido. Puesto que el seno de α no puede exceder de 1 y el índice de refracción de los mejores materiales ópticos no puede ser superior a 1,6 (usando aceite de inmersión), la máxima AN posible de las lentes es de alrededor de 1,4. Con estos parámetros es fácil calcular que el límite de resolución del microscopio óptico no puede exceder los 170 nm

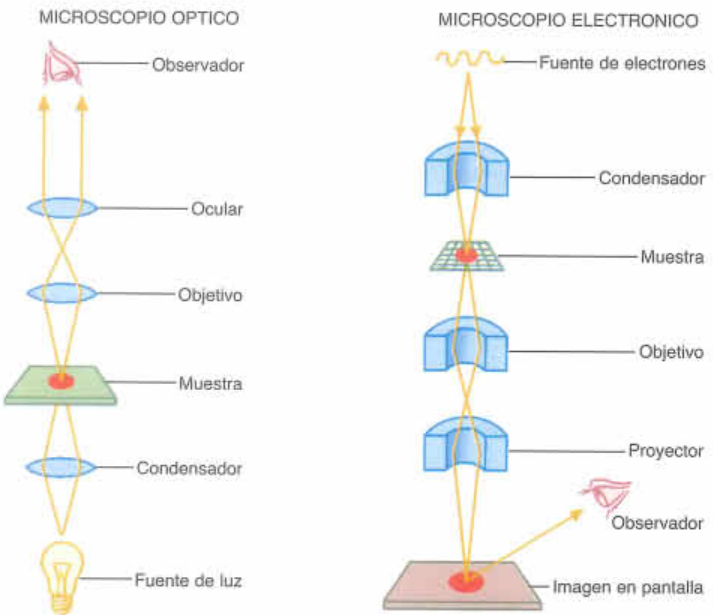


Fig. 23-1. Trayectorias de los rayos de luz y de los haces de electrones en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico, respectivamente.

(0,17 μm) cuando se usa luz monocromática de $\lambda = 400$ nm (violeta). En cambio, con luz blanca el poder resolutivo es de 250 nm (0,25 μm).

El aumento de la imagen en el microscopio óptico depende principalmente de las lentes del objetivo, con las cuales el incremento máximo es de 100× a 120×. Como el ocular agranda la imagen del objetivo entre 5 y 15 veces, se llega a un aumento de 500× a 1.500×.

23-4. Fijación del material

La fijación del material es esencial para preservar la morfología y la composición química de los tejidos y las células. Consiste en la muerte de éstas de una manera tal que las estructuras que poseían en vida se conserven con un mínimo de artificios.

La elección del **fijador** adecuado depende del estudio que se desea realizar. Por ejemplo, para el núcleo se utilizan los fijadores ácidos y para el examen de la actividad enzimática en el citoplasma se emplean la acetona, el formaldehído o el glutaraldehído, que producen una mínima desnaturalización y preservan muchos sistemas enzimáticos. Algunos agentes fijadores, como el formaldehído, el glutaraldehído, el bicromato y el bicloruro de mercurio, dan lugar a fuertes uniones entre las moléculas proteicas.

El grado de organización a nivel macromolecular es de gran importancia para la conservación de la estructura luego de la fijación. En una estructura bien organizada —como los cromosomas, las mitocondrias, los cloroplastos, etc.— existen diversas fuerzas que mantienen las moléculas unidas, y por lo tanto la acción del fijador no altera las estructuras. Sin embargo, en regiones celulares menos organizadas, como el citosol, la preservación es difícil, de modo que con frecuencia se producen artificios de fijación.

Cuando se intenta mantener intacta la composición química de los componentes tisulares se utilizan métodos de fijación físicos. El más conocido es el método de **congelación-desecación**, que consiste en la congelación rápida del tejido y su deshidratación en el vacío a baja temperatura. La fase de congelación comienza con la introducción de pequeñas piezas de tejido en un baño a una temperatura de –160 a –190 °C, lograda con nitrógeno líquido. También se emplea la fijación con helio líquido a una temperatura cercana al 0° absoluto (Kelvin). La desecación se realiza al vacío entre –30 y –40 °C. En tales condiciones el hielo sublima a vapor y se produce la deshidratación de los tejidos.

Las ventajas de este método son obvias: no causa retracción del tejido, la fijación es homogénea en toda la pieza, no hay extracción de sustancias solubles, la composición química se mantiene prácticamente sin cambios y la estructura se conserva con muy escasas modificaciones, generadas por los cristales de hielo. La rapidez de la fijación también permite sorprender a las células en momentos funcionales críticos.

23-5. Corte del material

Para poder ser observado con el microscopio, el tejido debe cortarse en láminas delgadas mediante instrumentos llamados **micrótomos**. Esta técnica exige que el tejido haya sido incluido en un material que le confiera cierta consistencia. Si el tejido ha de ser coloreado con los métodos convencionales, se lo incluye en parafina o en celoidina. Para poder ser infiltrado por el

material de inclusión, el tejido debe ser deshidratado. Este proceso requiere el uso de un líquido intermediario apropiado, por ejemplo, xileno, benceno o tolueno para la parafina, y etanol-éter para la celoidina.

Cuando se desea mantener la composición química de algunos componentes celulares se emplean micrótomos situados en el interior de cámaras enfriadas con CO_2 líquido, llamados micrótomos de congelación o **crióstatos**. Dado que producen una aceptable fijación de los tejidos y no requieren inclusión, con ellos pueden efectuarse cortes de tejidos frescos para estudios citoquímicos. Los **vibrátomos** son micrótomos de congelación provistos de una navaja vibrátil.

23-6. Coloración del material

La mayoría de los **colorantes tisulares** son de naturaleza orgánica y aromática. Se reconocen dos tipos de colorantes, los básicos y los ácidos. En los colorantes básicos el grupo cromóforo (es decir, el que imparte el color) es básico (catiónico). Por ejemplo, el azul de metileno es el clorhidrato de tetrametiltionina, en que la parte ácida es incolora. A veces los dos componentes de la sal son cromóforos, como en el eosinato de azul de metileno. En los colorantes ácidos los grupos cromóforos más comunes contienen nitritos.

Es conveniente que el estudiante aprenda cuál es el mecanismo de acción de los colorantes, para lo cual deberá recordar la propiedad que tienen las proteínas, los ácidos nucleicos y algunos polisacáridos de ionizarse como bases o como ácidos. En las proteínas la ionización básica se establece en el grupo amino ($-NH_2$) y en otros grupos básicos. La ionización ácida se produce en los grupos carboxilo (–COOH), hidroxilo (–OH), sulfato ($-HSO_4$) y fosfato ($-H_2PO_4$). Si el pH es superior al punto isoeléctrico, los grupos ácidos se ionizan; si es menor, lo hacen los grupos básicos (sección 23-31). A causa de esta propiedad, por encima del punto isoeléctrico las proteínas reaccionan con los colorantes básicos (azul de metileno, fucsina básica, etc.) y por debajo de él con los colorantes ácidos (naranja G, eosina, azul de anilina, etc.).

Para los ácidos nucleicos la carga neta es determinada por la ionización de los grupos fosfato, y su punto isoeléctrico es muy bajo. Por esta causa, para la tinción de estos ácidos se utilizan colorantes básicos, como el azul de toluidina para el ácido ribonucleico (su especificidad puede ser demostrada mediante una hidrólisis previa con la enzima ribonucleasa).

Ciertos colorantes básicos del grupo de las tiazinas —como la tionina, el azur A y el azul de toluidina— tienen la propiedad de teñir ciertos componentes celulares con un color diferente del que caracteriza al colorante. Esta propiedad —llamada metacromasia— posee interesantes derivaciones citoquímicas. La reacción es bastante positiva con los polisacáridos complejos (glicosaminoglicanos) y menor con los ácidos nucleicos y algunos lípidos ácidos. Es más intensa en las células que poseen moléculas con grupos sulfato, como en el caso del condroitinsulfato en el cartílago.

23-7. Microscopio de fase

Para el estudio de las células vivas se utilizan técnicas ópticas especiales, como la microscopia de contraste de fase y la de interferencia, en las cuales se recurre a cambios de fase (retrasos) en las radiaciones que atraviesan las estructuras biológicas, a pesar de ser éstas muy transparentes a la luz visible.

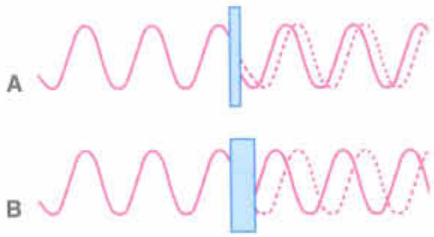


Fig. 23-2. A. Retraso o cambio de fase en las ondas de un rayo de luz cuando atraviesan un material transparente no absorbente de mayor índice de refracción que el medio. **B.** Cambio de fase más pronunciado ocasionado por un material igual al anterior pero más grueso.

En la figura 23-2 se muestran los efectos de ciertos materiales transparentes y no absorbentes sobre las ondas de los rayos de luz. Debido a que los índices de refracción de esos materiales son diferentes del que posee el medio, las amplitudes de las ondas no cambian pero sí sus velocidades. Por consecuencia, las ondas se retrasan, fenómeno que se conoce como cambio de fase. Obviamente, el retraso subsiste al salir el rayo del material transparente.

En el microscopio de contraste de fase, cuando los rayos laterales pasan a través del objetivo, son adelantados o retrasados un cuarto de longitud de onda con respecto a los centrales, los cuales atraviesan el objeto por medio de una placa anular que produce una variación en el plano focal posterior del objetivo. El efecto depende de la interferencia entre la imagen geométrica directa dada por la parte central del objetivo y la imagen lateral, que se retrasa o se adelanta en un cuarto de longitud de onda. Dado que los dos grupos de rayos se suman, cuando el contraste es negativo el material aparece más brillante en el medio que lo rodea, pero cuando es positivo los dos juegos de rayos experimentan una interferencia sustractiva, y la imagen del material aparece más oscura que la del medio (fig. 23-3). De este modo, pequeños cambios de fase producidos en el material son ampliados y transformados en cambios de amplitud (intensidad). Así, la imagen aparece con diversos tonos de gris, que dependen del espesor del material y de las diferencias existentes entre los índices de refracción del material y del medio.

La microscopia de fase se usa como método de rutina en la observación de células y tejidos vivos y es particularmente valiosa para la observación *in vivo* de la mitosis en células cultivadas (fig. 23-3).

23-8. Microscopio de interferencia

Fig. 23-3. Observación con microscopia de fase de la división celular por mitosis en una célula viva que se halla en metafase. 700×. (Cortesía de A. S. Bajer.)

El microscopio de interferencia se basa en principios similares a los del microscopio de fase, pero tiene la ventaja de dar resultados cuantitativos.

Este instrumento permite determinar cambios en el índice de refracción, mientras que el microscopio de fase sólo revela las discontinuidades más notables. Además, las variaciones de fase se pueden reflejar en cambios de color tan acentuados que las células vivas parecen coloreadas.

Un tipo especial de microscopio de interferencia es el llamado microscopio de Nomarski, en el cual un rayo de luz único atraviesa el material y el objetivo y luego se divide en dos rayos que se interfieren entre sí por medio de un prisma birrefringente. También se utilizan filtros que actúan como polarizadores y analizadores y un prisma compensador ubicado en el condensador. La imagen resultante presenta un relieve característico (fig. 23-4). Este microscopio es particularmente útil para el estudio de las células vivas durante la mitosis.

23-9. Microscopio de fondo oscuro

En la microscopia de fondo oscuro la luz se dispersa a nivel de los límites entre los distintos componentes celulares, siempre

que posean índices de refracción diferentes. El microscopio posee un condensador que ilumina al material oblicuamente. Con el condensador de campo oscuro la luz directa no ingresa en el objetivo, de modo que el fondo aparece oscuro y el material brillante a causa de la dispersión de dicha luz. Por ejemplo, en una célula cultivada, el nucléolo, la membrana celular, las mitocondrias y las gotas de lípidos se muestran brillantes y se destacan sobre el fondo oscuro del citoplasma. Por medio de este instrumento pueden descubrirse estructuras más pequeñas que las visualizadas con el microscopio óptico común.

23-10. Microscopio de polarización

Este microscopio se basa en el comportamiento de ciertos componentes celulares y tisulares cuando son observados con luz polarizada. Si el material es isotrópico, la luz polarizada se propaga a través de él con la misma velocidad, cualquiera que sea la dirección del plano de incidencia. Las sustancias y estructuras isotrópicas se caracterizan por tener el mismo índice de refracción en todas las direcciones. En cambio, en un material anisotrópico la velocidad de propagación de la luz polarizada es distinta según su dirección. Un material con estas características se denomina ***birrefringente*** porque presenta dos índices de refracción distintos, que corresponden a dos velocidades de transmisión de la luz.

En las fibras biológicas, la birrefringencia es positiva si el índice de refracción existente cuando la luz sigue el plano longitudinal de la fibra es mayor que cuando sigue el plano perpendicular, mientras que es negativa en la situación contraria.

El microscopio de polarización difiere de los convencionales por el agregado de dos elementos, el polarizador y el analizador, los cuales están constituidos por una hoja de polaroid o por prismas de Nicol de calcita. El polarizador se monta debajo del condensador y el analizador se coloca por encima de las lentes del objetivo. Este microscopio puede ser acoplado a una videocámara.

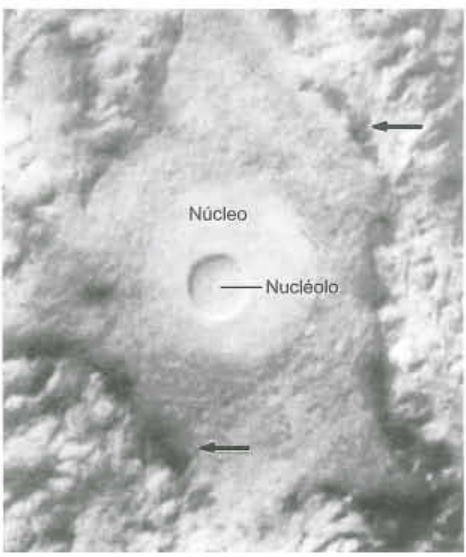


Fig. 23-4. Micrografía obtenida con la óptica de Nomarski de una neurona coloreada con un anticuerpo. El núcleo contiene un nucléolo de gran tamaño y sobre la superficie celular se observan terminaciones nerviosas que establecen contactos sinápticos (*flechas*). Los demás puntos oscuros representan cortes de axones. (Cortesía de J. Pecci Saavedra y T. Pasik.)

MICROSCOPIA ELECTRONICA

23-11. Microscopio electrónico de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que permite conocer la ultraestructura de las células y de la matriz extracelular, ya que posee un poder de resolución mayor que el del microscopio óptico. Utiliza la propiedad que tienen los haces de electrones de ser desviados por un campo electrostático o electromagnético, de la misma forma que un rayo de luz es refractado al atravesar una lente.

Si se coloca un filamento en el interior de un tubo de vacío y luego se lo calienta, el filamento emite electrones que pueden ser acelerados por medio de un potencial eléctrico. En estas condiciones el haz de electrones tiende a seguir una trayectoria rectilínea y presenta propiedades similares a las de la luz. Al igual que ésta, manifiesta un carácter vibratorio y corpuscular, pero la longitud de onda es

menor (λ = 0,005 nm para los electrones, en lugar de los 250 nm de la luz). El filamento (cátodo) que emite la corriente de electrones actúa como una fuente termoiónica. Por medio de una bobina electromagnética que cumple las funciones del condensador del microscopio óptico, los electrones se concentran en el plano donde se coloca el material. Una segunda bobina funciona como una lente objetivo, por lo que da una imagen agrandada del objeto en observación. Esta imagen es recibida por una tercera "lente" electromagnética, que al actuar como el ocular o lente de proyección aumenta la imagen que proviene del objetivo. La imagen final se observa sobre una pantalla fluorescente o se recoge en una placa fotográfica (fig. 23-1).

A pesar de las semejanzas, entre el microscopio óptico y el microscopio electrónico existen grandes diferencias, algunas de las cuales corresponden al mecanismo de formación de la imagen. En el microscopio electrónico dicho mecanismo se basa en la dispersión de los electrones, que al chocar con los núcleos de los átomos del material se dispersan de forma tal que caen por fuera de la apertura de la lente del objetivo. En esta dispersión —llamada elástica— la imagen observada en la pantalla fluorescente refleja la ausencia de esos electrones, ya que —como vimos— caen fuera de la apertura del objetivo. Además, la dispersión se debe a múltiples colisiones entre los electrones, que disminuyen la energía de los que logran pasar. En este caso la dispersión se llama inelástica.

La dispersión de los electrones depende del espesor y la densidad molecular del material y del número atómico de los átomos que lo componen. A mayor número atómico, mayor dispersión. Gran parte de los átomos que integran las estructuras biológicas tienen un número atómico bajo y contribuyen muy poco a la formación de la imagen. Por esta razón, el material debe ser procesado con átomos pesados para aumentar su contraste (sección 23-13).

El poder de resolución del microscopio electrónico es tan alto que la imagen del objetivo puede ser aumentada por el ocular en una proporción mucho mayor que la lograda con el microscopio óptico. Así, con un aumento inicial del objetivo de 100×, se puede ampliar la imagen con la bobina proyectora unas 200 veces, lo que equivale a un aumento de 20.000×. Con los instrumentos modernos se obtienen mayores incrementos todavía, ya que poseen una o más lentes intermedias que permiten lograr aumentos de hasta 1.000.000×. Más aún, los negativos fotográficos pueden volver a aumentarse, lo cual posibilita aumentos finales de 10.000.000× cuando la resolución de las imágenes lo permite.

Otra diferencia con el microscopio óptico es que el electrónico ofrece una mayor profundidad de foco.

23-12. Corte del material

Una de las limitaciones de la microscopia electrónica deriva del escaso poder de penetración que tienen los electrones. Si el espesor del material que va a ser estudiado excede los 500 nm, la opacidad es casi total.

La necesidad de realizar cortes ultrafinos ha conducido al empleo de medios de inclusión de considerable dureza. Los más usados son resinas de epoxi, que impregnan los tejidos y luego se polimerizan con catalizadores apropiados. Se han elaborado resinas miscibles en agua, que pueden infiltrarse y polimerizarse a temperaturas de –35 a –50 °C. Estas resinas reducen los artificios y permiten efectuar estudios citoquímicos.

Para lograr cortes muy delgados se utilizan **ultramicrótomos**, que emplean cuchillas de vidrio o de diamante. Con estos instrumentos se consiguen cortes de hasta 20 nm de espesor. El material cortado se coloca sobre una película de colodión o de carbón muy fina (de 7,5 a 15 nm de espesor), que a su vez se apoya sobre una delgada grilla de metal. Además, el material debe ser deshidratado para poder soportar el vacío al que se lo someterá.

Una metodología para el estudio de las macromoléculas es la denominada de monocapas, en la cual aquéllas se extienden sobre una interfase aire-agua antes de ser colocadas sobre una película. Este procedimiento ha dado excelentes resultados para la observación de moléculas de ADN y de ARN.

23-13. Aumento de contraste entre los componentes del material

El empleo de sustancias que poseen átomos pesados —como osmio, uranio y plomo— permite obtener un aceptable contraste entre los componentes de las células y los tejidos. En ciertas condiciones estas sustancias actúan como colorantes electrónicos comparables a los colorantes histológicos, ya que se combinan específicamente con varias estructuras del material examinado.

Para estudiar algunos procesos biológicos —como la incorporación de macromoléculas o de partículas por endocitosis— se utilizan trazadores, que poseen un alto grado de opacidad a los electrones. Estos trazadores permiten detectar las vías por las que son transportadas ciertas sustancias, tanto entre las células como dentro de ellas. Los trazadores suelen ser enzimas cuyos productos son opacos a los electrones. Por ejemplo, las peroxidasas —inyectadas en animales que luego se sacrifican en plazos progresivamente mayores— se detectan mediante el uso de peróxido de hidrógeno y 3,3-diaminobencidina. Uno de los trazadores más pequeños es la microperoxidasa, que tiene un peso molecular de sólo 1,9 kDa.

Otra técnica que permite aumentar el contraste de los componentes celulares es la de **sombreado**, que en las fotomicrografías da lugar a imágenes con un aspecto tridimensional no conseguido con los otros métodos. Para ello, el material se coloca dentro de una cámara de vacío en cuyo interior se evapora un metal pesado (como cromo, paladio, platino o uranio) mediante un filamento incandescente. Dado que el metal se aplica oblicuamente, se deposita sobre uno de los lados de las estructuras en estudio, por lo que en el lado opuesto se generan sombras cuyas longitudes permiten calcular el espesor de los elementos observados.

Otra técnica —empleada para el estudio de las macromoléculas y de los virus— es la de **coloración negativa**, en la que el material es embebido en una gota de un líquido denso, por ejemplo, fosfotungstato. Este penetra en todos los espacios vacíos entre las macromoléculas, las cuales aparecen bien delimitadas y con un contraste negativo (fig. 1-4).

23-14. Congelación-fractura de membranas celulares y congelación-grabado de células

El análisis de la ultraestructura interior de las membranas celulares se ha facilitado con el empleo de la técnica denominada de **congelación-fractura** (criofractura).

Lo mismo ha ocurrido con el estudio ultramicroscópico de las demás estructuras de la célula, aunque en este caso gracias al uso de una técnica un poco más compleja, llamada de **congelación-grabado** (fig. 23-5). Ambas técnicas se basan en el congelamiento rápido del tejido y su fractura con un instrumento cortante. Si se desea que la fractura pase por el plano que separa a las monocapas lipídicas de una membrana, el tejido debe congelarse con nitrógeno líquido. En cambio, si se desea que la fractura pase entre las células o que las atraviese, el tejido debe ser congelado con helio líquido.

La técnica de congelación-fractura continúa con el depósito de una capa de metal sobre la superficie de la monocapa lipídica de la membrana que queda expuesta. El metal —suele emplearse platino— es evaporado como en la técnica de sombreado descrita en la sección anterior. Finalmente, el tejido que sirvió de molde se disuelve y la réplica de metal que se obtiene se coloca sobre una grilla para su observación con el microscopio electrónico. La criofractura ha permitido importantes descubrimientos sobre la estructura molecular de la bicapa lipídica de diferentes membranas celulares debido a que la corta por su interior.

A diferencia de la anterior, la técnica de congelación-grabado requiere que se cincele la superficie del tejido que queda expuesta después de la fractura, lo cual se consigue mediante la sublimación al vacío de la fina capa de hielo que la cubre, ya que el pasaje directo de hielo a vapor tiene la propiedad de esculpir su relieve. A continuación, sobre la superficie grabada se deposita un metal, que también suele ser platino y se aplica de la misma manera que en la técnica de congelación-fractura. Luego se agrega una capa de carbono evaporado, el cual se deposita con un ángulo de 90° a fin de llenar las áreas del grabado no cubiertas por el metal. Finalmente, el tejido subyacente se desecha y la réplica de metal-carbono que se obtiene se coloca sobre una grilla para su observación con el microscopio electrónico. La micrografía de la figura 23-5 muestra que la técnica de congelación-grabado da una idea bastante acabada de la organización tridimensional de los componentes celulares.

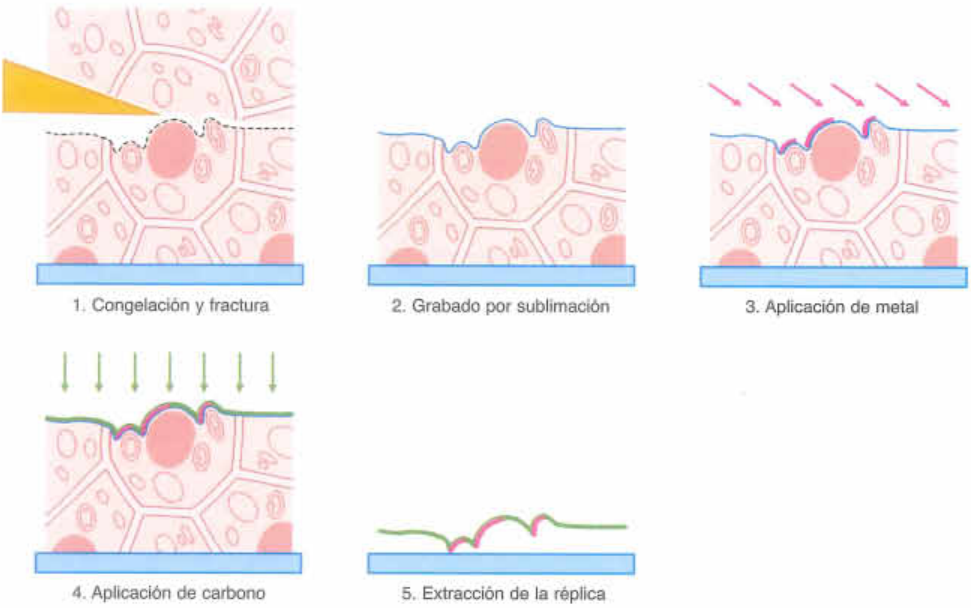
23-15. Microscopio electrónico de barrido

Con el microscopio electrónico de barrido o SEM (por *scanning electron microscope*) se pueden obtener imágenes topográficas tridimensionales de los materiales sujetos a estudio (fig. 23-6).

Se emplea un haz de electrones que actúa sobre la superficie del material; allí los electrones excitan a las moléculas de la muestra, las cuales emiten un delgado haz de electrones secundarios que adquieren un movimiento semejante al observado en los tubos de rayos catódicos. Dado que estos electrones son derivados hacia un tubo fotomultiplicador, generan imágenes en una pantalla de televisión.

Para aumentar el poder dispersante de las estructuras situadas en la superficie de la muestra, ésta se recubre con un metal pesado (por ejemplo, platino), que se evapora en una cámara de vacío. Además, se hace rotar la muestra para que el metal se deposite uniformemente en toda la superficie.

Se ha logrado una combinación del microscopio electrónico de barrido con el de transmisión, llamado STEM (por *scanning-transmission electron microscope*).



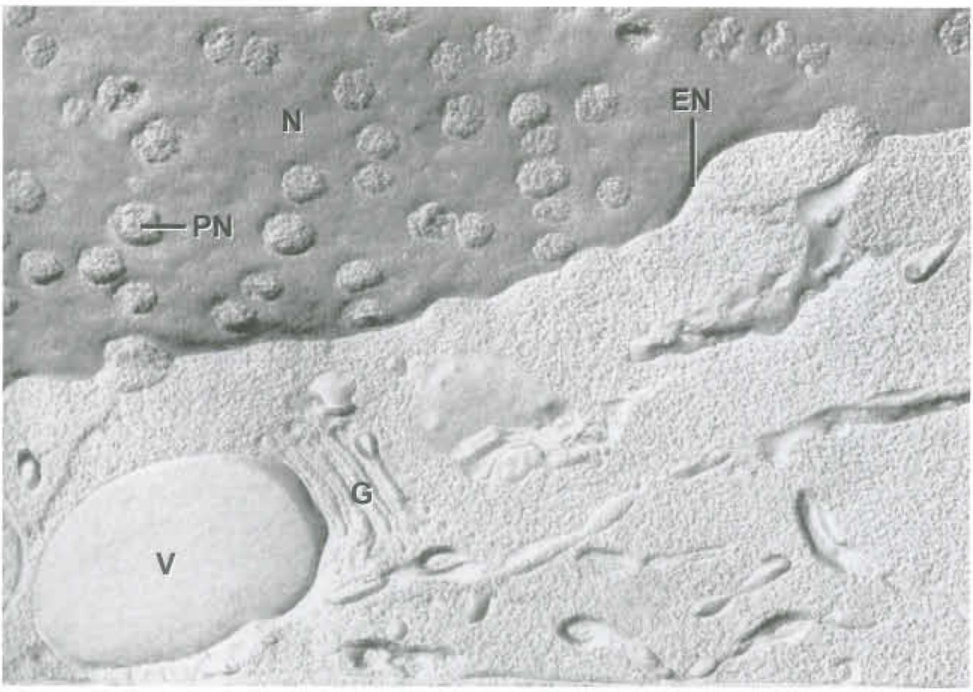


Fig. 23-5. Arriba. Técnica de congelación-grabado. **1.** Congelación del tejido y fractura con un instrumento cortante. **2.** Exposición de uno de las fragmentos y grabado de su superficie por sublimación del hielo al vacío. **3.** Partes de la superficie grabada se cubren con un metal aplicado en forma oblicua. **4.** Las áreas de metal y las que se hallan entre ellas se cubren con carbono, que se aplica con un ángulo de 90°. **5.** Disolución del tejido y extracción de la réplica de metal-carbono para ser observada con el microscopio electrónico. **Abajo.** Réplica de una célula de raíz de cebolla. Se observan los poros nucleares (*PN*), el núcleo (*N*), la envoltura nuclear (***EN***), el complejo de Golgi (*G*) y una vacuola (*V*). 75.000×. (Cortesía de D. Branton.)

23-16. Reconstrucción de imágenes a partir de micrografías electrónicas

En el caso de moléculas o estructuras supramoleculares dispuestas en forma de cristales, es posible obtener una información detallada partiendo de electromicrografías poco claras. El método de reconstrucción de imágenes consiste en colocar la micrografía electrónica en la trayectoria de un haz de rayos láser, a fin de obtener un diagrama de difracción óptica. Luego, a partir de éste, se puede reconstruir la imagen de las moléculas individuales mediante el procesamiento por computadora de las fases y amplitudes correspondientes a un área de la micrografía electrónica.

En la figura 6-13 se ofrece un ejemplo de reconstrucción de imágenes en el cual, a partir de un conjunto de macromoléculas con coloración negativa localizadas en una unión comunicante, fue posible obtener las imágenes de las seis proteínas del conexón (cap. 6-14).

23-17. Difracción de rayos X

Para descubrir la estructura molecular a nivel atómico se emplea una técnica ajena a la microscopia electrónica, llamada difracción de rayos X.

El método requiere que la molécula sea bombardeada por un delgado haz de rayos X de 0,1 a 0,2 nm de longitud de onda a fin de que los átomos de la molécula dispersen al haz en distintas direcciones, y que éste, así difractado, alcance una placa fotográfica situada por detrás de la muestra. Finalmente, la estructura tridimensional de la molécula se descifra mediante complejos análisis de las posiciones y las intensidades de las manchas registradas en la placa fotográfica.

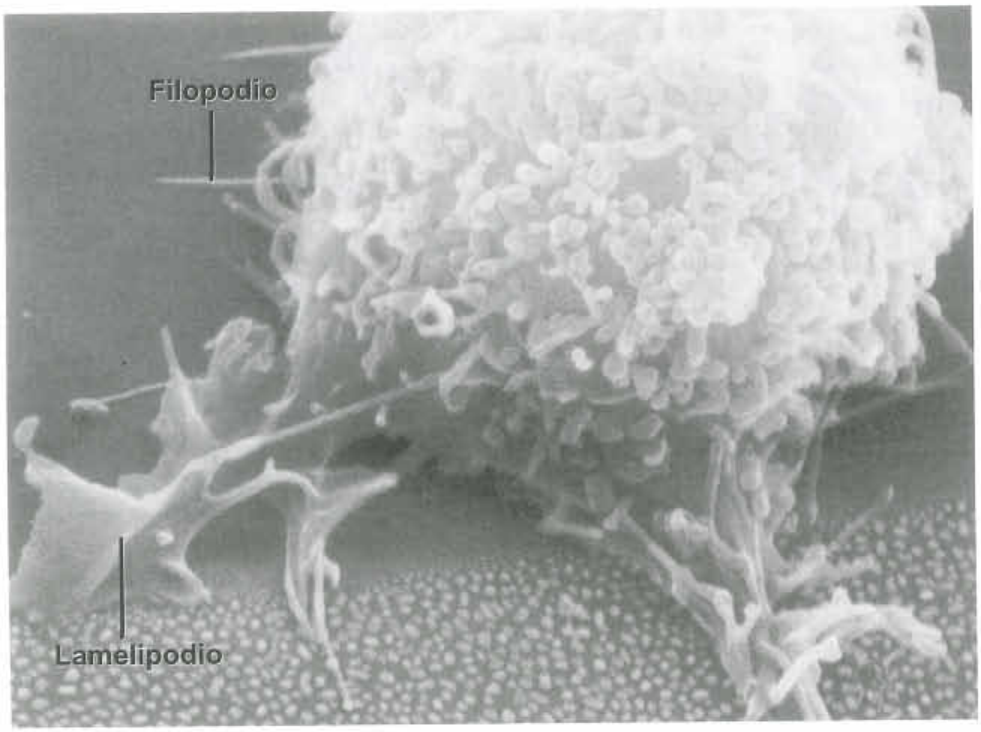


Fig. 23-6. Micrografía electrónica de barrido de una célula cultivada y cubierta con partículas de oro. Se observan lamelipodios y filopodios. (Cortesía de Albrecht-Buehler.)

ESTUDIO DE LAS CELULAS VIVAS

23-18. Cultivo celular

Uno de los métodos más empleados para estudiar las células vivas es el cultivo celular. Desde que se pudo hacer crecer explantes de tejidos durante varias generaciones, la técnica de cultivo progresó notablemente. Hoy es uno de los procedimientos más utilizados para dilucidar problemas fundamentales de la biología celular.

En los primeros tiempos la técnica consistía en colocar un explante de un pequeño trozo de tejido —preferentemente embrionario— en un medio compuesto por suero sanguíneo, extracto de embriones y solución salina. A partir de 1955 se crearon medios químicos más adecuados, y ahora que se conocen los requerimientos nutricios de las células eucariotas se las puede mantener y hacer crecer en un medio sintético enriquecido con suero.

Se distinguen tres tipos de cultivos, denominados primarios, secundarios y de líneas establecidas. Los **cultivos primarios** se obtienen directamente de los animales o de los vegetales. El tejido se separa en condiciones de asepsia y se corta en pequeños trozos, a los que se trata con tripsina. Esta enzima proteolítica disocia los agregados celulares y genera una suspensión de células libres que se cultivan en una cápsula de Petri con un medio de cultivo apropiado.

El **cultivo secundario** se obtiene mediante el tratamiento con tripsina de un cultivo primario, seguido de un nuevo cultivo en otra cápsula de Petri.

De uso más corriente son los **cultivos de líneas establecidas**, cuyo crecimiento se prolonga debido a la condición cancerosa de las células. Entre las más usadas se encuentran las células *HeLa* —obtenidas de un carcinoma humano (cap. 21-4)—, las células *L* y *3T3* de embriones de rata (fig. 23-6), las células *BHK* obtenidas del riñón del hámster recién nacido y las células *CHO* del ovario del mismo animal adulto. Cuando se cultivan células normales no sobreviven mucho tiempo, ya que al cabo de varios subcultivos dejan de dividirse y mueren. Las líneas establecidas tienen características especiales: se disponen apretadamente, necesitan menor concentración de suero sanguíneo y suelen ser heterohaploides (el número de los cromosomas varía de una célula a otra). A pesar de tales anomalías estos cultivos son muy útiles para el estudio del cáncer. Uno de los adelantos más importantes consistió en la obtención de cepas puras, o sea, de poblaciones celulares derivadas de una sola célula progenitora.

23-19. Microcirugía celular

Este método ha contribuido considerablemente al conocimiento de la célula viviente. La microcirugía consiste en la introducción de micropipetas, microagujas, microelectrodos y microtermocuplas en las células y los tejidos. Se vale de aparatos especiales que permiten el movimiento controlado de tales instrumentos bajo el microscopio. Este recurso hace posible la disección y extracción de partes de células y tejidos, la inyección de sustancias, la medición de variables eléctricas, el pasaje de componentes de una célula a otra, etc. También se emplean rayos láser para producir daños controlados en determinadas estructuras celulares.

CITOQUIMICA

23-20. Los métodos citoquímicos permiten identificar compuestos químicos en sus localizaciones celulares originales

El principal objetivo de la citoquímica consiste en la identificación *in situ* de los diferentes compuestos químicos de las células. Este objetivo no sólo es cualitativo sino también cuantitativo. Más aún, a veces involucra el estudio de los cambios dinámicos producidos en el contenido químico celular durante los distintos estadios funcionales. Así, ha permitido establecer el papel desempeñado por diferentes componentes celulares en varios procesos metabólicos.

Para la determinación citoquímica de una sustancia deben cumplirse los siguientes requisitos: 1) debe ser inmovilizada en su posición original; 2) debe ser identificada por un procedimiento que sea específico para ella o para un grupo químico que contenga. Ello se logra por medio de métodos físicos o mediante reacciones químicas similares a las usadas en química analítica, pero adaptadas a los tejidos.

23-21. Para la detección de grupos aldehído se utiliza el reactivo de Schiff

Para detectar proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos pueden emplearse algunos agentes cromogénicos capaces de unirse selectivamente a ciertos grupos químicos de estas moléculas. Veamos algunos ejemplos:

El reactivo de Schiff, selectivo de los grupos aldehído, se utiliza para detectar el ácido desoxirribonucleico, algunos hidratos de carbono y lípidos. Este reactivo se prepara tratando fucsina básica, que contiene parafucsina (cloruro de triaminotrifenilmetano), con ácido sulfuroso. La parafucsina se transforma en un compuesto incoloro (ácido bis-N-aminosulfónico), es decir, el reactivo de Schiff, que es "recoloreado" cuando reacciona con los grupos aldehído de las moléculas celulares.

Reacción de Feulgen. El ADN puede ser detectado por medio de la reacción de Feulgen. Para ello, los cortes de tejido fijado se someten a una hidrólisis ácida débil y luego se tratan con el reactivo de Schiff. Esa hidrólisis es suficiente para extraer el ARN (que desaparece), pero no el ADN. Los pasos de la reacción son los siguientes: 1) la hidrólisis ácida extrae las purinas del ADN a nivel de la unión desoxirribosa-purina, por lo que se liberan los grupos aldehído de la desoxirribosa; 2) los grupos aldehído libres reaccionan con el reactivo de Schiff. Cuando se aplica a la célula, la reacción de Feulgen es positiva en el núcleo y negativa en el citoplasma. Las fibras de cromatina condensada son francamente Feulgen-positivas, pero el nucléolo es negativo. Se puede confirmar la especificidad de la reacción tratando a los cortes con desoxirribonucleasa, enzima que hidroliza al ADN.

Reacción de PAS. La reacción de PAS se basa en la oxidación de los grupos glicólicos 1-2′ de los polisacáridos mediante el ácido peryódico, lo cual produce la liberación de los grupos aldehído, que entonces dan positiva la reacción de Schiff. En las células vegetales este test es positivo para el almidón, la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas, mientras que en las células animales lo es para las mucinas, el ácido hialurónico, los proteoglicanos y la quitina.

23-22. La detección de los lípidos puede lograrse mediante colorantes liposolubles

Las gotas de lípidos en el citoplasma se demuestran por medio del tetróxido de osmio, que las colorea de negro al reaccionar con los ácidos grasos no saturados de los triglicéridos. Las coloraciones con Sudán III o rojo escarlata tienen mayor valor citoquímico porque actúan por un simple proceso de difusión y solubilidad, motivo por el cual se acumulan en el interior de las gotas lipídicas. El Sudán negro B, además de brindar un mayor contraste, presenta la ventaja de disolverse también en los fosfolípidos y en el colesterol.

23-23. Algunas enzimas pueden detectarse después de su incubación con sustratos adecuados

Para estudiar algunas enzimas los cortes deben realizarse en el crióstato (sección 23-5). En cambio, otras enzimas resisten una breve fijación en acetona fría, formaldehído o glutaraldehído. Las técnicas enzimáticas se basan en la incubación de los cortes tisulares con un sustrato apropiado. Por ejemplo, para la fosfatasa alcalina se utiliza el método de Gomori, que usa ésteres fosfóricos de glicerol como sustratos.

23-24. Los métodos citofotométricos recurren a la absorción de la luz ultravioleta

Diversos componentes celulares tienen la propiedad de absorber específicamente la luz ultravioleta. Así, los ácidos nucleicos la absorben en la banda de 260 nm, mientras que las proteínas lo hacen en la de 280 nm. Estas sustancias pueden analizarse cuantitativamente por medio de instrumentos denominados citofotómetros. En los ácidos nucleicos la absorción específica de la luz se debe a la presencia de las bases purínicas y pirimidínicas, por lo que es semejante en el ADN, el ARN y los nucleótidos. En consecuencia, la citofotometría con luz ultravioleta permite la localización de los dos tipos de ácidos nucleicos, sin distinguirlos entre sí.

23-25. La fluorescencia puede ser natural o mediada por fluorocromos

Los componentes tisulares pueden ser descubiertos por la fluorescencia que emiten en el espectro visible. Los tejidos emiten dos tipos de fluorescencia: 1) una natural (autofluorescencia), surgida de sustancias presentes normalmente en los tejidos, y 2) una secundaria, inducida con colorantes fluorescentes, llamados ***fluorocromos***. El examen de los cortes se realiza con el **microscopio de fluorescencia**. Veamos algunos ejemplos:

El colorante naranja de acridina genera una fluorescencia verde en el ADN y otra roja en el ARN. Ambas pueden analizarse simultáneamente mediante un citofluorómetro especial. Algunas proteínas son detectadas mediante colorantes fluorescentes como la fluoresceína y la rodamina sin que experimenten alteraciones, de modo que al ser inyectadas en un animal que luego es sacrificado, es posible localizarlas en sus células o en la matriz extracelular. Entre otras aplicaciones, estos colorantes permiten analizar la fluidez de las proteínas en las membranas celulares (cap. 3-6) y detectar las uniones comunicantes entre las células, de ahí que se los utilice para el estudio de la permeabilidad tisular.

Fig. 23-7. Métodos inmunohistoquímicos directos que emplean anticuerpos marcados con un colorante fluorescente (**A**), una sustancia radiactiva (**B**) o la enzima peroxidasa (**C**).

INMUNOCITOQUIMICA

23-26. En las reacciones inmunocitoquímicas se utilizan anticuerpos marcados

La inmunocitoquímica se basa en las propiedades antigénicas de los componentes celulares, que por eso pueden ser detectados mediante anticuerpos cuando a éstos se les acoplan marcadores capaces de ser vistos con la ayuda del microscopio óptico, el microscopio de fluorescencia o el microscopio electrónico.

Métodos directos. La figura 23-7 ilustra tres métodos de observación directa del complejo anticuerpo-componente celular. En el primero el anticuerpo se conjuga con un colorante fluorescente que se detecta, según se vio, con el microscopio de fluorescencia. En el segundo el anticuerpo se marca con una sustancia radiactiva (por ejemplo, tritio) que se revela mediante una radioautografía (sección 23-27). En el tercero el anticuerpo se liga a la peroxidasa, una enzima que en presencia de diaminobencidina y peróxido de hidrógeno produce un depósito opaco visible con el microscopio. Además de la peroxidasa se usan otras enzimas, como la fosfatasa alcalina y la β-galactosidasa. Finalmente, otro método inmunocitoquímico de observación directa emplea anticuerpos acoplados a la ferritina, que es una proteína rica en hierro opaca a los electrones.

Métodos indirectos. Cuando la sensibilidad de los métodos directos es baja debe recurrirse a los métodos indirectos, en los que la imagen del complejo anticuerpo-componente celular se amplifica debido a que se introduce un segundo anticuerpo (fig. 23-8). Los dos anticuerpos se obtienen de animales diferentes. Por ejemplo, si el primero se extrae del conejo, el segundo debe ser un anticuerpo anticonejo obtenido de la cabra o la oveja. Igual que en los métodos directos, el segundo anticuerpo se marca con colorantes fluorescentes, sustancias radiactivas, peroxidasa o ferritina.

Otro método inmunocitoquímico indirecto que requiere la ayuda del microscopio electrónico se basa en la aplicación de partículas de oro coloidal, las cuales son muy opacas a los electrones. Estas partículas se rodean con proteínas extraídas del *Staphylococcus aureus* —llamadas proteínas A—, que tienen la propiedad de interactuar con el extremo libre del anticuerpo. Las partículas de oro son fáciles de descubrir con el microscopio electrónico. Más aún, debido a su pequeño tamaño permiten identificar claramente los componentes celulares y hacer una estimación cuantitativa de los mismos.

RADIOAUTOGRAFIA

23-27. La radioautografía tiene múltiples aplicaciones

La radioautografía se basa en la marcación de componentes celulares con **radioisótopos**, los cuales pueden demostrarse por su capacidad de interactuar con los cristales de bromuro de plata (BrAg) de las emulsiones fotográficas.

Fig. 23-8. Método inmunohistoquímico indirecto que emplea un segundo anticuerpo marcado.

Así, el radioisótopo es incorporado a un componente de la célula y luego localizado mediante una emulsión fotográfica. Para ello, el tejido con el componente celular marcado se pone en contacto con la emulsión fotográfica durante un tiempo y la radioautografía se revela como una fotografía común. Luego la imagen fotográfica se superpone con otra del tejido (que se procesó para ser examinado con el microscopio) y se obtiene una idea bastante precisa sobre la localización del componente celular que lleva la marca del radioisótopo.

La técnica radioautográfica más usada es la que emplea emulsiones fotográficas líquidas con cristales de BrAg. El método comprende las siguientes etapas (fig. 23-9): 1) el corte del tejido se monta sobre un portaobjeto o una grilla y se sumerge en la emulsión fotográfica a 45 °C; 2) el preparado queda a temperatura ambiente hasta que la emulsión fotográfica forma una película de gelatina sobre la superficie del tejido; 3) el conjunto se guarda varios días o semanas en una caja hermética —para que no ingrese la luz— a fin de que la radiación que emite el radioisótopo incida sobre los cristales de BrAg de la película y convierta a los iones Ag en granos de plata metálica; 4) la película se revela y los granos de plata se visualizan como puntos oscuros.

El radioisótopo que más se usa es el tritio (^3H). Por ejemplo, se utiliza timidina tritiada para estudiar el metabolismo y el mecanismo de replicación del ADN, ya que la timidina es un nucleósido específico de este ácido nucleico. Similarmente, se emplea uridina tritiada para estudiar la formación y la dinámica celular del ARN. Por otra parte, en el ejemplo que aparece en la figura 23-10 puede verse que los núcleos marcados con timidina tritiada que se hallan en el fondo de las criptas intestinales de un ratón inyectado 8 horas antes, aparecen en el extremo libre de las vellosidades intestinales a las 36 horas de la inyección. Así, el marcador revela en forma gráfica la evolución

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

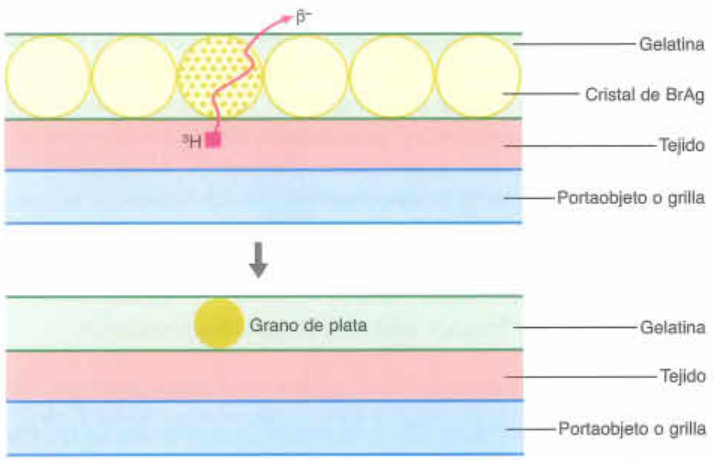


Fig. 23-9. Radioautografía. **Arriba.** Una partícula beta (β^-) emitida por un átomo de tritio (^3H) del tejido choca contra un cristal de BrAg y lo convierte en un grano de plata metálica. **Abajo.** Examen con el microscopio electrónico después del revelado. Todos los cristales de BrAg no impactados por la radiación se disolvieron durante la fijación fotográfica. (Cortesía de L. G. Caro.)

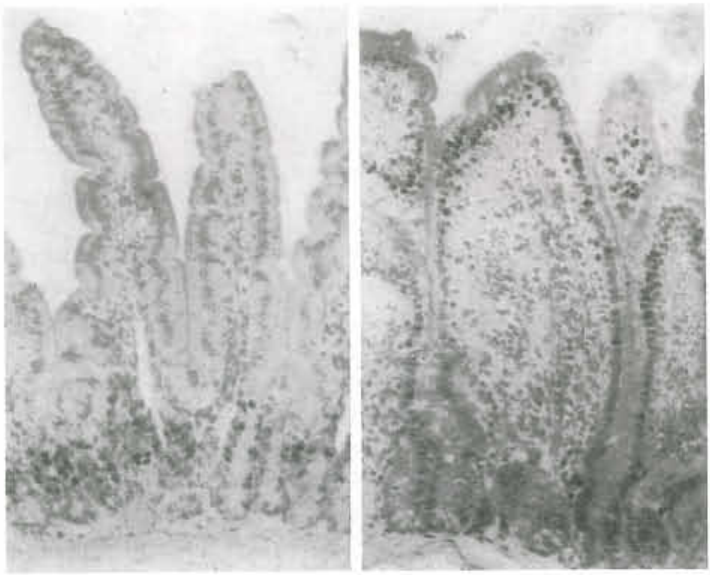


Fig. 23-10. Cortes de intestino de ratón inyectado con timidina tritiada. **Izquierda.** Ratón sacrificado a las 8 horas de la inyección. **Derecha.** Ratón sacrificado a las 36 horas de la inyección. (Cortesía de C. P. Leblond.)

de algunas células intestinales, mostrando que se multiplican en el fondo de las criptas, recorren el epitelio y mueren en la punta de las vellosidades.

FRACCIONAMIENTO CELULAR Y MOLECULAR

23-28. El fraccionamiento celular sirve para aislar a los distintos componentes de la célula

El fraccionamiento celular consiste en la homogeneización o destrucción de las uniones celulares por medio de diferentes procedimientos mecánicos o químicos, lo cual rompe las membranas plasmáticas y separa a las fracciones subcelulares de acuerdo con su masa, superficie y peso específico. Se utilizan diversos métodos de fraccionamiento celular, la mayoría basados en la homogeneización de la célula en una solución acuosa —generalmente de sacarosa— a distintas concentraciones.

En la figura 23-11 se ha esquematizado el procedimiento corriente. En este ejemplo el hígado de un animal se perfunde con una solución salina helada y luego con sacarosa 0,25 M, helada también. Se hace atravesar el tejido por un disco de acero perforado, se lo homogeneiza en una solución de sacarosa 0,25 M y se lo somete a una serie de centrifugaciones de fuerza centrífuga creciente.

Este tipo de fraccionamiento celular permite dividir los componentes celulares en cuatro fracciones: 1) la ***nuclear***, que incluye los núcleos y los filamentos del citoesqueleto; 2) la ***mitocondrial***, con las mitocondrias, los peroxisomas y los lisosomas; 3) la ***microsómica***, con fragmentos del RE, del complejo de Golgi y de otras membranas celulares, y 4) la ***soluble***, que contiene los ribosomas, macromoléculas grandes, virus, etc. En algunos tejidos glandulares se obtiene otra fracción más, rica en gránulos secretorios.

23-29. Las fracciones celulares se obtienen por ultracentrifugación

En el ejemplo de la figura 23-11 se realiza la separación de las fracciones celulares mediante el método de ultracentrifugación diferencial, que re-

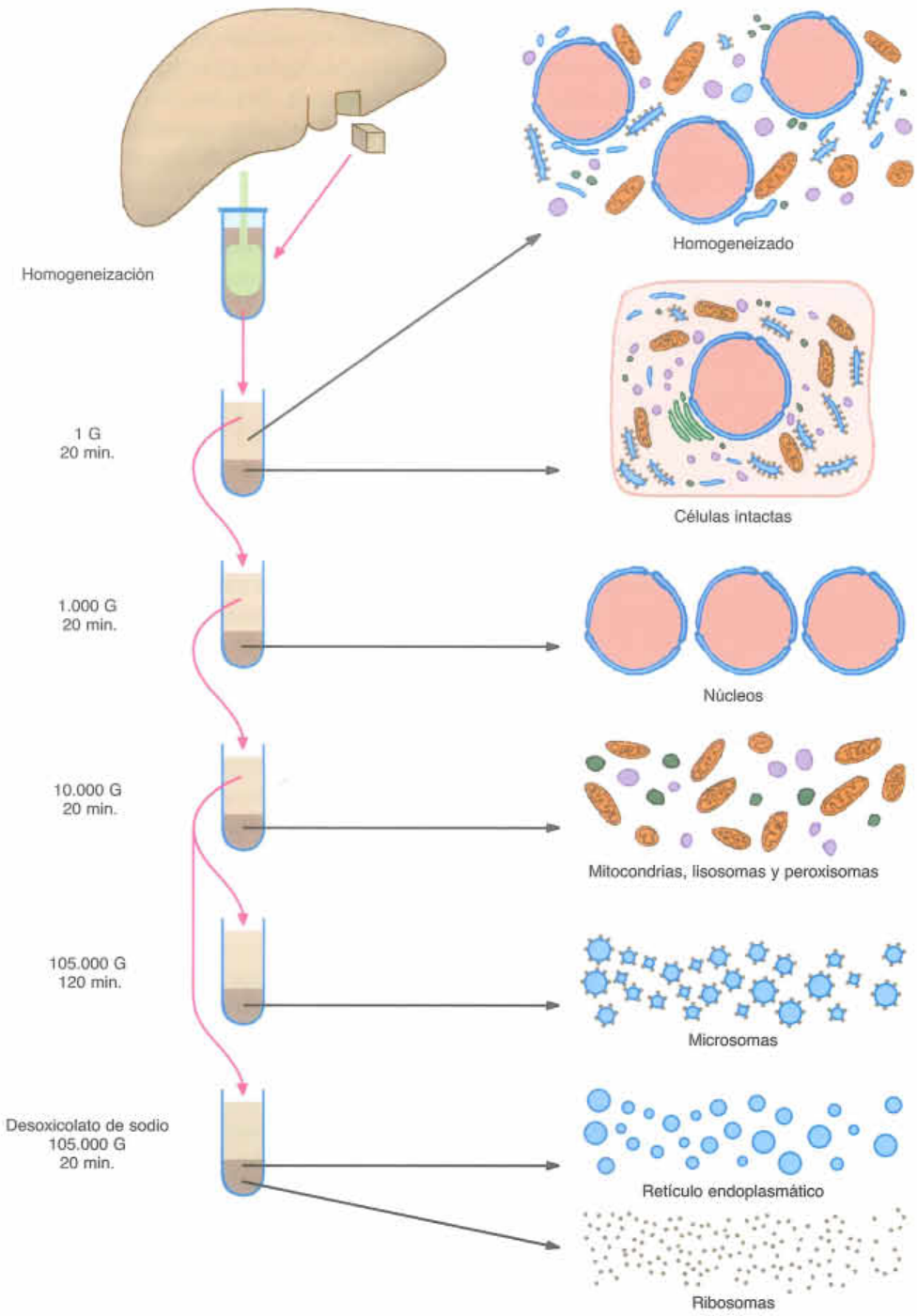


Fig. 23-11. Etapas de la técnica de centrifugación diferencial. A la izquierda se observa un trozo de hígado homogeneizado y sometido a una serie de centrifugaciones de fuerzas centrífugas crecientes. A la derecha se ilustran las subfracciones que descubre el microscopio electrónico. (De W. Bloom y D. W. Fawcett; modificado.)

quiere el empleo de **ultracentrífugas**. Al principio todas las partículas se hallan distribuidas homogéneamente, pero luego de la centrifugación se depositan en el tubo a distintas alturas de acuerdo con sus respectivas velocidades de sedimentación. Las técnicas de ultracentrifugación se facilitan si previamente se establecen gradientes de densidad, los cuales pueden ser continuos o discontinuos. Para lograr gradientes discontinuos se colocan en el tubo de la centrífuga sucesivas soluciones de densidad creciente, por ejemplo, soluciones de sacarosa cuya molaridad, partiendo del fondo del tubo, varía entre 1,6 y 0,5 M. Una vez formado el gradiente, se coloca la muestra en el tope de la solución, que entonces se centrifuga hasta que las distintas partículas alcancen su posición de equilibrio con respecto a las sucesivas fases del gradiente.

La ultracentrifugación permite separar partículas aún más pequeñas —como virus y macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos)— en la **ultracentrífuga analítica**. Con este aparato se determinan los coeficientes de sedimentación de esas partículas, que como se vio en el capítulo 16-9 se expresan en unidades Svedbergs o S.

23-30. La citometría de flujo permite seleccionar células o componentes subcelulares enteros de una muestra

Existen métodos para seleccionar células enteras y los cromosomas metafásicos. Esto se logra mediante el empleo de cámaras de sedimentación especiales —que funcionan con pequeñas fuerzas de gravedad—, en las cuales las células o los cromosomas se separan según sus tamaños y densidades.

Pero las poblaciones celulares pueden ser separadas mucho más eficientemente mediante un instrumento llamado **citómetro de flujo**, en el que las células fluyen una tras otra por un tubo muy delgado. Son discriminadas —y entonces separadas— de acuerdo con la fluorescencia que emiten. El fluorocromo es agregado en los distintos tipos celulares mediante anticuerpos específicos (sección 23-26).

23-31. Las proteínas pueden separarse por enfoque isoeléctrico y por electroforesis

En el capítulo 2-11 definimos el mecanismo que da lugar a la **electroforesis** y vimos que cada proteína tiene un **punto isoeléctrico** característico. Ahora veremos cómo pueden ser utilizadas estas propiedades para separar a las proteínas.

En la técnica llamada de enfoque isoeléctrico se hace la electroforesis de las proteínas a través de un gradiente de pH. Las proteínas se desplazan hasta que alcanzan un pH igual al del punto isoeléctrico. En ese momento la migración en el campo eléctrico se detiene debido a que las proteínas tienen carga cero.

Se han combinado las técnicas de enfoque isoeléctrico y de electroforesis en geles de poliacrilamida para la separación bidimensional de las proteínas. La figura 23-12 muestra cómo se pueden aislar varios cientos de proteínas celulares. Esta técnica aprovecha dos propiedades de las proteínas: primero las separa por sus cargas (punto isoeléctrico) y luego por sus masas (peso molecular).

Cuando a las proteínas se les agrega el detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS), se separan principalmente por su peso molecular. Ello se debe a que el SDS se une a las proteínas y les confiere un gran número de cargas negativas; se reduce así el efecto de las cargas, de modo que las proteínas se mueven según sus masas: las proteínas pequeñas son más rápidas que las grandes porque encuentran menos resistencia para atravesar los poros moleculares del gel de poliacrilamida. Este tipo de electroforesis se usa también para determinar el peso molecular de las proteínas.

23-32. La cromatografía permite obtener grandes cantidades de proteínas bastante puras

Las técnicas cromatográficas emplean columnas verticales en las que se colocan las muestras, de forma que las moléculas proteicas se distribuyen en dos fases, una fija y otra móvil. La fase móvil corresponde al solvente, que fluye arrastrando a la mayoría de las moléculas de la muestra. En cambio, la fase fija incluye un elemento inmóvil acondicionado para que se le unan la proteína o las proteínas deseadas. El elemento inmóvil puede ser un papel de filtro, resinas cargadas, camas porosas, etc. Las proteínas buscadas se recogen tiempo después de haber salido la fase móvil por la parte inferior de la columna. Los métodos de cromatografía más usados son el de filtración por gel, el de intercambio iónico y el de afinidad. Todos permiten obtener mayor cantidad de proteínas que con la electroforesis, aunque de menor pureza.

ANALISIS MOLECULAR DEL ADN E INGENIERIA GENETICA

23-33. El ADN puede ser desnaturalizado y vuelto a naturalizar

Teniendo en cuenta que la estructura de doble hélice del ADN es mantenida por uniones no covalentes entre las bases enfrentadas (puentes de hidrógeno), es posible separar sus dos cadenas por medio del calor y otros tratamientos, como el pH alcalino. Este proceso se denomina **desnaturalización del ADN**. Dado que la temperatura necesaria para romper el par C-G (que tiene tres puentes de hidrógeno) es mayor que la requerida para romper el par A-T

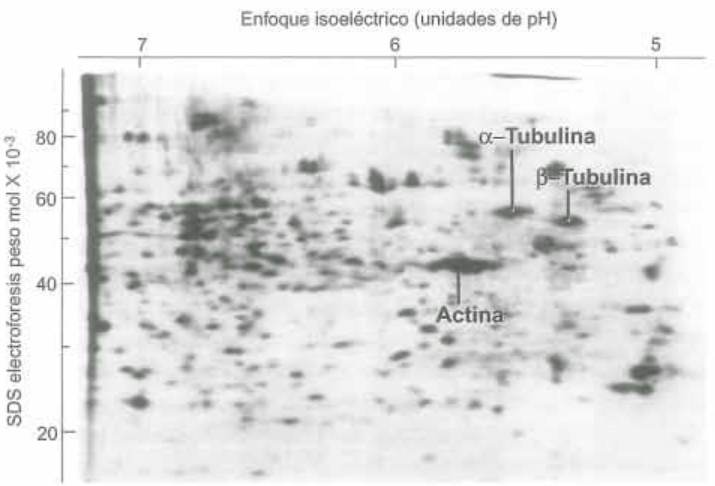


Fig. 23-12. Electroforesis bidimensional de las proteínas del ovocito de *Xenopus borealis*. Las células se marcaron con metionina ^{35}S y se homogeneizaron. Luego las proteínas se separaron por enfoque isoeléctrico (primera dimensión) y se agregó dodecilsulfato de sodio sobre un gel de poliacrilamida (segunda dimensión). Por radioautografía se detectaron cientos de proteínas, de las que se señalan la actina y las tubulinas α y β. Véase que la migración de las proteínas en la segunda dimensión es proporcional al logaritmo del peso molecular. (De E. M. De Robertis.)

(que tiene dos puentes de hidrógeno), la temperatura a la cual se separan las cadenas del ADN —llamada punto de fisión— depende de la relación CG/AT.

Si el ADN desnaturalizado se enfría lentamente, las cadenas complementarias se aparean en forma ordenada y se restablece la conformación original de la molécula. Este proceso se denomina **renaturalización**.

Más aún, una de las cadenas del ADN puede unirse a una cadena de ARN complementario para formar una molécula híbrida, mitad ADN y mitad ARN.

23-34. Los métodos de secuenciamiento del ADN han permitido conocer la composición molecular de muchos sectores de los cromosomas

La secuencia de los nucleótidos de un gen puede ser parcialmente deducida a partir de la secuencia de los aminoácidos de la proteína que codifica. Los resultados que se obtienen mediante este recurso abarcan solamente las partes codificadoras del gen, ya que no aportan información sobre los segmentos reguladores ni sobre los intrones. Tampoco tienen en cuenta una de las características del código genético, la que establece que la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón (cap. 16-2).

Se han desarrollado varios métodos que permiten obtener un rápido **secuenciamiento del ADN**, lo cual produjo una verdadera revolución en el mundo de la biología molecular. Gracias a ellos se ha llegado a conocer la composición de los cromosomas nucleares y mitocondriales humanos y la de muchos de sus genes. Además se ha estudiado el ADN de otros organismos eucariotas y de numerosos virus y bacterias.

Los métodos de secuenciamiento se basan en la producción de fragmentos de ADN de longitudes crecientes, los cuales empiezan en un punto común y poseen uno de los cuatro tipos de nucleótidos en sus extremos terminales.

La figura 23-13 muestra las etapas del método de secuenciamiento denominado **de terminación de cadena**, que comienza con la desnaturalización del ADN que se quiere analizar a fin de obtener moléculas de una sola cadena. Seguidamente se coloca un cebador en el extremo 3′ de una de las cadenas, y con la ayuda de una ADN polimerasa se sintetiza la cadena complementaria. El cebador es un fragmento de ADN que deja expuesto su propio extremo 3′, a partir del cual la ADN polimerasa agrega los nucleótidos como lo hace durante la replicación del ADN. Debe señalarse que los nucleótidos que se emplean están marcados con una sustancia radiactiva y que el procedimiento se realiza en forma simultánea en cuatro dispositivos.

La síntesis de las cadenas nuevas se interrumpe en sitios específicos debido a que cada dispositivo con-

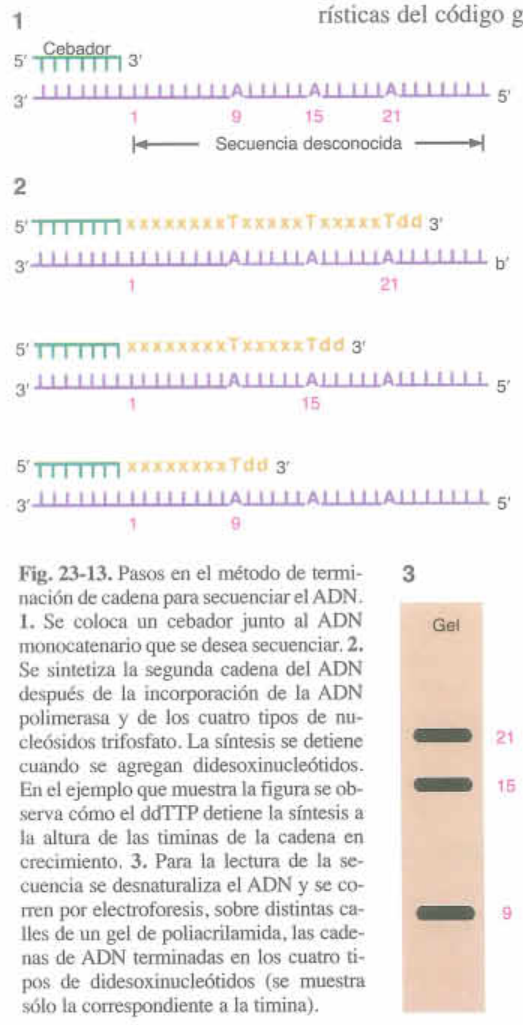


Fig. 23-13. Pasos en el método de terminación de cadena para secuenciar el ADN. **1.** Se coloca un cebador junto al ADN monocatenario que se desea secuenciar. **2.** Se sintetiza la segunda cadena del ADN después de la incorporación de la ADN polimerasa y de los cuatro tipos de nucleósidos trifosfato. La síntesis se detiene cuando se agregan didesoxinucleótidos. En el ejemplo que muestra la figura se observa cómo el ddTTP detiene la síntesis a la altura de las timinas de la cadena en crecimiento. **3.** Para la lectura de la secuencia se desnaturaliza el ADN y se corren por electroforesis, sobre distintas calles de un gel de poliacrilamida, las cadenas de ADN terminadas en los cuatro tipos de didesoxinucleótidos (se muestra sólo la correspondiente a la timina).

tiene uno de los cuatro nucleótidos (A, T, G y C) bajo la forma 2′,3′-didesoxinucleótidos (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP), que son moléculas que bloquean la síntesis del ADN cuando se incorporan a la cadena en crecimiento. Así, la bloquean a nivel de las A en uno de los dispositivos, de las T en el segundo, de las G en el tercero y de las C en el cuarto. El bloqueo se produce porque los 2′,3′-didesoxinucleótidos carecen de OH en el sitio 3′ de sus desoxirribosas, lo que impide que se le unan nuevos nucleótidos. Como resultado, en cada dispositivo se generan fragmentos de ADN de longitudes crecientes, ya que todos empiezan en un punto común pero terminan —con el mismo tipo de nucleótido— en un sitio diferente.

Para leer la secuencia, los fragmentos de ADN de los cuatro dispositivos se vuelven a desnaturalizar y las cadenas nuevas se corren simultáneamente en cuatro "calles" de un gel de poliacrilamida, las cuales separan y ordenan a los fragmentos según sus tamaños. Obviamente, cada calle del gel corresponde a uno de los nucleótidos. En la figura 23-14 puede verse que los fragmentos de ADN aparecen como bandas verticalmente ordenadas.

Finalmente, los fragmentos se revelan por radioautografía y la secuencia del ADN se lee integrando las posiciones de las bandas en las cuatro calles. Por ejemplo, en la figura 23-14 las bandas 30 y 31 se hallan en la calle C (corresponden a dos citosinas sucesivas), la banda 32 se halla en la calle T (corresponde a una timina), la banda 33 se halla en la calle G (corresponde a una guanina) y la banda 34 se halla nuevamente en la calle C (corresponde a otra citosina), de modo que entre las posiciones 30 y 34 la secuencia del ADN es CCTGC. Es recomendable que el estudiante haga el ejercicio de leer dicha figura entre las posiciones 30 y 70 y que compare su resultado con la secuencia indicada en la leyenda.

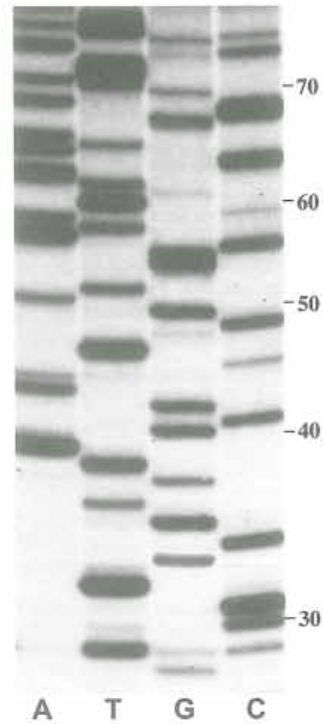


Fig. 23-14. Gel de poliacrilamida que muestra la secuencia de un fragmento de ADN. Cada calle representa a las cadenas de ADN terminadas en uno de los cuatro nucleótidos. (Cortesía de W. Barnes.) En este ejemplo la secuencia es:

30	CCTGCGTGTA
40	GCGAACTGCG
50	ATGGGCATAC
60	TGTAACCATA

Actualmente se utiliza una técnica de secuenciamiento mucho más rápida que la que se acaba de describir; emplea fragmentos de ADN cuyos últimos nucleótidos son marcados con uno de cuatro colorantes fluorescentes, aplicando un color determinado a cada tipo de nucleótido (A, T, G y C). Una vez que el instrumento separa a los fragmentos marcados de acuerdo con su longitud, un rayo láser excita a los colorantes y revela sus posiciones. El resultado es una secuencia de colores que se lee electrónicamente y que corresponde al orden en que se hallan los nucleótidos en el ADN.

23-35. La técnica del ADN recombinante hace posible el estudio del genoma

La secuenciación de los ADN de los virus, las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos es relativamente sencilla debido a que son moléculas de tamaño pequeño que pueden obtenerse puras. En cambio, cualquiera de los cromosomas eucarióticos nucleares posee una molécula de ADN muy larga y, por lo tanto, mucho más difícil de estudiar.

Este problema se resuelve mediante **técnicas de ADN recombinante** —o **de ingeniería genética**—, que emplean segmentos de ADN cortos, los cuales se insertan en cromosomas circulares bacterianos muy pequeños, denominados **plásmidos** (cap. 1-5). Posteriormente, una vez que las bacterias se multiplican, la replicación repetida del plásmido da lugar a numerosos segmentos de ADN idénticos al insertado en el plásmido original. Luego esos segmentos son separados

Fig. 23-15. La endonucleasa Eco RI reconoce en el ADN una secuencia de cuatro nucleótidos. Los asteriscos señalan la presencia de nucleótidos metilados, los cuales impiden que esos lugares sean cortados por endonucleasas de restricción.

de los plásmidos con diversos fines; por ejemplo, para ser secuenciados mediante las técnicas descritas en la sección anterior, para obtener organismos transgénicos (sección 23-46), etcétera.

23-36. Las endonucleasas de restricción reconocen en el ADN secuencias de nucleótidos específicas

Las técnicas del ADN recombinante son posibles gracias a las **endonucleasas de restricción**, unas enzimas que reconocen en las moléculas de ADN secuencias específicas de nucleótidos y las cortan. Así, cada endonucleasa constituye una especie de bisturí molecular que corta al ADN en un lugar determinado.

La mayoría de las células procariotas poseen endonucleasas de restricción, cuya función principal es proteger a las bacterias cuando las invaden ADN foráneos. Por lo tanto, si un **bacteriófago** (cap. 1-5) infecta a una bacteria, ésta puede destruir al ADN viral mediante las endonucleasas presentes en su protoplasma. El ADN bacteriano no es afectado porque en las bacterias existen enzimas que lo metilan a nivel de las secuencias susceptibles de ser cortadas por las endonucleasas, lo que lo torna invulnerable.

La denominación de las endonucleasas de restricción procede de los nombres de los microorganismos en que fueron aisladas. Por ejemplo, la ***Eco RI*** es una endonucleasa que se halla en un plásmido de la *Escherichia coli* llamado *RI*, que le confiere a la bacteria resistencia a ciertas drogas.

Las endonucleasas de restricción suelen reconocer secuencias que poseen entre cuatro y seis nucleótidos (tabla 23-1). Las que reconocen cuatro nucleótidos producen fragmentos de ADN cortos (de unos 250 pares de bases), mientras que las que reconocen seis nucleótidos producen fragmentos más largos (de alrededor de 4.000 pares de bases). Una característica importante de estas secuencias es que son simétricas, es decir, existe un eje de simetría a partir del cual la secuencia se lee igual en ambas cadenas tanto en la dirección 5′→3′ como en la 3′→5′. Por ejemplo:

$$\begin{array}{l} 5'\text{—G A A—}\\ 3'\text{—C T T—} \end{array}\!\!\begin{array}{l}\\ \\ \end{array}\!\!\begin{array}{l} \text{T T C—}3'\\ \text{A A G—}5' \end{array}$$

Algunas endonucleasas producen un corte neto en el ADN (véase la endonucleasa ***HaeIII*** en la tabla 23-1). Otras, como la Eco RI, producen cortes sesgados, por lo que generan extremos de una sola cadena, los cuales pueden aparearse con otros complementarios (fig. 23-15). Así, esos extremos —llamados "adhesivos"— pueden unirse a cualquier fragmento de ADN cortado por la misma endonucleasa de restricción, lo cual se aprovecha en algunas reacciones de la ingeniería genética.

23-37. Los genes de las células eucariotas pueden ser introducidos en plásmidos y clonados en bacterias

En la sección 23-35 se dijo que las bacterias poseen ADN circulares pequeños —los plásmidos— que se replican autónomamente. Entre los plásmidos más conocidos se encuentran los que poseen genes que les confieren a las bacterias resistencia a los antibióticos. Se dijo también que con la ayuda de endonucleasas de restricción puede incorporarse un fragmento de ADN euca-

Tabla 23-1. Secuencias reconocidas por algunas endonucleasas de restricción

Nombre	*Secuencia*	*Extremos libres después del clivaje*	*Origen*
Eco RI	↓ –GAATTC– –CTTAAG– ↑	–G | AATTC– –CTTAA | G–	*Escherichia coli* con el plásmido RI
Hind III	↓ –AAGCTT– –TTCGAA– ↑	–A | AGCTT– –TTCGA | A–	*Haemophilus influenzae* serotipo D
Bam I	↓ –GGATCC– –CCTAGG– ↑	–G | GATCC– –CCTAG | G–	*Bacillus amyloliquefaciens*
Hae/III	↓ –GGCC– –CCGG– ↑	–GG | CC– –CC | GG–	*Haemophilus aegypticus*

riótico en un plásmido e introducir a ambos en una bacteria para que se multiplique el ADN eucariótico. La combinación de dos ADN de diferentes procedencias realizada para que uno se multiplique en una célula ajena dio origen a la ingeniería genética.

La figura 23-16 muestra las diferentes etapas comprendidas en la producción de un ADN recombinante. El ADN circular del plásmido se corta con una endonucleasa de restricción, lo cual genera dos extremos de ADN "adhesivos". Dado que se emplea la misma endonucleasa para cortar el ADN eucariótico, en éste se generan segmentos de ADN con extremos "adhesivos" idénticos a los del plásmido cortado. Como consecuencia, ambos ADN —el del plásmido y el de la célula eucariota— se adhieren a través de sus extremos, unión que se completa con la ayuda de la ADN ligasa.

Luego el plásmido con el ADN recombinante se introduce en bacterias con la simple maniobra de colocar a ambos en una solución de cloruro de calcio (fig. 23-16). Debido a la función que desempeña, el plásmido recibe el nombre de **vector**. A continuación se agregan antibióticos a fin de eliminar a las bacterias que no incorporaron el plásmido. Veamos un ejemplo: si el plásmido contiene un gen que confiere resistencia a la ***tetraciclina***, el agregado de este antibiótico hace que sobrevivan únicamente las bacterias cuyos plásmidos poseen el gen. Una vez que se seleccionan las bacterias deseadas, éstas se reproducen y se consiguen millones de copias del ADN eucariótico incorporado al plásmido (fig. 23-16). Debido a que todas las copias del ADN provienen de una sola, la técnica se denomina **clonación de fragmentos de ADN** o **clonación de genes**.

23-38. Pueden emplearse otras clases de vectores para clonar fragmentos de ADN

Para conseguir la clonación de fragmentos de ADN no sólo se emplean plásmidos como vectores. Otro vector usado es el **bacteriófago lambda**, que además pudo ser construido *in vitro* mezclando el ADN del virus con sus pro-

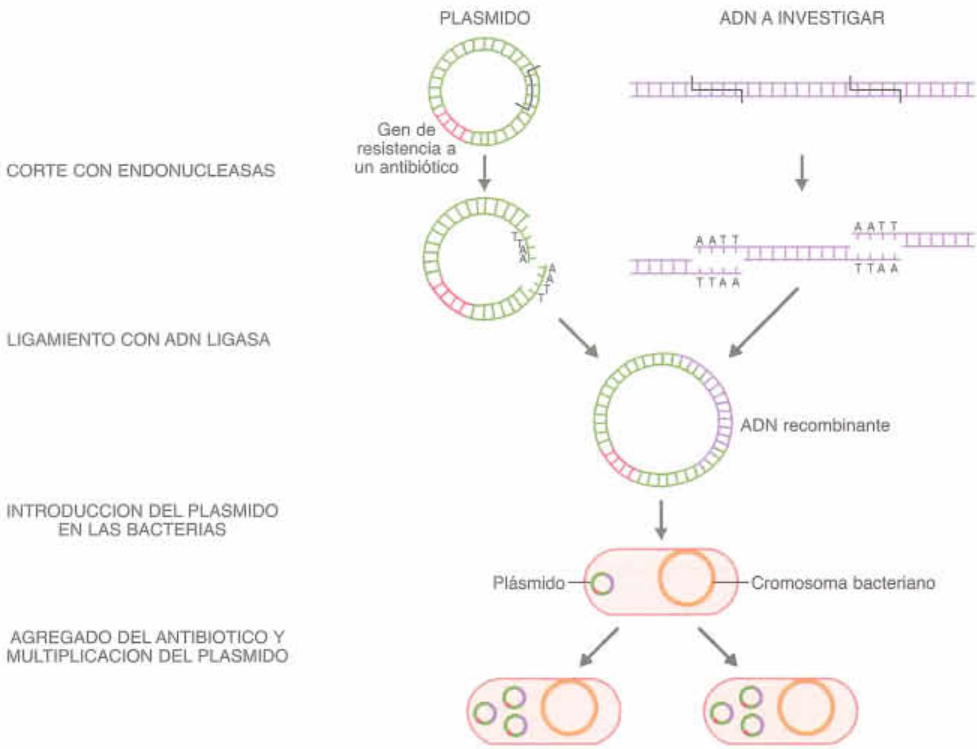


Fig. 23-16. Producción de una molécula de ADN recombinante mediante ingeniería genética. (Cortesía de S. Cohen; modificado.)

teínas. Así se han construido bacteriófagos que pueden aceptar inserciones de ADN foráneos de 15.000 a 20.000 nucleótidos. Los plásmidos que aceptan moléculas de ADN tan largas se replican muy poco, de ahí la ventaja de los bacteriófagos.

Otros vectores que se emplean para la clonación de fragmentos de ADN son los **cromosomas artificiales de levaduras** o **YAC** (por *yeast artificial chromosomes*), que contienen secuencias centroméricas y teloméricas y una secuencia ARS. Como se vio en los capítulos 12-6 y 17-4, esta última se relaciona con los orígenes de replicación.

23-39. Las técnicas de ingeniería genética han permitido construir "bibliotecas de genes" de células eucariotas

La localización, separación y multiplicación de un gen en la célula eucariota puede conseguirse siguiendo los pasos mostrados en la figura 23-17. El proceso comienza con el aislamiento del ADN de varias células, que al ser digerido con enzimas de restricción genera una enorme cantidad de segmentos cortos de ADN, llamados **fragmentos de restricción**. Mediante el procedimiento indicado en la sección 23-37 tales fragmentos son incorporados a vectores —plásmidos, por ejemplo—, de modo que cada vector recibe uno de los fragmentos. Luego los vectores con sus fragmentos de restricción se introducen en bacterias, las cuales son sembradas en medios de cultivo.

La multiplicación de cada bacteria genera una colonia separada de las demás, de modo que en los cultivos se forman miles de colonias. Como consecuencia, cada colonia resulta habitada por un **clon de bacterias** que descien-

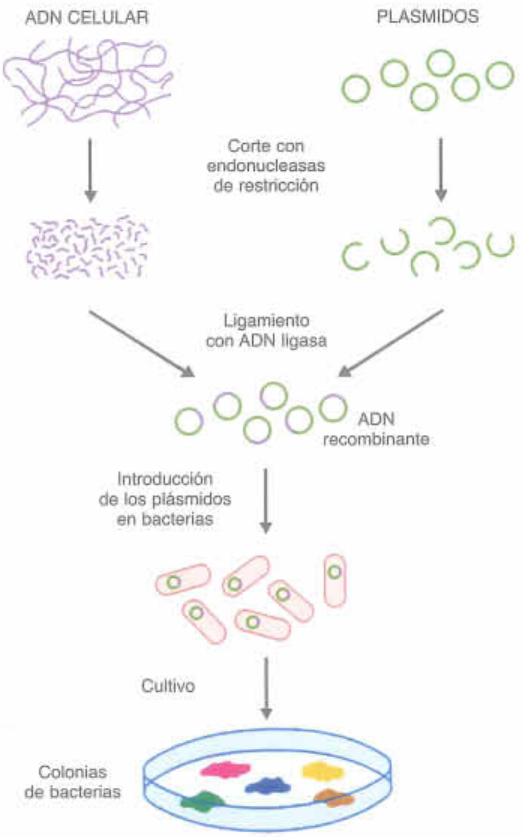


Fig. 23-17. Etapas de la formación de una "biblioteca de genes" o genoteca. (Cortesía de A. Blanco.)

den de un ancestro común. Como es obvio, cada clon contiene un fragmento de restricción diferente.

La colección de estos clones, cuyo conjunto posee la totalidad del ADN de las células investigadas, se conoce con el nombre de **"biblioteca de genes"** o **genoteca**. El fragmento de ADN buscado se encuentra en uno de los "ejemplares" de la biblioteca.

23-40. Se usan sondas de ADNc para localizar la colonia de bacterias que contiene el fragmento de ADN que se desea aislar

La técnica más usada para individualizar el clon de bacterias que contiene el ADN que se desea hallar se resume en la figura 23-18. Primero se coloca un papel de nitrocelulosa sobre el cultivo sembrado con las colonias de bacterias para que éstas se transfieran al papel y se forme una **réplica** del cultivo. A continuación las bacterias se lisan y sus ADN se desnaturalizan mediante calor (sección 23-33). Este procedimiento no altera la posición de los ADN, que siguen en el papel de nitrocelulosa en los mismos lugares que ocuparan las colonias bacterianas.

La réplica en el papel de nitrocelulosa se incuba con una **sonda de ADN** radiactivo complementario (**ADNc**) del segmento de ADN que se desea hallar. El lento enfriamiento del papel hace que el ADNc radiactivo se hibride con el segmento de ADN buscado. El próximo paso consiste en colocar sobre el papel de

nitrocelulosa una película fotográfica en la que quede impresa —por radioautografía— la posición de ese segmento de ADN. Este dato, al confrontarse la película con el cultivo, permite identificar la posición de la colonia portadora del ADN. Si la colonia se resiembra en nuevos medios de cultivo se consigue un número creciente de bacterias y, por ende, grandes cantidades del ADN. Para su estudio (su secuenciación, por ejemplo) se lo debe extraer de los vectores mediante endonucleasas de restricción, previa lisis de las bacterias.

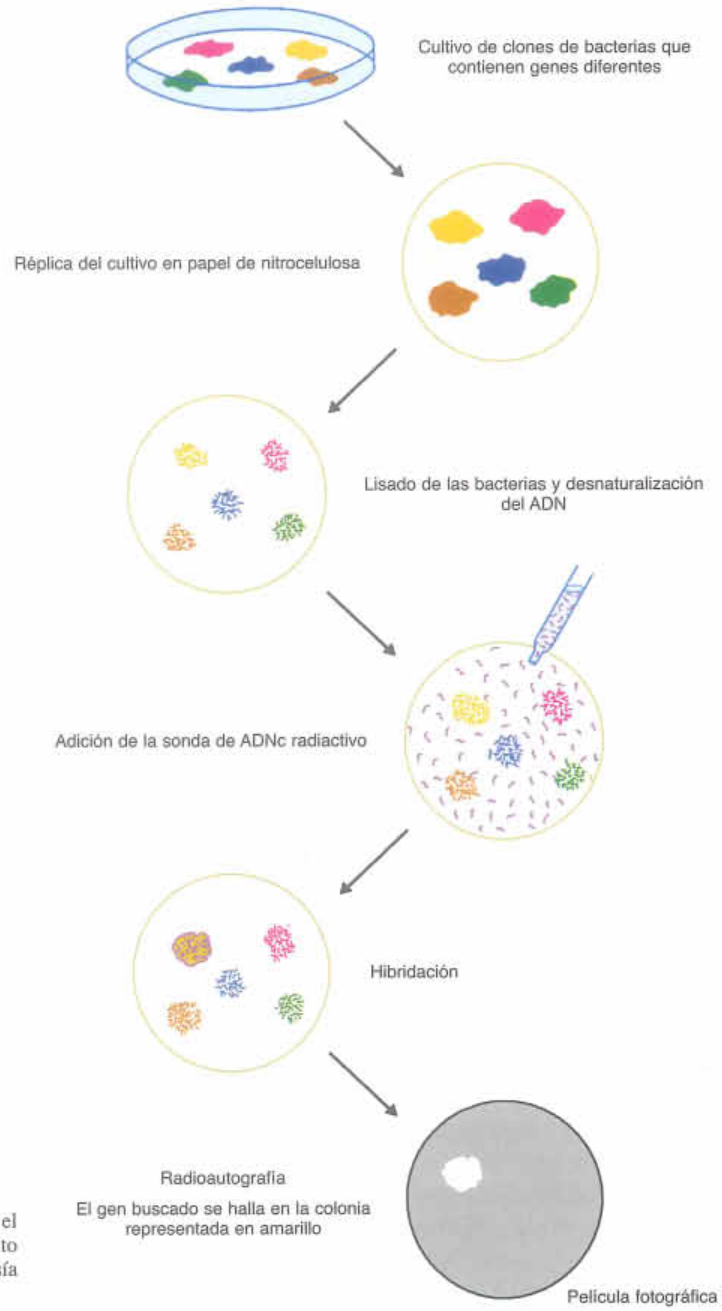


Fig. 23-18. Técnica para individualizar el clon de bacterias portador del fragmento de ADN que se desea obtener. (Cortesía de A. Blanco.)

Debe señalarse que las sondas de ADN complementario (ADNc) se obtienen a partir de moléculas de ARN tomadas de células que las fabrican en gran cantidad. Estos ARN sirven de moldes para la construcción de los ADNc, los cuales se sintetizan mediante la enzima **transcriptasa inversa**. La radiactividad del ADNc se obtiene empleando desoxirribonucleósidos trifosfato marcados con ^{32}P. Las sondas de ADNc pueden también construirse teniendo en cuenta el orden de los aminoácidos en las proteínas codificadas por los genes que se desea identificar.

23-41. Los fragmentos de restricción pueden ser separados por electroforesis y detectados por el método de transferencia del ADN

Los fragmentos de restricción pueden ser separados por electroforesis en una placa de gel de agarosa sobre la base de sus tamaños (fig. 23-19), lo cual posibilita la localización de uno de ellos. Se comienza tratando al gel con una solución alcalina que desnaturalice las moléculas de ADN, es decir, separe sus dos cadenas. Con el objeto de facilitar la manipulación de las bandas electroforéticas (invisibles para el investigador), éstas son transferidas a un filtro de nitrocelulosa. Para ello se coloca el gel sobre varias hojas de papel embebidas en solución fisiológica, se aplica el filtro de nitrocelulosa sobre el gel y sobre el filtro se ponen varias hojas secas de papel absorbente. La solución salina asciende por capilaridad desde las hojas empapadas hacia las secas y arrastra a los fragmentos de ADN contenidos en las bandas del gel, las cuales son transferidas al filtro de nitrocelulosa sin que cambien las posiciones que tenían en el gel.

El filtro —separado del gel y de los papeles usados para la transferencia del ADN— se trata con una sonda radiactiva de ADNc marcada con ^{32}P, específica para el segmento de ADN que interesa localizar. Tras la hibridación de este ADN con el ADNc, el filtro se aplica sobre una película fotográfica de modo que la banda o las bandas que contienen el ADN queden impresas en la película (radioautografía). Para localizar a los fragmentos de ADN en el gel de agarosa, bastará confrontar el gel con la película.

La transferencia del ADN desde el gel de agarosa al filtro de nitrocelulosa lleva el nombre de ***Southern blotting***, en parte por su significado literal (*blotting*, transferencia) y en parte como homenaje al creador del método, E. M. Southern.

Debe agregarse que existen técnicas semejantes para transferir ARN y proteínas, designadas —no sin cierto humor— *Northern blotting* y *Western blotting*, respectivamente.

23-42. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite conseguir grandes cantidades de un fragmento de ADN en poco tiempo

Hemos visto que las técnicas de clonación permiten conseguir grandes cantidades de un fragmento determinado de ADN. No obstante, esas técnicas están siendo reemplazadas por una metodología relativamente nueva —denominada **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**—, que es un sistema de amplificación *in vitro* del ADN por el que pueden conseguirse en pocas horas grandes cantidades de un gen (o de una parte de él) a partir de muy po-

co ADN, incluso el de una sola célula. Con esta técnica se evita el uso de endonucleasas de restricción y no es necesario recurrir a una genoteca ni construir moléculas de ADN recombinante.

El procedimiento se ilustra en la figura 23-20. El ADN de la célula se desnaturaliza por calentamiento y se agregan al medio dos clases de oligonucleótidos **cebadores**, complementarios de las secuencias situadas en los extremos del tramo de ADN que se desea amplificar. Una vez que los cebadores han encontrado las secuencias complementarias en medio de todo el ADN celular, se unen a ellas (hibridación), lo cual es posible porque se hace descender la temperatura del medio.

Seguidamente se fabrican las cadenas hijas a partir de los extremos 3′ de los cebadores, síntesis que es catalizada por una ADN polimerasa especial —extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*—, resistente a la temperatura usada durante la desnaturalización. Junto con la enzima se agregan cantidades suficientes de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato que componen el ADN.

Al concluir el proceso se obtienen dos fragmentos de ADN a partir de uno. Puesto que la misma operación se repite en cada fragmento duplicado, al cabo del segundo ciclo se obtienen cuatro de esos fragmentos, y así sucesivamente en los ciclos venideros, por lo que el ADN se amplifica en forma exponencial.

23-43. La técnica de hibridación *in situ* de ácidos nucleicos posibilita el mapeo genético

Muchos genes pueden ser detectados directamente en los lugares que ocupan en los cromosomas mediante el método de **hibridación *in situ***. El experimento consiste en la hibridación del gen que se desea detectar con un ADN complementario, el cual debe llevar un marcador para que pueda ser identificado en el tejido o en el extendido. Cuando el marcador es fluorescente, la técnica se denomina **FISH** (por *fluorescent in situ hybridization*).

Esta técnica permitió localizar un gran número de genes humanos; por ejemplo, el gen del ARNr 45S en las constricciones secundarias de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (cap. 13-8) y el gen del ARNr 5S en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 1 (cap. 13-9).

ANALISIS DE LAS FUNCIONES DE LOS GENES

23-44. Una técnica creada recientemente permite estudiar la función de los genes

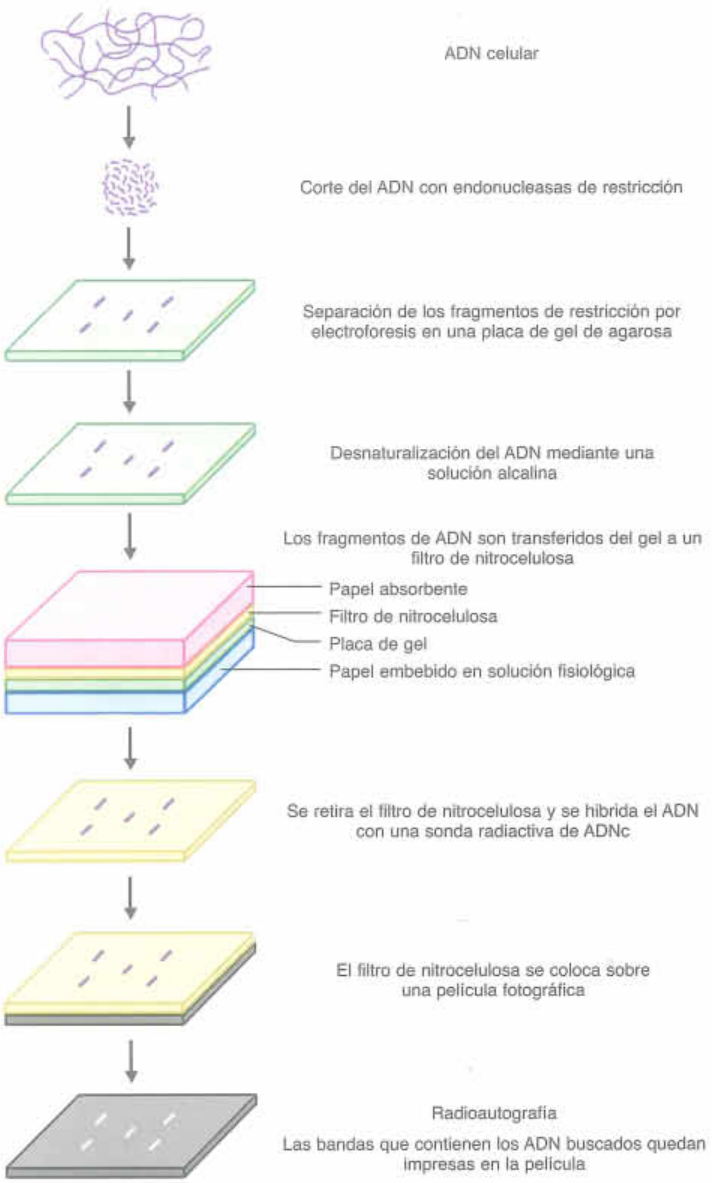
Entre los 3×10^9 pares de nucleótidos que componen las moléculas de ADN del genoma humano existen alrededor de 20.000 genes, la mayoría de los cuales codifican proteínas. Salvo excepciones, aún se ignora qué proteína o proteínas codifica cada gen, es decir, qué función o funciones desempeña.

Gracias a una técnica desarrollada recientemente, hoy es posible realizar estudios sistemáticos sobre las funciones de los genes individuales sin necesidad de recurrir a las laboriosas y costosas manipulaciones requeridas hasta hace algunos años. La técnica se basa en un mecanismo biológico normal de las células —la **interferencia del ARN** o **ARNi**—, mencionado en el capítulo 16-20 al cabo de la descripción de los miARN.

23-45. En células de plantas y de animales invertebrados se producen ARNi mediadas por ARNpi

Antes de analizar la técnica empleada para el estudio de las funciones de los genes, corresponde decir que en las células de las plantas y de los animales invertebrados tienen lugar —además de ARNi mediadas por miARN— ARNi en las que intervienen unos ARN llamados **ARNpi** o **ARN pequeños de interferencia** (en inglés, ***siRNA*** o ***small interfering RNA***), los cuales son muy parecidos a los miARN.

Más adelante se citarán los orígenes de las moléculas predecesoras de los ARNpi. Antes se describirá su procesamiento, que si bien es similar al proce-



UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Fig. 23-19. Separación de los fragmentos de restricción mediante la técnica de transferencia de ADN denominada *Southern blotting*.

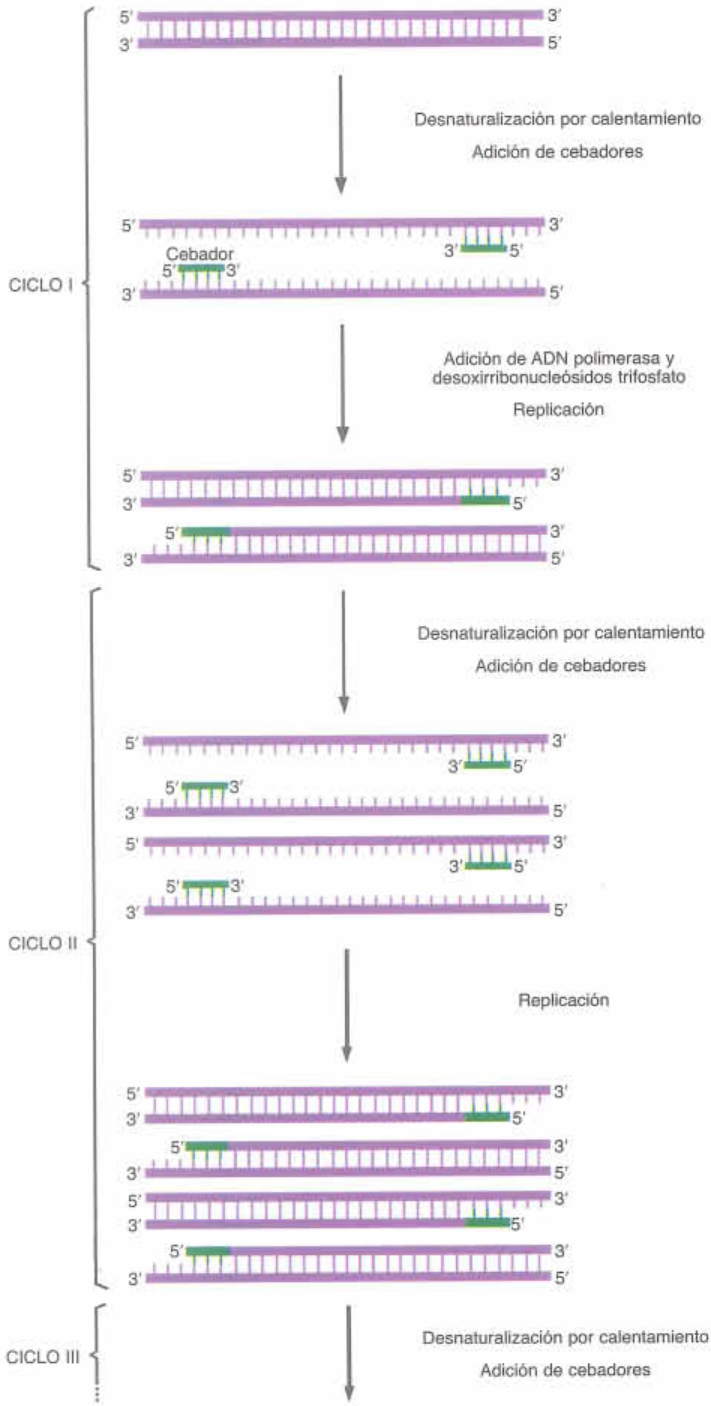


Fig. 23-20. Ilustraciones que representan los dos primeros ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (De A. Blanco.)

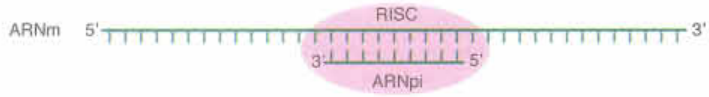


Fig. 23-21. Apareamiento completo del ARNpi con la secuencia complementaria del ARNm.

samiento de los transcriptos primarios de los miARN, se diferencia por las siguientes particularidades (cap. 15-14) (fig. 15-12):

1) No requiere la intervención de la enzima Drosha.

2) El ARNpi del ARNpi-RISC se aparea totalmente con el segmento complementario del ARNm, ya que la complementariedad entre ambos es perfecta (fig. 23-21). Recuérdese que el apareamiento entre el miARN y el ARNm, si bien es amplio, no es total (cap. 16-20) (fig. 16-10).

3) El RISC del ARNpi-RISC destruye al ARNm e impide su traducción. Recuérdese que el RISC del miARN-RISC no destruye al ARNm sino que bloquea su traducción (cap. 16-20).

Dos son los orígenes de las moléculas predecesoras de los ARNpi en las plantas y los animales invertebrados: se instalan en las células cuando son infectadas por virus que contienen ARN de doble cadena o cuando se transcriben sus transposones.

Así, cuando un **virus** con ARN de doble cadena infecta a una célula, este ARN se replica reiteradamente en el citosol y genera múltiples ARN simples, algunos de los cuales se procesan y convierten en ARNpi dobles. Al igual que los miARN, estos ARNpi dobles se combinan con complejos proteicos RISC, sus cadenas pasajeras se destruyen, y sus cadenas guías forman complejos ribonucleoproteicos ARNpi-RISC. Simultáneamente, los restantes ARN virales simples se comportan como ARNm a fin de que las células infectadas sinteticen las proteínas de los virus hijos en formación. No obstante, esa síntesis es abortada porque los ARNpi-RISC detectan a los ARNm virales, se aparean con ellos y los destruyen. Como se ve, aquí la ARNi procura evitar —en plantas y animales invertebrados— el progreso de las infecciones producidas por ciertos virus mediante la destrucción de sus ARN.

Cuando en una célula se transcriben tramos del genoma que contienen **transposones** (cap. 17-25), aparecen moléculas predecesoras de ARNpi debido a que las repeticiones invertidas de esos tramos genéticos dan lugar a transcriptos primarios que contienen un par de secuencias complementarias idénticas cuando se las lee en direcciones opuestas. Puesto que esas secuencias se aparean entre sí, los transcriptos primarios adoptan la forma de horquillas que incluyen un tramo de ARN de doble cadena. Ya en el citosol, tales horquillas se procesan, lo cual las convierte primero en ARNpi dobles y luego en ARNpi simples asociados al RISC. Finalmente, los ARNpi-RISC detectan y destruyen a los ARNm que se forman a partir de las próximas transcripciones de los mismos genes. Como se ve, aquí la ARNi apunta a la conservación de la estabilidad del genoma en plantas y animales invertebrados mediante el control de los efectos indeseados de la transcripción de sus transposones.

23-46. En la actualidad es posible averiguar la función de cada gen por medio de ensayos basados en la ARNi

La maquinaria de la ARNi está siendo aprovechada experimentalmente para observar qué efecto causa en las células la anulación funcional de cada gen individual. De lo descripto en las secciones precedentes puede deducirse

que lo que se busca es silenciar la expresión postranscripcional del gen, con la consiguiente falta de producción de la proteína que codifica. Luego, el efecto celular causado por la ausencia de la proteína permite inferir la función de dicho gen.

La técnica basada en la ARNi requiere la introducción de un ARNpi doble en células cultivadas o en organismos vivos, y puede aplicarse en virtualmente todas las especies, incluido el hombre.

En **células cultivadas** el ARNpi doble se introduce directamente o mediante plásmidos (cap. 1-5 y sección 23-35). Cuando se emplean plásmidos se introduce un ARN simple que contiene dos secuencias de nucleótidos complementarias, separadas por un segmento espaciador. Dado que las secuencias complementarias se aparean, el ARN simple adopta la forma de una horquilla capaz de ser procesada por la Dicer (cap. 15-14), que convierte a la horquilla en un ARNpi doble. Los pasos posteriores a la acción de la Dicer se describen en el capítulo 15-14 y en la sección 23-45.

Naturalmente, para silenciar a un gen el ARNpi que se introduce debe ser específico, es decir, debe poseer una secuencia de nucleótidos capaz de aparearse con un tramo del ARNm derivado de ese gen.

Otra técnica basada en la ARNi —con mayores alcances que la descripta en los párrafos precedentes— se vale de **organismos vivos** y de un fragmento de ADN sintético que contiene —similarmente al ARN simple que se emplea en las células cultivadas— dos secuencias de nucleótidos complementarias, separadas por un segmento espaciador.

El ADN sintético se introduce en las células de las plantas y de los animales mediante vectores víricos, plásmidos u otros métodos de transferencia. Después de haber sido introducido, el ADN foráneo ingresa en el núcleo y se inserta aleatoriamente en un sitio de algún cromosoma. Allí permanece, y cuando se transcribe genera un ARNpi simple similar al que se introduce en las células cultivadas. El gen foráneo recibe el nombre de **transgén*** y —como cualquier otro gen— se transfiere a las células hijas y puede pasar a la descendencia.

23-47. Se están realizando investigaciones basadas en la ARNi que buscan prevenir o curar enfermedades

Por su gran especificidad, la técnica basada en la interferencia del ARN, además de permitir el estudio de la función de los genes, se ha convertido en una herramienta promisoria para prevenir y curar enfermedades. Las principales investigaciones apuntan a:

1) Varios tipos de cáncer, ya que si con la ayuda de ARNpi específicos se

* La inserción de material genético foráneo en el genoma de un organismo vivo recibe el nombre de **transgénesis**. El ADN que se añade al genoma —es decir, el **transgén**— puede ser sintético u obtenido de otro organismo. Los organismos cuyos genomas reciben un transgén se denominan **organismos transgénicos**. Las siguientes son algunas ***aplicaciones*** —actuales o en desarrollo— de los organismos transgénicos: 1) estudiar la función de los genes, como se describió en esta sección; 2) crear hembras de mamíferos productoras de leche que contenga proteínas humanas terapéuticas; 3) analizar la regulación del desarrollo embrionario a nivel molecular; 4) manipular la expresión de genes *in vivo*; 5) corregir errores congénitos del metabolismo mediante terapia génica; 6) cultivar plantas genéticamente modificadas para que produzcan vacunas comestibles, descontaminen suelos, sean más nutritivas o sean resistentes a enfermedades, herbicidas, sequías, plagas de insectos, etc.

consiguiera inhibir postranscripcionalmente a genes relacionados con la división celular, se podría detener el avance de esos cánceres.

2) Enfermedades causadas por virus, como la hepatitis A, la hepatitis B, el sarampión, el sida, la gripe y el síndrome respiratorio agudo grave. En las hepatitis se busca introducir en las células hepáticas —por ejemplo— un ARNpi capaz de provocar la inhibición postranscripcional del gen de la proteína Fas (cap. 22-5), lo cual podría prevenir la muerte de dichas células, una de las complicaciones más temidas de la enfermedad.

3) Enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington.

4) La degeneración macular.

5) Enfermedades causadas por desórdenes genéticos.

Recientemente, en ratones se logró silenciar el gen de la apopoliproteína-B mediante la administración de ARNpi modificados. La apopoliproteína-B es un componente esencial de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), cuyos niveles en sangre aumentan en la hipercolesterolemia. Se trata del primer caso exitoso de silenciamiento de un gen de mamífero mediante la aplicación de una terapia médica basada en la ARNi.

23-48. Una técnica desarrollada recientemente permite remover del ADN secuencias defectuosas de nucleótidos y reemplazarlas por secuencias correctas

Una técnica desarrollada últimamente –denominada CRISPR (por Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)– permite localizar en los cromosomas secuencias defectuosas de nucleótidos (mutaciones), removerlas y reemplazarlas por secuencias correctas.

Se basa en el uso de una molécula de ARN guía, la cual se aparea con gran precisión con el segmento defectuoso del ADN. De inmediato ese segmento es cortado y removido por medio de una endonucleasa unida al ARN guía –llamada Cas9 (por CRISPR Associated Protein)–, y posteriormente es reemplazado por la secuencia correcta de nucleótidos.

Los ARN guía se obtienen de ciertas bacterias, en las que desempeñan funciones defensivas cuando las atacan virus o plásmidos invasores (cap. 1-5).

Cabe resaltar que el sistema CRISPR-Cas9 ha sido ensayado exitosamente en cigotos y en células madre. Así, se lo empleó para sustituir –en el ADN de cigotos de ratones– una mutación causante de cataratas, y para reemplazar –en células madre intestinales obtenidas de niños con fibrosis quística– una mutación en el gen de la proteína CFTR (cap. 3-27).

Si bien falta mucho para que esta técnica esté en condiciones de corregir mutaciones genéticas causantes de enfermedades, por los resultados antedichos y su relativa simplicidad se considera que es más prometedora que la basada en la interferencia del ARN (caps. 23-46 y 23-47).

BIBLIOGRAFIA

Abelson J. and Butz E. (1980) Recombinant DNA. Science 209: 1317.

Baulcombe D. (2002) An RNA microcosm. Science 297:2002.

Beer M. et al. (1982) STEM studies of biological structure. Ultramicroscopy 8:207.

Blanco A. (2000) Química Biológica, 7ª Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

Bradbury S. (1989) An Introduction to the Optical Microscope, 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford.

Celis J.E. and Bravo R. (1984) Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins. Academic Press, New York.
Cohen S.N. (1975) The manipulation of genes. Sci. Am. 233:24.
Coons A.H. (1956) Histochemistry with labeled antibody. Int. Rev. Cytol. 5:1.
Couzin J. (2002) Small RNAs make big splash. Science 298:2296.
Crewe A.V. (1983) High resolution scanning transmission electron microscopy. Science 221:325.
Dean P.D.G., Johnson W.S. and Middle F.A. (1985) Affinity Chromatography: A Practical Approach. IRL Press, Arlington.
de Duve C. (1975) Exploring cells with a centrifuge. Science 189:186.
de Duve C. and Beaufay H. (1981) A short history of tissue fractionation. J. Cell Biol. 91:293.
De Robertis E.M.F. and Gurdon J.B. (1979) Gene transplantation and the analysis of development. Sci. Am. 241:74.
Everhart T.E. and Hayes T.L. (1972) The scanning electron microscope. Sci. Am. 226 (1):54.
Freshney R.I. (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques. Alan P. Lyss, New York.
Gabe M. (1976) Histological Techniques. Springer-Verlag, Berlin.
Griffin H.G. and Griffin A.M. (1993) DNA sequencing. Recent innovations and future trends. Appl. Biochem. Biotech. 38:147.
Haseltine W.A. (1997) Discovering genes for new medicines. Sci. Am. 276 (3):78.
Hawkins T.L. et al. (1997) DNA sequencing. A magnetic attraction to high-throughput genomics. Science 276:1887.
Heuser J. (1981) Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. TIBS 6:64.
Hib J. (2009) Histología de Di Fiore. Texto y atlas. 2ª Ed. Editorial Promed, Buenos Aires.
Hutvágner G. and Zamore P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science 297:2056.
Kamarck M.E. (1987) Fluorescence-activated cell sorting of hybrid and transfected cells. Methods Enzymol. 151:150.
Kamath R.S., Fraser A.G., Dong Y. et al. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature 421:231.
Kendrew J.C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. Sci. Am. 205 (6):96.
Kessler C. and Manta V. (1990) Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. Gene 92:1 (review).
Maniatis T. et al. (1978) The isolation os structural genes from libraries of eukaryotic DNA. Cell 15:687.
Matzke M., Matzke A.J.M. and Kooter J.M. (2001) RNA: guidind gene silencing. Science 293:1080.
Maxam A.M. and Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:460.
Melo C.C. and Conte D. (2004) Revealing the world of RNA interference. Nature 431:338.
Minsky M. (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. Scanning 10:128.
Nathans D. and Smith H.O. (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Annu. Rev. Biochem. 44:273.
Nelson D.L. (1991) Applications of polymerase chain reaction methods in genome mappings. Curr. Opin. Genet. Dev. 1:62.
Pearse A.G.E. (1980) Histochemistry. Theoretical and Applied, 4th Ed. J. & A. Churchill, London.
Pease D.C. and Porter K.R. (1981) Electron microscopy and ultramicrotomy. J. Cell Biol. 91:287.
Pretlow T.G. and Pretlow T.P. (1982) Cell separation. Academic Press, New York.
Rasmussen N. (1996) Cell fractionation biochemistry and the origin of "cell biology". TIBS 21:319.
Saiki R.K. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487.
Schröck E. et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 273:494.
Schwank G. (2013) Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell 13:653
Scopes R.K. (1987) Protein Purification. Principles and Practice, 2nd Ed. Springer-Verlag, New York.
Southern E.M. (1992) Genome mapping: cDNA approaches. Curr. Opin. Genet. Dev. 2:412.
Sternberger L.A. (1979) Immunocytochemistry, 2nd Ed. J. Wiley & Sons, New York.
Thomas P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201.
Trask B.J. (1991) Gene mapping by in situ hybridization. Curr. Opin. Genet. Dev. 1:82.
Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J. et al. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev. 20:515.
Watson J.D., Caudy A.A., Myers R.M. and Witkowski J.A. (2007) Recombinant DNA: Genes and Genomes—A Short Course, 3rd Ed. W.H. Freeman, New York.
Westbrook T.F., Stegmeier F. and Elledge S.J. (2005) Dissecting cancer pathways and vulnerabilities with RNAi. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 70:435.
Wu Y. (2013) Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 13:659.
Yoo M.J. et al. (1997) Scanning single-electron transistor microscopy: imaging individual charges. Science 276:579.
Zernike E. (1955) How I discovered phase contrast. Science 121:345.

Indice alfabético

A23187, 62
ABC, 68, 69, 138, 145
Aberraciones cromosómicas, 324, 351, 368, 384, 385, 387, 389
Abl, 350, 351
ABO, sistema, 56
ABP, 99
Abrazadera deslizante, 316, 318, 349
AC, V. *Adenilato ciclasa*
Acetil CoA, 169
Acetilcolina, 207
Acetilo, 169
Acido(s), desoxirribonucleico, V. *ADN*
  fosfatídico, 31, 131, 373
  fosfórico, 24
  glucurónico, 27
  grasos, 31, 49, 168, 170, 174, 180, 200
  hialurónico, 29, 370
  idurónico, 27
  N-acetilneuramínico, V. *Acido siálico*
  nucleicos, 21, 23
  retinoico, 206
  ribonucleico, V. *ARN*
  siálico, 27
Acil CoA, 130, 134
Aconitasa, 305, 306
Acrosina, 370, 374
Acrosoma, 370
Actina G, 94
α-Actinina, 96, 98, 109, 120
Activación por precursor, 274
Activador, 257
Acuaporina, 63
Adaptación inducida, 205
Adaptina, 158
Adenilato ciclasa, 214, 215, 373
Adenina, 25, 282
Adenosina, 25
ADF, 95
Adhesión celular, 117, 118
ADMP, 404
ADN, 23, 26, 94, 231, 232, 261, 309, 333
  circular, 182, 197
  de los cloroplastos, 197
  desnaturalización, 439
  espaciador, 236, 250, 251, 284
  hipervariable, 233
  metilación del, 265
  mitocondrial, 118
  mutación del, V. *Mutación del ADN*
  recombinante, 441
  renaturalización, 440
  reparación del, V. *Reparación del ADN*
  repetitivo, 233
    disperso, 233
    dispuesto en tandas, 233
    de los telómeros, 232, 233, 320
  replicación del, V. *Replicación del ADN*
  satélite, 233
  secuencias espaciadoras, 236, 250, 251, 268
  secuenciamiento del, 440
  sonda de, 445
  surco mayor, 27, 261
  surco menor, 27, 262
  transcripción del, V. *Transcripción del ADN*
  transferencia del, 447
  transposición del, V. *Transposición del ADN*
ADN ligasa, 316, 318, 320, 328
ADN polimerasa(s), 310, 314, 327
  α, 317, 318, 320, 321
  β, 316, 318, 319, 327, 328
  δ, 316, 317, 321
ADN primasa, 315, 316, 320
ADP, 25, 65, 165, 173
Adrenalina, 216, 219
Aducina, 111
Agentes fusógenos, 54
Agua, 21, 22, 59
AIF, 416
Alelo, 351, 380
Aleurona, granos de, 163
Almidón, 29, 191
Alolactosa, 271
Alteraciones funcionales, 325
Alu, 233, 330
Alzheimer, enfermedad de, 88
α-Amanitina, 257
Amiloplastos, 188
Aminoácidos, 35, 168, 171, 181
Aminoacil-ARNt, 291, 294
Aminoacil-ARNt sintetasa, 294, 295
Amniocentesis, 387
AMP, 25
AMPc, 214, 215, 273, 371, 373
AMP cíclico, V. *AMPc*
Anafase, 18, 334, 336, 340, 341
  I, 364, 367
  II, 366, 367
Aneuploidías, 384, 387, 388
Anfimixis, 377
Angelman, síndrome de, 267
Anillo contráctil, 103, 342
Anión superóxido, 200, 417
ANP, V. *Péptido natriurético auricular*
Anquirina, 96, 111
Antena, 193
Antibióticos, 301
Anticodón, 291, 295
Anticuerpos, 150, 283
Antígenos, 212
Antimonio, 69
AP endonucleasa, 328
Apaf-1, 416
Apareamiento, 286, 358
apc, 352
APC, V. *Ciclosoma*
Apertura numérica, 421
Apolipoproteína-B, 453
Apoptosis, 181, 412, 413, 416, 417
Apurinización, 325, 327, 328
ARF, 156, 158
ARN, 23, 26, 225, 254, 277
  heterogéneo nuclear, V. *ARNhn*
  de inactivación del cromosoma X, V. *ARNxist*
  mensajero, V. *ARNm*
  pequeño(s), citosólico, V. *ARNpc*
    de interferencia, V. *ARNpi*
    nuclear, V. *ARNpn*
    nucleolar, V. *ARNpno*
  procesamiento del, V. *Procesamiento del ARN*
  ribosómico, V. *ARNr*
  síntesis del, V. *Transcripción del ADN*

de la telomerasa, V. *ARNte*
de transferencia, V. *ARNt*
ARN polimerasa(s), 254, 255, 257, 272, 322
I, 257, 258, 267, 285
II, 257, 269, 270, 278
III, 257, 269, 270
ARNhn, 258
ARNi, 304, 448, 451, 452
ARNm, 27, 246, 257, 277, 290, 292
cortes y empalmes en el, V. *Cortes y empalmes en el ARNm*
metilación del, V. *Metilación del ARNm*
poliadenilación del, V. *Poliadenilación del ARNm*
policistrónico, 271
traducción del, V. *Traducción del ARNm*
ARNpc, 135, 246, 252,
ARNpi, 449, 451
doble, 451, 452
ARNpi-RISC, 451
ARNpn, 246, 252, 269, 270, 280, 286
ARNpno, 246, 252, 270
ARNr, 27, 242, 246, 250
5S, 250, 251, 269, 286
45S, 250, 267, 283, 285
secuencias espaciadoras, 250, 251, 284
ARNt, 27, 246, 251, 269, 286, 290, 291, 300
ARNt(i), 295
ARNt iniciador, V. *ARNt(i)*
ARNte, 246, 252, 270, 287, 320
ARNxist, 246, 252, 265, 270, 287
Arp2/3, 100
Arrestina, 215
ARS, 232, 313
Arteriosclerosis, 161
Asa, anticodón, 294
D, 294
T, 294
variable, 294
ASF, 283
Astrotactina, 103
ATP, 25, 65, 94, 165, 173, 175, 179, 214, 280, 301, 371, 373
ATP-ADP translocasa, 178
ATPasa, 64, 178
ATP sintasa, 66, 173, 177, 193
Autofagia, 153
Autofagosoma, 145, 153
Autorregulación, 404
Autosomas, 239
Autótrofos, organismos, 5
Axón, 102, 144
Axonema, 89, 90, 371
AZT, 68

Bacteria, 5, 73, 185, 197, 301, 442
Bacteriófago, 7, 442, 443
Bad, 415
Balsas lipídicas, 161
Banda, A, 105
H, 105
I, 105
3, 64, 111
4.1, 111
5, 110
Bandeado cromosómico, 240
Barra terminal, V. *Cinturón adhesivo*
Bases nitrogenadas, 24
Bcl-2, 350, 415, 418
bcr, 351
Biblioteca de genes, 444
Bicapa lipídica, 50, 57, 58
Biopsia de vellosidades coriónicas, 387
Bivalente, 361
Blastocisto, 397
Blastocele, 402
Blastómera, 402
Blastoporo, 402, 404
Blástula, 402
BMP, 404
Bomba, de Ca^{2+}, 67, 221
electrogénica, 66
de H^+, 68, 146, 148, 150, 151, 177
de K^+H^+, 67
de Na^+K^+, 64, 66, 67
protónica, V. *Bomba de H^+*
Bordetella pertussis, 218
Burbuja, de replicación, 313
de transcripción, 255, 310

CAAT, 249
Cadena, adelantada, 315
atrasada, 315
continua, 315, 318
discontinua, 316, 318
guía, 289
pasajera, 289
respiratoria, 170, 172
transportadora de electrones, V. *Cadena respiratoria*
Cadherina, 96, 118, 120
CAF-I, 323
Caja homeótica, 410
Calcio, 145, 181, 220, 221, 222, 371, 372, 376, 416
Calcitonina, 283
Calmodulina, 109, 220, 221
CAM, 118
Cámbium, 69
Campo morfogenético, 404
Canal iónico, 57, 60
dependiente de ligando, 60, 61
dependiente de voltaje, 60, 61
Cáncer, 321, 350, 390, 417, 418, 452
cap (capuchón), 277
CAP, 273
Cápside, 7
Capsómero, 7
Cardiolipina, V. *Difosfatidilglicerol*
Cardiotónicos, 66
Carioplasto, 395
Carioteca, V. *Envoltura nuclear*
Cariotipo, 239, 384
en primates, 391
Caroteno, 192
Carotenoide, 192
Cas9, 453
Caseína, 305
Caspasa, 412, 416, 417
Catalasa, 199, 200
Catastrofina, 86
Catenina, 96, 120
Caveolas, 161
Caveolinas, 162
CBP, 218, 292
Cdc2, 346
Cdc6p, 313
Cdc42, 100, 157
Cdk2, 345, 349
Cebador, 315, 316, 318, 319, 320, 448
Célula(s), 1, 4
animal, 8
blanco, 203
cancerosa, 321, 416
diploide, 234
eucariota, 1, 4, 8, 46, 225
germinativas, V. *Células sexuales*
glial radial, 102
haploide, 234
HeLa, 395, 431
huevo, V. *Cigoto*
I, enfermedad de, 143, 154
inducida, 203, 401
inductora, 203, 401
muscular, cardíaca, 110, 209
estriada, 104, 180
lisa, 110
nerviosa, 102, 232
origen de las, 44
ovular, 377
procariota, 1, 4, 46, 260, 270
sexuales, 19, 266, 354, 355, 357
somáticas, 16, 234, 345, 354, 355
totipotente, 399
vegetal, 8, 69, 124, 162, 187, 201, 342, 377
Celulosa, 29
CENP, 339
Centríolos, 12, 83, 92, 94, 337, 377
Centro, de reacción, 193
dorsal, 404
ventral, 404
Centrómero, 232, 239, 324, 338, 361
Centrosoma, 12, 83, 94, 334, 337
Ceramida, 32, 134
Cerberus, 404
Cerebrósido, 32, 55
CF, 279
CFTR, 69, 453
CG, V. *Región CG*
CGRP, 283
Chaperonas, 76, 303
hsp60, 76
hsp70, 76, 138, 184
hsp90, 76, 206
Chaperonina, 76
CHIP, 63
Ciclina(s), 345

G1, 345, 346, 349
M, 345, 346
Ciclo, del C_3, V. *Ciclo de Calvin*
del C_4, 196
de Calvin, 194
celular, 332
control del, 344
del glioxilato, 201
de Krebs, 170, 174
Ciclosoma, 347
Cigonema, 358
Cigoto, 16, 19, 332, 344, 354, 370, 377, 396, 408
Ciliogénesis, 93
Cilios, 88, 90
Cinetocoro, 334, 338, 361
Cinetosoma, 90
Cinturón adhesivo, 96, 120
Citidina, 25
Citocalasina B, 95, 395
Citocinesis, 18, 103, 334, 337, 342
Citocromo, c, 172, 416
P450, 146, 181
Citocromo oxidasa, 172
Citoesqueleto, 12, 79, 412
Citofotometría, 433
Citogenética, 379
Citometría de flujo, 438
Citomusculatura, 79
Citoplasma, 8, 11, 73, 366
Citoplasto, 395
Citoqueratinas, 82
Citoquímica, 432
Citoquinas, 212
Citosina, 24
Citosol, 12, 73
Clatrina, V. *Cubierta de clatrina*
Claudina, 119
Clivaje, V. *Segmentación del cigoto*
Clon de bacterias, 444
Clonación, de fragmentos de ADN, V. *Clonación de genes*
de genes, 442
de mamíferos, 394
Cloranfenicol, 302
Clorofila, 190, 191, 192, 193
Cloroplasto, 14, 187
biogénesis, 196
envoltura, 189
origen, 197
Cloroquina, 69
Coacervado, 46
Coatómero, V. *Cubierta de coatómero*
Codificador, 248, 249, 250, 252, 271
Código genético, 25, 247
degeneración del, 248
Código histónico, 265, 290
Codominancia, 381
Codón(es), 247, 290
de iniciación, 291, 299
de terminación, 248, 293, 301
Coenzima(s), 41
A, 169
Cofilina, 95
Cohesina, 309, 336, 308
Colágeno, 115, 117
Colcemid, 86
Colchicina, 86
Cólera, 218
Colesterol, 33, 50, 134, 160, 181
Coloración, 423
negativa, 427
Compartimientos celulares, 11, 48, 73
Competencia, 401
Complejo, b-c_1, 172
b-f, 193
de Golgi, 13, 71, 126, 128, 130, 134, 139, 141, 143
del poro, 228, 341,
sinaptonémico, 358
Comunicación intercelular, 203
Condensina, 236
Condroitinsulfato, 29
Conexina, 122
Conexón, 122
Congelación-desecación, 422
Congelación-fractura, 427
Congelación-grabado, 428
Cono de crecimiento, 102
Constricción, primaria, V. *Centrómero*
secundaria, 240, 250, 285
Contacto focal, 98, 116
Contratransporte, 64
COP, V. *Cubierta de COP*
COPI, 155, 156
COPII, 155, 156
Cordina, 404
Corona radiada, 370, 371, 374
Correpresor, 273
Corte de materiales, 422, 426
Cortes y empalmes en el ARNm, 279, 280, 283
regulación de los, 283
Cotransporte, 64
CPSF, 279
CRE, 218
CREB, 218
Cremallera de leucina, 263
Crescent, 404
CREST, 338, 339
Crestas mitocondriales, V. *Mitocondria*
Criofractura, V. *Congelación-fractura*
Crióstato, 423
CRISPR, 453
Cromátidas, 18, 239, 309, 324, 334, 359
Cromatina, 16, 18, 232, 236, 237, 310, 322, 413
de 10 nm, 235, 264, 311
de 30 nm, 236, 312, 322, 359
enrollamiento, 264
lazos de, 237, 310
satélite, V. *Satélite*
sexual, V. *Cuerpo de Barr*
Cromatografía, 439
Cromatosoma, 235
Cromómero, 363
Cromoplastos, 187
Cromoproteínas, 37
Cromosoma(s), 6, 16, 18, 225, 231, 234, 309, 335, 354
acrocéntrico, 240
artificiales de levaduras, V. *YAC*
bacteriano, 6
en cepillo, V. *Cromosomas plumulados*
Filadelfia, 390
homólogos, 18, 355, 364
metacéntrico, 240
papel en la evolución, 390
plumulados, 363
sexuales, 239
submetacéntrico, 240
Crossing-over, V. *Recombinación genética*
CSF, 414
CSTF, 279
CTP, 25
Cubierta, de clatrina, 155, 157
de coatómero, 155
de COP, 155, 156
Cuerpo, de Barr, 238, 265, 322
apoptósico, 413
basal, 90, 92, 94
intermedio, 337, 342
multivesicular, 153
polar, 366, 376
prolamelar, 196
proteico, 163
residual, 152
Cultivo, celular, 431, 452
de línea establecida, 431
primario, 431
secundario, 431
de tejido, 103
CV-2, 404

DAG, 31, 50, 132, 214, 220, 222, 372, 376
Dalton, 3
dcc, 352
DE, 375
Dedos de cinc, 263
Degeneración macular, 453
Deleción, 324, 386, 390
DNA, V. *ADN*
DEFB126, 370
Denudación, 373
Dermatansulfato, 29
Desaminación, 325, 327
Descarboxilación oxidativa, 169, 174
Desmina, 82, 109, 110
Desmocolina, 121
Desmogleína, 121
Desmoplaquina, 121
Desmosoma, 110, 121
Desórdenes genéticos, 453
Desoxirribosa, 24, 27
Destoxificación, 146
Determinación, 406
Determinantes citoplasmáticos, 397, 398
Diacilglicerol, V. *DAG*
Diacinesis, 363
Dicer, 288, 452

Dictiosoma, 129
Diferenciación celular, 393, 396
Difosfatidilglicerol, 32, 50
Difracción de rayos X, 3, 430
Difusión, facilitada, 53, 59, 60
simple, 57, 58
Digitoxina, 66
Dihidrouridina, 286
Dímeros de timina, 326, 328
Dinamina, 87, 155
Dinactina, 87
Dineína, 86, 90
Diploide, 18, 355
Diplonema, 362
Diplosoma, 83
Disacáridos, 27
Disco, imaginal, 408
intercalar, 110
Z, 105
Disomía uniparental, 267
Distrofia muscular, 110
Distrofina, 109
Distroglicano, 110
División celular, 16, 18, 323, 332, 354
Dkk, 404
Dogma central de la biología celular, 23
Dolicol fosfato, 34, 51, 139
Dominio, intercromosómico, 242
de muerte, 417
Down, síndrome de, 368, 387
Drosha, 288, 451
Drosophila melanogaster, 209, 329, 382
Duplicación genética, 330, 386

E1, 77
E2, 77
E3, 77
Eco RI, 442
Ectodermo, 397, 401, 402
Edwards, síndrome de, 388
EF, 299, 300
EGF, 210, 348, 350
Electroforesis, 40, 438, 447
Elongina, V. *SIII*
Embrión, 397, 399
plano, bilaminar, 400
trilaminar, 400
Encaje inducido, 42, 205
Encuadre, 292
Endocitosis, 11, 144, 147
Endodermo, 397, 402
Endonucleasa de restricción, 329, 442
Endosoma, 13, 68, 126, 143, 146, 148
multivesicular, V. *Cuerpo multivesicular*
primario, 149
secundario, 149
Endosperma, 378
Energía protonicomotora, 177
Enfoque isoeléctrico, 438
Enlace, N-glicosídico, V. *Unión N*
O-glicosídico, V. *Unión O*
Envejecimiento celular, 320, 417
Envoltura nuclear, 13, 16, 225, 226, 341, 412
Enzimas, 22, 40, 167, 199
Epiblasto, 397
erb, 350
eRF, 301
Eritrocito, 110, 332
Eritromicina, 302
Eritropoyetina, 212, 348
ERK, 211
Escherichia coli, 5, 6, 25, 270, 329
Esclerodermia, 338
Esfingofosfolípido, 134
Esfingomielina, 32, 50, 134
Esfingosina, 32, 134
Espacio, intermembranoso, V. *Mitocondria*
perinuclear, 226
tilacoide, 190
Espectrina, 96, 104, 110
Espermátide, 357
Espermatocito, 357, 358, 366
Espermatogénesis, 354
Espermatogonio, 357
Espermatozoide, 354, 357, 366, 370, 375, 377
capacitación, 370
hiperactivación, 370
maduración, 370
Espliceosoma, 280
Esteroides, 33, 146, 181
Estreptomicina, 302
Estroma, 189
Etiolación, 196
Etioplasto, 196
Eucariota, V. *Célula eucariota*
Eucromatina, 16, 237, 322
Exocitosis, 11, 144
Exones, 246, 249, 330
Exportina, 231
Extremo, aceptador,
más [+], 84, 340
menos [–], 84, 340

Factor(es), capacitante, 371
de crecimiento, 210, 306, 348
de elongación, 258, 299
hemopoyéticos, 348
de iniciación, 298
de supervivencia, 413
de terminación, 301
de transcripción, 257, 261
basales, 258
específicos, 257, 259, 410
trófico, 413, 415
FAD, 167, 175, 176
FADD, 417
$FADH_2$, 167, 175, 176
Fagocitosis, 147, 148
Fagolisosoma, 150, 153
Fagosoma, 148
Fas, 417, 453
Fase, G0, 333, 347
G1, 309, 333, 345, 347, 349, 399
G2, 309, 333, 346, 347, 399
M, 309, 333, 346
S, 16, 309, 323, 333, 345, 349, 399
FasL, 417
Fecundación, 354, 370, 371
Fenotipo, 381
Fermentación láctica, 180
Ferredoxina, 193
Ferritina, 305
Fertilina, 375
Fes, 350
FGF, 210, 348
Fibras, del áster, 335
cinetocóricas, 335, 337
colágenas, 98, 114, 116
polares, 335, 337
tensoras, 98, 110
Fibronectina, 98, 115, 116
Fibrosis quística, 69, 453
Ficocianina, 187
Ficoeritrina, 187
Fijadores, 422
Filagrina, 82
Filamentos, de actina, 12, 79, 94, 95, 96, 98, 103, 110, 120, 346
corticales, 94, 95, 99, 342
transcelulares, 94, 95, 98
gliales, 82
intermedios, 12, 79, 80
Filamina, 99
Filopodio, 100
Fimbrina, 101, 104
FISH, 448
Fisión binaria, 181, 197, 201
Flagelos, 88
Flavina adenina dinucleótido, V. *FAD*
Flip-flop, 51, 182
Flipasa, 133
Floema, 69
Fluorescencia, 433
recuperación después del fotoblanqueo, V. *FRAP*
Fluorocromos, 433
fms, 350
Fodrina, 96
Folistatina, 404
Forbol, 223
Forma celular, 79, 81, 87, 95
Formina, 94, 95
Fos, 350
Fosfatasas, 220
Fosfatidilcolina, 31, 50, 132, 373
Fosfatidiletanolamina, 31, 50, 133
Fosfatidilinositol, V. *PI*
Fosfatidilinositol difosfato, V. PIP_2
Fosfatidilinositol fosfato, V. *PIP*
Fosfatidilinositol 3-quinasa, V. *PI 3-K*
Fosfatidilinositol trifosfato, V. PIP_3
Fosfatidilserina, 31, 50, 133, 413
Fosfodiesterasa, 216, 328
Fosfoglucomutasa, 217
Fosfolipasa A, 220, 373
Fosfolipasa, C, 372, 376
C-β, 214, 219, 222
C-γ, 211, 220, 222
Fosfolipasa D, 220, 373

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

Fosfolípidos, 31, 49, 50, 182
Fosforilación oxidativa, 170, 176
Fosforilcolina, 134
Fotofosforilación, 194
Fotorrespiración, 202
Fotosíntesis, 187, 190, 195
Fotosistemas, 193
Fraccionamiento, celular, 436
  molecular, 436
Fragmentoplasto, 343
Fragmentos, de Okazaki, 315, 317, 318
  de restricción, 444, 447
FRAP, 54
Frzb-1, 404
Fructosa, 27
Fucosa, 27
Fusión celular, 53, 374, 395
Fusógenos, agentes, 54

GAG, 29, 114, 141
Galactocerebrósidos, 134
Galactosa, 27
Gameto, V. *Células sexuales*
Gametofito, 377
Gangliósidos, 33, 55, 134
GAP, 157, 159, 211, 230
Gástrula, 402
Gastrulación, 402
Gaucher, enfermedad de, 154
GDP, 85, 156, 213, 214, 230
GEF, 156, 157, 159, 210, 230
Gelsolina, 99
Gen(es), 232, 244, 249
  análisis de la función, 448, 451
  dominante, 380
  de hendidura, 409
  homeóticos, 409
  inhibidor, 271
  de mantenimiento, 394
  de la polaridad de,
    la célula huevo, 409
    los segmentos, 409
  recesivo, 380
  rectores, 410
  de regla par, 409
  regulación de la actividad de los, 258
  segmentarios, 409
  supresores de tumores, 349, 351, 417
Genética, 379
Genoma, 232, 325, 329, 441
Genoteca, V. *Biblioteca de genes*
Genotipo, 381
Girasa, 321, 322
Glicerofosfolípidos, 31, 132
Glicerol, 31, 130
Glicocáliz, 56
Glicoforina, 111
Glicolípidos, 28, 32, 55, 134
Glicoproteínas, 28, 37, 55, 139
Glicosaminoglicanos, V. *GAG*
Glicosomas, 74
Glioxisoma, 201
Globina, 306, 330
Glucano, 70
Glucocerebrósidos, 134
Glucógeno, 29, 74
Glucógeno fosforilasa, 217
Glucógeno fosforilasa quinasa, 217
Glucógeno sintasa, 217, 223
Glucogenogénesis, 217
Glucogenólisis, 217
Glucogenosis, 74
Glucólisis, 168, 178
Glucosa, 27, 168, 179
Glucosa 6-fosfatasa, 217
Glucosa 1-fosfato, 146, 217
Glucosa 6-fosfato, 146, 217
GM-CSF, 348, 350
GMPc, 207, 209
GMP cíclico, V. *GMPc*
Gota, 86
Gotas de grasa, 74
Gradiente, de concentración, 58
  electroquímico, 58, 61, 68, 194
  osmótico, 59
  de voltaje, 58, 61
Gramicidina, 63
Gránulos corticales, 375, 376
Granum, 189
Grasa parda, 180
Gripe, 453
Grupos sanguíneos, 56
GTP, 25, 85, 156, 175, 213, 214, 230
GTPasa, 157, 214, 230, 278
Guanilato ciclasa, 207
Guanina, 25
Guanosina, 25

Hae/III, 442
Halofantrina, 69
Haploide, 19, 355
Haptotaxis, 101
Helicasa, 321
Hélice α, 38
Hélice-bucle-hélice, 264
Hélice-vuelta-hélice, 263
Hemidesmosoma, 116
Heparansulfato, 29
Hepatitis, 351, 453
Heterocarión, 53, 395
Heterocigoto, 381
Heterocromatina, 16, 237, 322
  constitutiva, 238
  facultativa, 238
Heterótrofos, organismos, 5
Hexoquinasa, 217
HGF, 210, 348
Hialuronidasa, 370, 372, 374
Hibridación *in situ*, 448
Hidratos de carbono, 27, 55
Hiperactivación, 370, 372, 374
Hipercolesterolemia, 161, 453
Hipoblasto, 397
Hipoxantina, 325, 327
Histonas, 231, 234, 264, 279, 307, 323, 346, 347
  acetilación, 264
  demetilación, 265
  desacetilación, 265
  desfosforilación, 265
  fosforilación, 265
  metilación, 265
HIV, V. *Virus HIV*
Hoja plegada β, 38
Holliday, estructuras de, 365
Homeodominio, 410
Homocigoto, 381
Hormona(s), 204, 416
  de crecimiento, 212
  esteroideas, 206
  tiroidea, 206
Horquilla de replicación, 313
hsp, V. *Chaperonas*
Huntington, enfermedad de, 453
Huso mitótico, 88, 334, 335, 339

IF, 298
IL-2, 348
Imago, 408
Importina, 229
Impronta genómica, 266
Inclusiones, 74
Inducción, 203, 400, 401
  autocrina, 204
  endocrina, 204
  enzimática, 271
  neuroendocrina, 204
  paracrina, 204, 401
Inductor, V. *Sustancia inductora*
Inestabilidad dinámica, 86
Ingeniería genética, 439, 441
Inhibición, por contacto, 103
  por retroalimentación, 274
Inmunocitoquímica, 434
Inmunoglobulinas, 150, 330
Inosina, 286
Inositol trifosfato, V. IP_3
Inositol tetrafosfato, V. IP_4
Insulina, 141
Integrina, 98, 116
Interacción, hidrofóbica, 39
  nucleocitoplasmática, 395
Interfase, 16, 309, 332, 333
Interferencia del ARN, V. *ARNi*
Intergrana, 189
Interleuquina 2, V. *IL-2*
Interrupción de la transcripción, 274
Intrones, 246, 250, 279, 283, 286
Inversión, 386
Ionóforo, 62
  formador de canales, 63
  transportador móvil, 63
IP_3, 50, 214, 220, 222, 372, 376
IP_4, 372
IPTG, 271
IRF, V. *Aconitasa*
Isopreno, 34, 172
Izumo, 375

JAK, 212
Jun, 350
Juno, 375

Kaposi, sarcoma de, 351
Kartagener, síndrome de, 91
KDEL, 144
Kilodalton, 3
Kirromicina, 302
Klinefelter, síndrome de, 388

L1, 233, 330
Lactato, 180
Lactosa, 27, 270
Lamelipodio, 100
Lamina, 81, 227, 242, 320, 341
Lámina, basal, 113, 116, 242
  nuclear, 81, 227, 341, 346
Laminina, 110, 116
Laminofilamentos, 81, 346, 412
Lanzadera, 178
  de glicerol 3-fosfato, 179
  de malato-aspartato, 179
Larva, 408
LDL, 160, 453
Lectura de pruebas, 327
Leishmania, 69
Leptonema, 358
Leucemia mieloide crónica, 351, 390
Leucoplastos, 187
Licopeno, 187
Ligamiento, 382, 383
Ligando, 61, 213
LINE, 233
Línea, M, 105
  primitiva, 400
Linfoma de Burkitt, 390
Lípidos, 21, 30, 132
Lipofuscina, 73
Lipoproteínas, 37, 146
  de baja densidad, V. *LDL*
Liposoma, 49
Lisosoma, 13, 68, 126, 150, 151
LMNA, 320
Locus, 244, 380
Lupus eritematoso, 282

Macizo celular interno, 397
Macromoléculas, 57
Malformaciones congénitas, 325
Manosa, 27
Manosa 6-fosfato, 142, 148
MAP, 83, 88, 211
Mapeo genético, 448
Matriz, centrosómica, 83, 93, 337
  citoplasmática, V. *Citosol*
  extracelular, 113
  mitocondrial, 171
  nuclear, V. *Nucleoplasma*
Maullido de gato, síndrome de, 390
mcc, 352
MCM, 313
MDR, 68
Medialuna dorsal, 402
Mefloquina, 69
Megasporocitos, 377
Megasporos, 377
Meiosis, 19, 354, 355, 357
  I, 355, 357, 358
  II, 355, 357, 366, 376
  consecuencias genéticas de la, 366
  diferencias con la mitosis, 355
  espórica, 377
  en la mujer, 368
  en el varón, 369
MEK, 211
Membrana(s), celulares, 48, 132
  estructura, 49
  externa, 5
  pelúcida, 370, 372, 374
  permeabilidad, 57
  plasmática, 6, 8, 10, 48, 69, 71, 144
  terminal, 104
  tilacoide, 190, 192
Memoria celular, 408
Mendel, leyes de, 379, 380, 381
Mesodermo, 397, 402
Metacromasia, 423
Metafase, 18, 239, 334, 336, 340
  I, 364
  II, 366
Metamerización, 400, 401
Metilación del ARNm, 282
Metilasa de mantenimiento, 266
Metilcitosina, 265
7-Metilguanosina, 277
Metiltransferasa, 278
Métodos de estudio, 420
miARN, 246, 252, 270, 287, 303, 451
  doble, 288
miARN-RISC, 289, 304
Michaelis, constante de, 42
Micoplasma, 7
microARN, V. *miARN*
Microcirugía celular, 431
Microfibrilla, 70
Microfilamentos, V. *Filamentos de actina*
Microsatélite, 233
Microscopio, electrónico, 3, 260, 425
  de barrido, 428
  STEM, 428
  de transmisión, 425
  de fase, 423
  de fluorescencia, 433
  de fondo oscuro, 424
  de interferencia, 424
  de Nomarski, 424
  óptico, 3, 420
  de polarización, 425
Microsporocitos, 377
Microsporos, 377
Micrótomo, 422
  de congelación, V. *Crióstato*
Microtúbulos, 12, 79, 82, 334, 339, 340
  centriolares, 83
  centro organizador de los, 83
  ciliares, 83, 88
  citoplasmáticos, 83, 84, 86, 87, 346
  mitóticos, 83, 88, 346
Microvellosidad, 103, 370
Migración celular, 99
Minerales, 22
Minisatélite, 233
Miofibrilla, 104
Miosina, I, 97, 99, 101, 104
  II, 98, 100, 103, 105, 342
  V, 97, 99, 102
Mitocondria, 14, 68, 165, 171, 173, 416
  crestas, 172
  espacio intermembranoso, 173
  matriz, 171, 174, 182
  membrana, externa, 173, 415
    interna, 172, 176, 415
  origen, 185
  reproducción, 181
Mitosis, 16, 18, 227, 309, 332, 333, 355
  anastral, 343
  en células vegetales, 342
Modelo corporal, 408
Mongolismo, V. *Down, síndrome de*
Monómeros, 21
Monosacáridos, 27
Monosomías, 385
Monotransporte, 64
Morfógeno, 399, 406
Mórula, 397, 399
Mosaico fluido, 53
Mosaicos, 385, 389
Motilidad celular, V. *Migración celular*
MPF, 346
mRNA, V. *ARNm*
MTOC, V. *Microtúbulos, centro organizador de los*
Muerte celular, V. *Apoptosis*
Mutación, del ADN, 324, 417
  génica, 324, 325, 326, 351
Myb, 350
Myc, 350, 351

N-acetilgalactosamina, 27
N-acetilglucosamina, 27
NAD^+, 167, 176
NADH, 167, 175, 176, 178
NADH deshidrogenasa, 172
$NADP^+$, 192, 194
NADP reductasa, 193
NADPH, 192, 194
Na^+K^+-ATPasa, V. *Bomba de de Na^+K^+*
Nebulina, 109
Necrosis, 412
Nernst, ecuación de, 61
NES, 231
Neurofilamentos, 82
Neurotransmisor, 204
Neurotrofinas, 414
Nexina, 90
Nexus, V. *Unión comunicante*
NGF, 210, 348, 414
Nicotinamida adenina dinucleótido, V. *NAD*
Niemann-Pick, enfermedad de, 154
Nitroglicerina, 207

NO, V. *Oxido nítrico*
No disyunción, 368, 384
Nodal, 405
Nódulo, de Hensen, 400
de recombinación, 361
Nogina, 404
Northern blotting, 447
Notocorda, 400, 401
NSF, 160
NSL, 229
Nucleasa reparadora, 316, 327
Núcleo, 8, 14, 16, 225, 377
entrada de proteínas, 229
salida de moléculas de ARN, 231, 283, 286
salida de proteínas, 231
Nucleoide, 6
Nucléolo, 16, 225, 250, 267, 283, 285, 286
Nucleoplasma, 16, 226
Nucleoplasmina, 236, 323
Nucleoporinas, 228
Nucleoproteínas, 37
Nucleósido, 25
Nucleosoma, 16, 234, 311
Nucleótido, 25

Ocludina, 119
OCT, 252
Oligopéptido, 36
Oligosacáridos, 28, 55, 139
Oncogenes, 321, 350
Operador, 271, 272
Operón, lac, 270, 271, 273
Trp, 273
Opsonina, 148
ORC, 313, 346
Organismo transgénico, 452
Organizador, nucleolar, 285
de Spemann, 404
Origen de replicación, 232, 312, 313
Ouabaína, 66
Ovocito, 357, 358, 369, 370, 375, 398
Ovogénesis, 354, 398
Ovogonio, 357
Ovulo, 354, 357, 366, 376
β-Oxidación de los ácidos grasos, 170, 171, 174, 199
Oxido nítrico, 207
Oxido nítrico sintasa, 207

P16, 349
P21, 349
P53, 319, 349, 351, 417
PABII, 279
Paquinema, 359
Pared, celular, 5, 11, 69, 70
primaria, 70
secundaria, 71
Partícula de reconocimiento de la señal, V. *PRS*
Patau, síndrome de, 388
Paxilina, 98
PCNA, V. *Abrazadera deslizante*
PCR, V. *Reacción en cadena de la polimerasa*
PDGF, 210, 348, 350
PDK1, 415
Peptidasa señal, 137
Péptido, C, 142
natriurético auricular (ANP), 209
señal, 75, 135, 185, 229, 303
Permeasa, 57, 58, 60, 63, 64
Peróxido de hidrógeno, 199, 417
Peroxisoma, 14, 199
reproducción, 201
PEST, 307
PH20, 374
PI, 31, 50, 133
PI 3-K, 211, 214, 224, 414
Picogramo, 3
Pigmento(s), 75
de desgaste, 75, 153
Pinocitosis, 147
PIP, 31, 133
PIP_2, 31, 50, 13, 214, 219, 222, 372, 376, 414
PIP_3, 31, 50, 133, 214, 224, 414
Pirimidinas, 24
Piruvato, 168, 174
Piruvato deshidrogenasa, 169
Placa, celular, 344
discoidal, 117, 121
de fijación, 359
Placoglobina, 96, 120, 121
Plactina, 82
Plan corporal, 396, 400
Planck, constante de, 191
Plasma germinativo, 398
Plásmido, 7, 441, 442
uso como vector, 443
Plasmodesmo, 124
Plasmodium falciparum, 69
Plástidos, 14, 187
Plastocianina, 193
Plastoquinona, 193
Poder de resolución, 2, 421
Polen, granos del, 377
poli A, 278, 293
poli A polimerasa, 279
Poliadenilación del ARNm, 278, 282
Polímeros, 21
Polipéptido, 22, 36, 138, 145
Poliploidías, 346, 384
Poliprenoides, 34
Poliproteínas, 307
Polirribosoma, 127, 297, 301
Polisacáridos, 21, 29, 55
Polisoma, V. *Polirribosoma*
Polispermia, bloqueo de la, 375
POMC, 142, 308
Porina, 6, 173
Poro(s), 57
de la envoltura nuclear, 225, 228
Potencial eléctrico, V. *Gradiente de voltaje*
Potencialidad evolutiva, 407
Potocitosis, 162
Prader-Willi, síndrome de, 267
pre-miARN, 288
pre-RC, 313, 346
Preleptonema, 358
Preproinsulina, 141
pri-miARN, 288
Primaquina, 69
Primer mensajero, 208
Proacrosina, 374
Procariota, V. *Célula procariota*
Procaspasa, 416, 417
Procentríolos, 94, 337
Procesamiento del ARN, 246, 277, 283, 285, 286, 287
regulación del, 282
Profase, 18, 334, 340
I, 358
II, 366
Profilina, 95
Progeria, 320
Progerina, 320
Proinsulina, 141
Prolactina, 212
Prometafase, 18, 334, 335, 340
I, 358, 364
Promotor, 248, 249, 250, 251, 252, 256, 260, 271
Pronúcleos, 376
Proopiomelanocortina, V. *POMC*
Proplástido, 196
Prosómera, 400
Prostaglandinas, 224
Protamina, 377
Proteasoma, 12, 77, 139
Proteína(s), 22, 35, 135, 142, 153, 226, 290
14-3-3, 415
de anclaje, 228
bipaso, 138
conjugadas, 37
degradación, 77, 303, 307
enzimáticas, 40
estructura, cuaternaria, 39, 303
primaria, 37, 324
secundaria, 38, 324
terciaria, 38, 324
fibrosas, 39
fusógenas, 160, 375
G, 214, 218, 371, 372, 373, 376
complejo βγ, 214
subunidad α, 214
G_{13}, 224, 414
G_i, 216, 218, 224, 414
G_q, 219
G_s, 215, 218
globulares, 39
integrales, 51, 52
intercambiadora, 182, 201
ligadoras, 79, 90, 92
motoras, 79, 90
multipaso, 52, 138
N1, 236, 323
no histónicas, 231, 235
periféricas, 51, 52
radiales, 90, 228

reguladoras, 79
síntesis de, 182, 184, 290, 298, 342
transmembranosas, 52
Proteinoide, 45, 46
Proteoglicanos, 30, 55, 114, 141
Protofilamentos, 80, 84
Protooncogenes, 349, 350
Protoplasma, 6, 73
PRS, 135, 287
PSE, 252, 269
PTPC, 415
Puentes de hidrógeno, 39, 321
Punto, de arranque, 345
de control G1, V. *Punto de arranque*
isoeléctrico, 40, 438
de ramificación, 280
Purinas, 24
Puromicina, 302

Queratansulfato, 29
Queratina, 81, 117, 121
Quiasma, 362
Quimiorrepulsión, 102
Quimiotaxis, 101
Quinasa(s), 208
A, 215, 371
B, 415
C, 222, 373, 376
CaM, 220, 221
dependiente de ciclina, 345
G, 209
Quinectina, 87
Quinesina, 86, 340
Quitisoma, 72

Rab, 157, 159
Rac, 100, 157
Rad51, 362
Radiaciones ionizantes, 326, 387
Radical libre, 200
Radioautografía, 434
Radioisótopos, 434
Raf, 211, 223, 350
Ran, 157, 230, 231
Ras, 157, 210, 350, 351
Rb, 349, 351
Reacción(es), acrosómica, 372
en cadena de la polimerasa, 447
cortical, 375
de Feulgen, 431
fotoquímicas, 192
en la oscuridad, 192
de PAS, 431
Reactivo de Schiff, 432
Receptor(es), 203, 205, 371, 372
α_1-adrenérgico, 219
α_2-adrenérgico, 217
β_2-adrenérgico, 217
acoplados a proteínas G, 213
que activan a una tirosina quinasa, 212, 414
con actividad de, guanilato ciclasa, 209
serina-treonina quinasa, 209
tirosina quinasa, 210
citosólicos, 206
de la membrana plasmática, 208, 212
con propiedades enzimáticas, 209
para la PRS, 136
para el ribosoma, 128, 136
Recombinación genética, 20, 360, 367, 383
Reconocimiento celular, 117, 118, 375
Región CG, 249, 266
Regulación genética, 258, 259, 261, 264, 265, 273
postranscripcional, 273, 274, 303, 304, 305, 307
Regulador, 249, 251, 260
Relación nucleocitoplasmática, 14, 345
Reparación del ADN, 326
Repeticiones invertidas, 329
Replicación del ADN, 245, 309, 323, 325
Replicón, 314
Represión enzimática, 273
Represor, 257, 271
lac, 271
Trp, 273
Respiración aeróbica, 5
Retículo, endoplasmático, 13, 67, 125, 126, 130, 141, 142, 182,
liso, 126, 127, 145, 146, 217, 220, 372, 376
rugoso, 126, 127, 135, 137, 139, 145, 146
sarcoplasmático, 67, 127
Retinoblastoma,
Retrotranslocación, 139
Retrovirus, 7, 330
Reversibilidad, 205
Rho, 99, 157
Ribonucleoproteína heterogénea nuclear, V. *RNPhn*
Ribosa, 24, 27
Ribosoma, 6, 12, 75, 127, 135, 250, 290, 292, 295, 298, 300
subunidad, mayor, 295, 296
menor, 295, 296
Ribotimidina, 286
Ribozima, 41, 280, 297
Ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa, 197
RIP, 417
RISC, 289, 304, 451
RNA, V. *ARN*
RNAi, V. *Interferencia del ARN*
RNPhn, 258, 292
RNPpn, 246, 280, 281
RNPpno, 246, 284, 285
Rombómera, 400
Rous, sarcoma de, 350
rRNA, V. *ARNr*

SII, 258
SIII, 258
Sales inorgánicas, 21, 22
SAR, 237, 312
Sarampión, 453
Sar1, 156
Sarcoglicano, 110
Sarcómero, 105
Satélite, 240
Saturabilidad, 205
scRNA, V. *ARNpc*
Sec, 156
Secreción, 145
apocrina, 75
constitutiva, 145
paracrina, 401
regulada, 145
Secuencia, alfoide, 233, 339
reguladora, 248
de terminación, 248, 250, 251
Segmentación del cigoto, 344, 377, 397, 398, 408
Segmento codificador, 248, 249, 251, 252, 271
Segundo mensajero, 208
Selectina, 117
Semaforina, 102
Senescencia replicativa, 321
Señal(es), de anclaje, 75, 135
intracelulares, 199
de poliadenilación, 279
Serina-treonina quinasa, 209
Seudogenes, 330
procesados, 330
Seudouridina, 284, 286
Sialoadhesina, 118
Sida, V. *HIV*
Significado evolutivo, 407
Sinamina, 82
Sinapsis, 358
nerviosa, 214
Síndrome, de Down, 368, 387, 389
respiratorio agudo grave, 453
SINE, 233
Singamia, 377
siRNA, V. *ARNpi*
sis, 350
Sistema de endomembranas, 13, 77, 125, 142, 162
Sitio(s), A, 296, 298, 300
AP, 325, 328,
E, 296, 298, 300
P, 296, 298, 300
Sizzled, 404
sFRP-2, 404
SL1, 267, 285
Sm, 286
Smad, 209
SNAP, 160
SNAPc, 269
SNARE, 159, 160
snRNA, V. *ARNpn*
snoRNA, V. *ARNpno*
Solenoide, 236
Solutos, 57, 58
Somatomedina, 348
Sombreado, 427
Somita, 401, 407

Sonda de ADN, 445
Southern blotting, 447
SPF, 313, 346
SR, 283
Src, 350
SSB, 318, 321
STAT, 212
Succinato deshidrogenasa, 172
Sustancia inductora, 61, 203, 205, 271, 348, 401, 406

TAF, 258, 267, 269
Talina, 98
TATA, 249, 252
Tau, 88
Taxol, 88
Tay-Sachs, enfermedad de, 154
TBP, 258
Telofase, 18, 334, 337, 341
I, 365
II, 366
Telomerasa, 287, 320
Telómero, 232, 242, 318, 359
Termogenina, 180
teRNA, V. *ARNte*
Territorio cromosómico, 242
Tetraciclina, 302, 443
Tétrada, 361, 363
TFII, 258, 267
TFIIS, V. *SII*
TFIII, 269
TGF-β, 209, 403
Tilacoide, 189
TIM, 185
Timina, 24
Timosina, 25, 95
Tirosina quinasa, 210
Titina, 109
TNF, 417
TNF-R, 417
TOM, 185
Tonofilamentos, 81
Topoisomerasas, 321, 322
Tos ferina, 218
Toxina diftérica, 302
TRADD, 417
Traducción del ARNm, 23, 245, 290
regulación de la, 303
TRAF, 417
Transcitosis, 150
Transcripción del ADN, 23, 245, 254, 267, 270, 310, 322, 341
en células procariotas, 260, 270, 273
regulación de la, 258
Transcriptasa inversa, 330, 447
Transcripto primario, 246, 257, 282, 283
Transferrina, 306
Transgén, 452
Transgénesis, 452
Translocación, 300, 386, 387, 389
robertsoniana, 387
Translocón, 57, 136, 185
Transportador, 57
Transporte, activo, 57, 58
pasivo, 57, 58, 67
Transportina, 229
Transposasa, 329
Transposición del ADN, 329
Transposón, 329, 451
Trasplante nuclear, 394
Trastornos metabólicos, 325
TRF, 232, 318
Triacilgliceroles, 31, 74, 130, 201
Triglicéridos, V. *Triacilgliceroles*
Tripletes, 247, 290
Trisomías, 385, 388
Trisquelión, 155, 157
tRNA, V. *ARNt*
Trofoblasto, 397
Tropocolágeno, 114
Tropomiosina, 108, 111
Tropomodulina, 111
Troponinas, 108, 221
TTP, 25
Tubulina(s), 83, 305, 330
α, 83
β, 83
capuchón de, 86
γ, 83, 85
Turner, síndrome de, 389, 390

UBF, 267
Ubiquinona, 34, 172
Ubiquitina, 77, 139
Ultracentrifugación, 436, 438
Ultramicrótomo, 427
Unidad(es), de replicación, 312
S (Svedberg), 295, 438
Unión(es), comunicante, 110, 122
covalentes, 39
electrostática, 39
estrecha, V. *Unión oclusiva*
fosfodiéster, 24, 254, 310
gap, V. *Unión comunicante*
en hendidura, V. *Unión comunicante*
heterofílicas, 117
homofílicas, 118
intercelulares, 117, 119
iónica, 39
N, 28, 55, 139
no covalentes, 39
O, 28, 55, 140
oclusiva, 119
peptídica, 35, 292
Uracilo, 25
Uridina, 25
UTP, 25

Vacuola, 163
Vaina interna, 90
Valinomicina, 62
Valor posicional, 400, 406
van der Waals, interacción de, 40
Vector, 443
VEGF, 210, 348
VegT, 402
Vesícula(s), 125
secretora, 144, 145
recicladora, 125, 144
transportadora, 125, 143, 154, 159
Vibrátomo, 423
Vibrio cholerae, 218
Villina, 104
Vimentina, 82
Vinblastina, 88
Vincristina, 88
Vinculina, 96, 98, 120
Virus, 7, 326, 350, 417, 451, 453
de la hepatitis B, 351
HIV, 68, 453
Sendai, 54, 395
Vitamina D, 206

Western blotting, 447
Wnt, 404
wt, 352

Xantófila, 192
Xenopus laevis, 394, 398, 402, 406
Xeroderma pigmentoso, 328
Xic, 252, 265
Xilema, 69
Xilosa, 27
Xist, 265
xistRNA, V. *ARNxist*
Xlr, 404
Xnr, 403
XXX, síndrome, 388
XYY, síndrome, 388

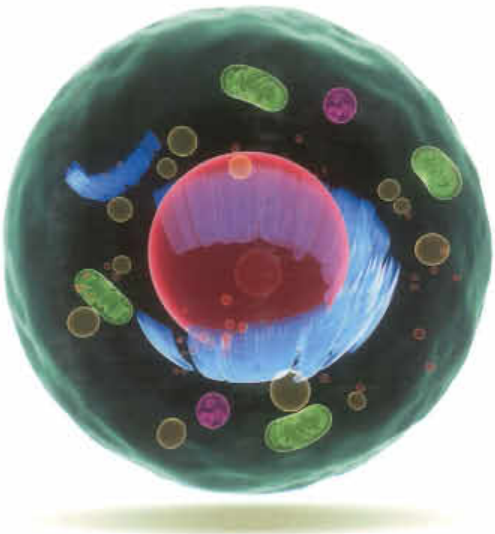
YAC, 444

Zellweger, síndrome de, 201
Zonula adherens, V. *Cinturón adhesivo*
Zonula occludens, V. *Unión oclusiva*
ZP, 370, 372, 373, 374, 375

UNIVERSIDAD PRIVADA DEL ESTE
BIBLIOTECA
FILIAL CIUDAD DEL ESTE

DE ROBERTIS

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR



ISBN 978-987-242

9 789872 425593

PROMED