

DIRECCIÓN DE DOCENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR



Universidad de Concepción

TEXTO DE APOYO A LA DOCENCIA



AUTOR: Fidelina González M.
Departamento de Biología Celular
Eugenio Arriagada M.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



2008 MANUAL DE BIOLOGÍA CELULAR PARA LA CARRERA DE ENFERMERÍA.
Fidelina González Muñoz
Eugenio Arriagada Maldonado

Registro Propiedad Intelectual N° 169.912

I.S.B.N. 978-956-8029-77-7

Primera Edición Marzo 2008

Impresión:
Talleres Dirección de Docencia
Edmundo Larenas 64-A
Barrio Universitario
Concepción

IMPRESO EN CHILE / PRINTED IN CHILE

Prólogo

Como resultado de una encuesta aplicada en dos años sucesivos, en generaciones anteriores del curso de Biología Celular Básica (251.121) dictado a los estudiantes de Biología Celular Básica de la Carrera de Enfermería de la Universidad de Concepción, con el fin de averiguar posibles carencias que hubieran en el curso con el objetivo de lograr un mejor rendimiento de los estudiantes, surgió la idea de hacer un manual de apuntes para este ramo.

Este manual de apuntes es un material de apoyo para las clases expositivas de dicha asignatura (con el apoyo de presentaciones digitales). Se ha privilegiado el texto a la figura por razones de economía en número de páginas. Los estudiantes acceder a las figuras pertinentes en las clases.

Se incluye además todos los cuestionarios que los estudiantes deben desarrollar durante el curso sobre las materias de las clases expositivas. También se incluyen los cuestionarios relativos a seminarios (sobre Virus y Cáncer), películas y sesiones de laboratorio. Estas últimas actividades son complementarias a las clases expositivas.

Este material impreso puede además ser utilizado por cualquier estudiante del área biológica que requiera complementar información sobre biología celular actualizada hasta el año 2005, en español.



CAPÍTULO I

MEMBRANAS BIOLÓGICAS

H. Eugenio Arriagada M.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.

Todas las células poseen al menos una membrana externa, la membrana plasmática, que separa el citoplasma (parte de la célula que, en las células eucariontes, se ubica fuera del núcleo) del medio extracelular. El citoplasma, contiene un gran número de diferentes enzimas. Las células eucariontes tienen además membranas internas que delimitan los diversos organelos y compartimientos intracelulares. Cada tipo de organelo, posee un complemento particular de proteínas, algunas inmersas en sus membranas, otras en su espacio interior acuoso, o en el lumen. Estas proteínas permiten a cada organelo desarrollar sus funciones características.

Las membranas biológicas pueden separar estos diferentes medios porque ellas son generalmente impermeables a macromoléculas y selectivamente permeables a solutos.

Al microscopio electrónico de transmisión (TEM), las membranas biológicas presentan una apariencia trilaminar como una línea de ferrocarril (Figura 1), con dos zonas electrodensas (oscuras) separadas por una zona central menos densa (clara).

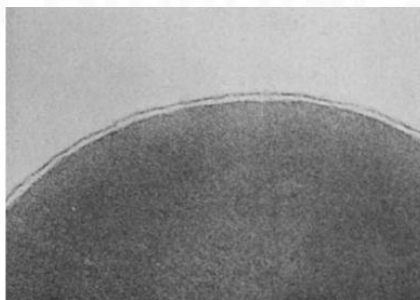


Figura 1. La apariencia trilaminar de la membrana plasmática. Micrografía de membrana de eritrocito humano, teñida con tetraóxido de osmio, obtenida al TEM.

El espesor de la mayoría de las membranas de mamíferos es de 6-10 nm, pero algunas de ellas son significativamente más delgadas. Las membranas intracelulares son normalmente de menor espesor que las membranas plasmáticas.

La base estructural del diseño particular de cada tipo celular en lo referente a su forma y a la ubicación de sus organelos, descansa en su citoesqueleto, una densa red compuesta de tres clases de proteínas fibrilares: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, desplegada en todo el citoplasma y que sustenta mecánicamente a las membranas celular y nuclear. Las proteínas del citoesqueleto, están entre las proteínas más abundantes en una célula eucarionte.

Las distintas membranas que tienen las células nucleadas animales son especializadas debido a que poseen proteínas y lípidos específicos que les permiten efectuar tareas únicas.

Diversidad funcional de las membranas.

Las membranas biológicas son más que un límite físico como se señaló más arriba, son estructuras que tienen funciones complejas y diversas. La función más general de las membranas es la de separación de distintos compartimientos celulares o subcelulares. Esta compartimentación permite que procesos celulares especializados tengan lugar sin interferencia externa y posibilita que las actividades celulares se regulen en forma independiente.

Hay varias ventajas de la formación de compartimientos en el interior de la célula. Cuando las moléculas de una reacción catalizadas por enzimas se concentran en un espacio pequeño del volumen celular total los reactivos pueden "encontrarse" con mayor facilidad, lo cual aumenta la velocidad de la reacción. Los compartimientos separados por membranas también mantienen alejados de otras estructuras, ciertos reactivos químicos que pueden afectar a las reacciones químicas de manera adversa.

Los compartimientos también permiten el almacenamiento de energía cuando se produce una diferencia en la concentración de una sustancia a

cualquier lado de la membrana que los separa; la energía puede así, convertirse a otras formas de energía mientras las moléculas se mueven a través de las membranas desde el lado de mayor concentración hacia el de menor concentración. Este proceso de transducción de energía (cambio de una forma de energía en otra), es el mecanismo básico que utiliza la célula para convertir y almacenar energía. En el interior celular, las membranas mitocondriales sustentan procesos de transducción de energía.

Las membranas celulares también desempeñan la importante función de superficie de trabajo, así, algunas reacciones químicas son catalizadas por enzimas ligadas a las membranas. Las membranas proporcionan un andamiaje que permite organizar en la superficie celular a las enzimas que participan en reacciones sucesivas, ordenando los reactantes para una interacción más efectiva, pudiéndose generar más rápidamente algunas moléculas requeridas por la célula.

Las membranas biológicas son estructuras muy dinámicas (flexibles) permitiendo a los componentes celulares y subcelulares los cambios de forma que acompañan al crecimiento celular y al movimiento (movimiento ameboso). Gracias a la fluidez de las membranas sus componentes lipídicos y proteicos son capaces de moverse e interactuar.

Las membranas son autosellantes (por razones termodinámicas), lo que permite entre otras cosas que dos membranas se fusionen como ocurre en el fenómeno de la exocitosis.

En las membranas, hay proteínas integrales que atraviesan la bicapa lipídica tales como: proteínas transportadoras o portadoras ("carriers") que translocan iones y solutos orgánicos a través de la membrana; receptores que se combinan con moléculas específicas externas (ligandos o primeros mensajeros) tales como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, provocando que la membrana genere una señal que puede estimular o inhibir una respuesta celular (transducción de señales); moléculas de adhesión que hacen posible que las células se reconozcan y se adhieran entre sí y con componentes de la matriz extracelular.

En las superficies de la bicapa lipídica, se encuentran proteínas periféricas. Algunas de estas proteínas participan en reacciones enzimáticas y en vías de señalización intracelular. Otras forman un esqueleto sobre la superficie citoplasmática que refuerza la frágil bicapa lipídica y la une a microfilamentos o a filamentos intermedios del citoesqueleto.

La membrana plasmática funciona como una barrera de semipermeabilidad entre la célula y el medio extracelular, es decir, restringe y regula el paso de solutos hacia y desde el interior celular. Las membranas también controlan el paso de sustancias hacia y desde los organelos celulares.

La membrana plasmática, se caracteriza también por presentar una continuidad transitoria con el sistema endomembranoso a través de las vesículas de exocitosis.

¿Cómo las membranas biológicas pueden realizar diferentes funciones?

Un enfoque experimental que se ha utilizado para responder la anterior interrogante, ha sido determinar primero qué componentes químicos son comunes y cuáles son únicos en las diferentes membranas biológicas.

Después, se han estudiado las propiedades químicas y fisicoquímicas de los distintos componentes de las membranas biológicas y cómo estos componentes se asocian e interaccionan entre ellos para formar estructuras moleculares estables y dinámicas.

Finalmente, considerando los aspectos anteriores, se han elaborado modelos de membranas biológicas que permitan explicar dicha diversidad funcional.

Dichos modelos son muy importantes en el estudio de los organismos biológicos. Un buen modelo incorpora lo que se conoce acerca de una entidad y agrega la mejor aproximación acerca de aquellas partes que faltan y/o las formas en que se interrelacionan. Los modelos, al igual que las hipótesis, pueden resultar erróneos, pero ellos sirven como un valioso elemento si estimulan los experimentos y la investigación necesaria para confirmar la evidencia. No

obstante, los modelos son hipotéticos y no deben ser considerados más allá de lo que son. Así, a pesar de su gran utilidad, los modelos no pueden sustituir las mediciones y los experimentos en un sistema real.

Constituyentes químicos principales de las Membranas Biológicas.

Para la determinación de los componentes químicos presentes en las diferentes membranas biológicas fue necesario previamente contar con preparaciones de membranas puras provenientes de diversas fuentes.

Las membranas bajo estudio fueron primero aisladas como una entidad separada (deben retener alguna o la mayoría de las propiedades apreciadas en observaciones morfológicas o estudios de permeabilidad en células intactas o en organelos celulares) a partir de homogenizados de tejidos (hígado, riñón, etc.) obtenidos por diferentes técnicas, mediante centrifugación diferencial y/o centrifugación en gradiente de densidad y luego procesadas para su purificación. Una preparación muy estudiada, ha sido la de membranas de glóbulos rojos maduros de mamíferos ("fantasmas"). Posteriormente, se realizó el análisis químico de los constituyentes de las membranas empleando entre otras técnicas, las cromatográficas. Los resultados obtenidos, mostraron los diversos componentes lipídicos, proteicos e hidratos de carbono existentes en aquellas.

Después de alcanzar el conocimiento de la composición química de las membranas, se realizaron estudios físicoquímicos de los componentes puros, los cuales han ido revelando la organización de las membranas y la forma cómo los constituyentes de ellas interactúan mutuamente y cómo se afectan unos a otros.

Todas las membranas biológicas están compuestas principalmente de lípidos y proteínas. Los componentes lipídicos no sólo afectan la forma celular sino que desempeñan roles importantes como en el anclaje de proteínas a la membrana, en la modificación de actividades de proteínas de membrana (microambiente lipídico) y en la transducción de señales (fosfatidilinositol). La función principal de cada membrana, está determinada esencialmente por el complemento de proteínas que posee y por las proteínas adyacentes a aquella.

La mayoría de las membranas plasmáticas de mamíferos presentan además carbohidratos (2-10% en peso). Con la excepción de las membranas del aparato de Golgi, la mayoría de las membranas intracelulares tienen muy bajo contenido de hidratos de carbono. Los carbohidratos no están en las membranas animales como componentes individuales sino que en su mayoría unidos covalentemente al OH de una serina o treonina (enlace O-glicosídico o unión O) o al grupo amida de una asparagina (enlace N-glicosídico o unión N) pertenecientes a proteínas de membrana a la forma de glicoproteínas y en menor proporción también covalentemente unidos a lípidos de membrana, como glicolípidos.

La proporción entre lípidos y proteínas varía considerablemente dependiendo del tipo de membrana, del organismo y del tipo celular (Tabla 1).

Tabla 1. Composición (% en peso) de membranas plasmáticas e intracelulares.

Membrana	Proteína	Lípido	Carbohidrato
Mielina (SNC humano)	18	79	3
Eritrocito (humano)	49	43	8
Hígado (rata)	58	42	(5-10)
Mitocondria (cerdo)			
Membrana interna	76	24	(1-2)
membrana externa	55	45	
Microsomas (bovino)			
RE rugoso	55	45	
RE liso	47	53	
<i>B. subtilis</i>	80	20	

En la tabla anterior, se puede apreciar que en las membranas plasmáticas de células animales la relación entre proteínas y lípidos es aproximadamente 1:1, mientras que en las membranas internas el contenido de proteínas suele ser mayor. Por otro lado, las membranas que forman la vaina de mielina, cuya función principal es ser un aislante eléctrico, presenta alrededor de 80% de lípidos.

Estas diferencias señaladas y otras pueden ser correlacionadas con las funciones básicas de estas membranas. La membrana interna de la mitocondria,

presenta numerosas proteínas relacionadas con procesos como la fosforilación oxidativa, la cadena transportadora de electrones y el transporte de metabolitos.

Lípidos de las membranas.

Los componentes lipídicos de las membranas contribuyen a la función de “barrera” de las membranas. El lípido es también responsable de la fluidez y la flexibilidad/curvatura de las membranas. La flexibilidad de las membranas es esencial para la formación de vesículas provenientes de membranas y para la fusión de membranas como se indicó anteriormente. Los lípidos son también muy importantes en numerosas vías de señalización celular.

Hay tres clases de lípidos de membranas celulares animales: fosfoglicéridos, esfingolípidos, y colesterol. La cantidad y el tipo de lípidos que se encuentran en las membranas de células diferentes de un organismo determinado son variables, incluso en las diversas membranas de un mismo tipo celular.

Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas, esto es, parte de la molécula es hidrofóbica; y parte es hidrofílica pudiendo por tanto interactuar con moléculas polares y con moléculas polares (agua).

Debido a la forma y la naturaleza anfipática los lípidos (excepto el colesterol), forman espontáneamente bicapas en solventes acuosos, en las cuales las zonas hidrofílicas están expuestas al medio acuoso y las zonas hidrofóbicas alejadas del contacto con el agua. La estructura de la bicapa lipídica es mantenida por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas de los ácidos grasos de los fosfolípidos.

Los fosfoglicéridos juegan un papel esencial en la síntesis de lipoproteínas plasmáticas y eicosanoides. Ellos funcionan también en la transducción de mensajes desde los receptores de la superficie celular a segundos mensajeros que controlan los procesos celulares. También juegan un rol fisiológico muy importante como surfactante pulmonar (Dipalmitoil fosfatidilcolina).

El colesterol es principalmente de origen animal y es un constituyente esencial de las membranas celulares, especialmente en la membrana plasmática.

Fosfoglicéridos.

Los fosfoglicéridos son comúnmente llamados fosfolípidos, pero este término es impreciso ya que otros lípidos también contienen fosfato. Son la clase más abundante de los lípidos de las membranas biológicas. Son derivados acilados del *sn*-glicerol-3-fosfato. En términos estrictos, esta definición es la de ácido fosfatídico, el cual está virtualmente ausente en la mayoría de las membranas.

En general, los ácidos grasos en el C-1 del glicerol son generalmente saturados pero pueden presentar un doble enlace y habitualmente tienen 16 o 18 átomos de carbono, mientras los ácidos grasos en el C-2 tienen 1 a 4 dobles enlaces y con 18 a 24 átomos de carbono (cada doble enlace genera una curvatura, "kink", permanente en la cadena alifática de los ácidos grasos). La anterior región es de naturaleza hidrofóbica y se le suele denominar cola o tallo.

Los fosfoglicéridos más abundantes contienen a su vez un radical hidrófilo, que puede ser un grupo polar nitrogenado (colina, serina o etanolamina), inositol o bien glicerol, unido mediante enlace éster al grupo fosfato del ácido fosfatídico. Esta última región es hidrofílica y se le llama cabeza polar.

También es considerado como fosfolípido por su parecido estructural el difosfatidilglicerol o cardiolipina, presente en las membranas mitocondriales interna y externa, que tiene dos ácidos fosfatídicos unidos a glicerol.

Los fosfoglicéridos son, por lo tanto, moléculas anfipáticas o anfifílicas con "colas" apolares o hidrofóbicas y "cabezas" polares o hidrofílicas (Figura 2).

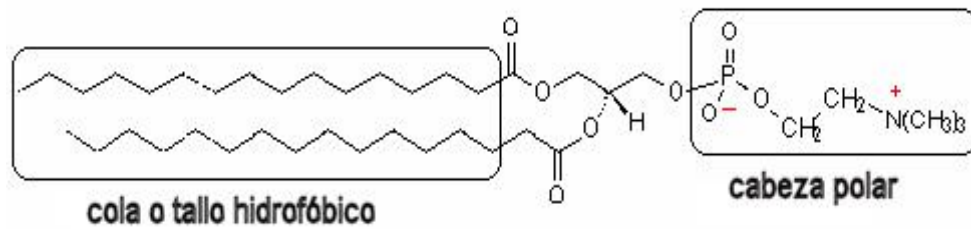


Figura 2. Estructura química de un fosfoglicérido, 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina). Se muestra en rectángulos, la cabeza polar y la cola apolar del fosfolípido (molécula anfipática).

El signo de la carga eléctrica de la cabeza polar depende del pH. A pH fisiológico, fosfatidilserina y fosfatidilinositol presentan una carga negativa neta, fosfatidiletanolamina (nombre trivial, cefalina) y fosfatidilcolina (nombre trivial, lecitina) son neutros. Lo anterior, se ilustra en la Figura 3.

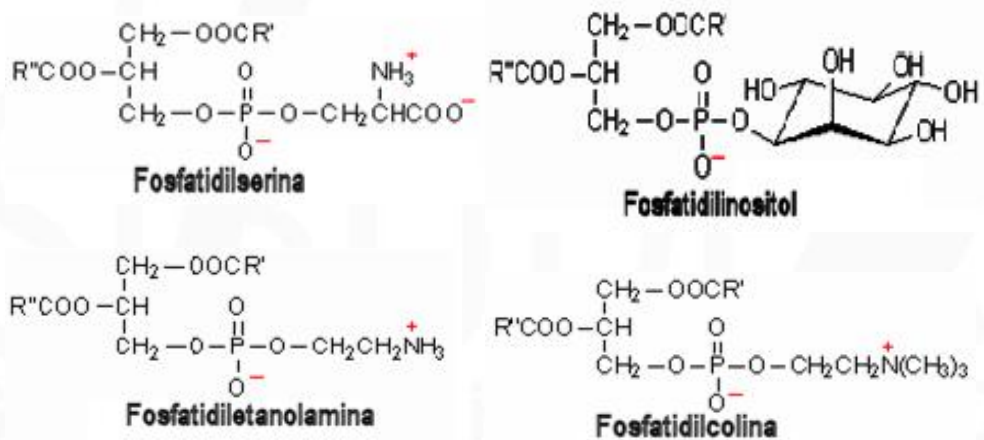


Figura 3. Representación de la estructura química de los fosfolípidos: fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC).

De los fosfolípidos, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son los más abundantes, representando entre los dos, el 30 a 40% (en peso) de todos los lípidos de la membrana plasmática, y hasta el 75% en algunas membranas

internas. La fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, están también presentes en las membranas, pero en menor proporción (1 a 10%).

Los fosfolípidos que contienen inositol (un hexahidroxil alcohol) referidos generalmente como fosfoinosítidos, tienen un rol destacado en la comunicación intracelular. Fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) están presentes en membranas plasmáticas. El PIP₂ es la fuente de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG o DG), señalados como “segundos mensajeros” y que están involucrados en la acción de algunas hormonas.

Otro grupo de lípidos derivados de los fosfoglicéridos son los plasmalógenos, que poseen una cadena alifática unida a glicerol por un enlace éster, y una larga cadena alifática unida al C-1 del glicerol por un enlace éter α , β -insaturado. Los plasmalógenos que contienen etanolamina o colina esterificados al fosfato son abundantes en cerebro y corazón. En tejido cardíaco más del 50% de los glicerofosfolípidos conteniendo etanolamina son plasmalógenos.

Se ha informado de altos niveles de plasmalógenos en membranas plasmáticas de células cancerosas metastásicas, sugiriendo con esto que estas moléculas pueden tener un rol en las características invasivas de estas células.

Los esfingolípidos son derivados de esfingosina.

Los esfingolípidos tienen una estructura diferente a la de los fosfolípidos. En vez de glicerol, los esfingolípidos contienen ceramida (Figura 4b), unidad estructural fundamental de todos los esfingolípidos, la cual es una molécula de esfingosina, amino alcohol de 18 átomos de carbono (Figura 4a), unida a un ácido graso por su grupo amino. Es frecuente que presenten ácidos grasos saturados de cadena larga (20 a 24 átomos de carbono).

Los diferentes esfingolípidos, tienen grupos adicionales unidos al alcohol de la esfingosina. Si este grupo adicional es fosforilcolina o fosfoetanolamina, la molécula resultante es una esfingomielina (Figura 4c), la cual a pH fisiológico es una molécula neutra. Las esfingomielinas son también moléculas anfipáticas.

La esfingomielina que es considerada como fosfolípido, porque contiene fósforo, es el esfingolípido más abundante en los tejidos de mamíferos, representando 10-20% de los lípidos de membranas plasmáticas y 1-5% en la mayoría de las membranas internas. La mielina que rodea y aísla eléctricamente a muchos axones en las neuronas del tejido nervioso, es particularmente rica en esfingomielinas. Las propiedades físicas de los esfingolípidos son similares a los de los fosfoglicéridos, con los cuales ellos son encontrados en muchas membranas biológicas. El tallo hidrocarburo de esfingosina y el ácido graso contribuyen a la bicapa hidrofóbica, y los grupos de las cabezas polares son expuestos hacia la superficie.

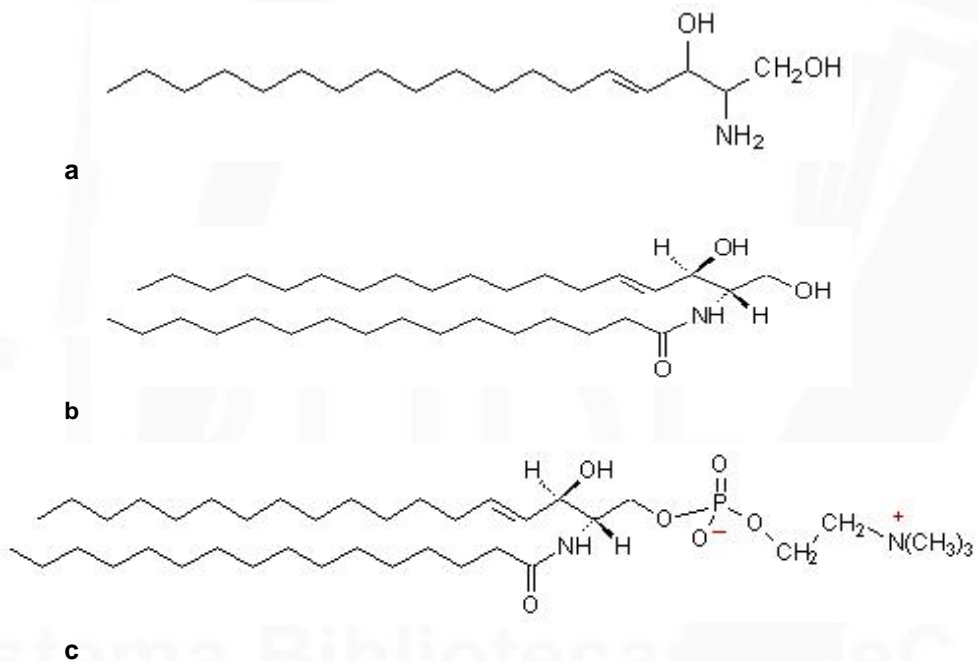


Figura 4. Representación de la estructura de: a) esfingosina, b) ceramida, y c) esfingomielina (SM).

Si el grupo adicional unido al alcohol de esfingosina es un azúcar, se genera un esfingoglicolípido o glicoesfingolípido. Los esfingoglicolípidos son derivados de ceramida, que presentan monosacáridos u oligosacáridos, unidos mediante un enlace β -glicosídico al grupo 1-OH de la esfingosina en una ceramida; no contienen fosfato y son con mucha frecuencia eléctricamente

neutros. Los glicolípidos, se hallan en la superficie externa de la membrana y son los lípidos que presentan la mayor asimetría en su distribución en las membranas. Dependiendo de la naturaleza del azúcar, se distinguen diversos glicoesfingolípidos: cerebrósidos, sulfátidos, globósidos y gangliósidos.

Los cerebrósidos que tienen glucosa o galactosa unida a la cerámida dan origen a los glicocerebrósidos y galactocerebrósidos respectivamente. Son compuestos neutros. Los galactocerebrósidos, se encuentran en cantidad apreciable en el cerebro y tejido nervioso (mielina tiene un alto contenido de un galactocerebrósido), mientras que pequeñas cantidades de cerebrósidos presentes en tejidos no neuronales normalmente contienen glucosa.

Los sulfátidos son los ésteres sulfúricos de los cerebrósidos. Los más frecuentes son los derivados de los galactocerebrósidos, donde el grupo sulfato esterifica el C₃ del azúcar. Galactocerebrósido 3-sulfato, es el principal sulfolípidos en el cerebro, dando cuenta de aproximadamente 15% de los lípidos de la materia blanca. Los cerebrósidos y los sulfátidos normalmente contienen ácidos grasos con 22-26 átomos de carbono. Estos últimos compuestos son iónicos.

Los globósidos, son glicoesfingolípidos neutros con dos o más azúcares, normalmente D-glucosa, D-galactosa o N-acetil-D-galactosamina. Los globósidos y los cerebrósidos son a veces llamados glicolípidos neutros, ya que a pH fisiológico no presentan carga eléctrica neta.

Los gangliósidos (Figura 5), los glicolípidos más complejos contienen un grupo oligosacárido (el número de hexosas varía entre uno y cuatro) que tiene de uno o varios residuos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); son compuestos anfipáticos con una carga negativa a pH fisiológico.

Los gangliósidos son abundantes en las membranas plasmáticas de las neuronas donde constituyen 5-10% del total de los lípidos. Ellos también se encuentran en menores cantidades en membranas plasmáticas de células de la mayoría de los tejidos extraneuronales. Su nomenclatura abreviada hace referencia al número de ácidos siálicos que contienen (M: un ácido siálico; D: dos ácidos siálicos; etc.), y el número, a su posición relativa de migración en cromatografía de capa fina.

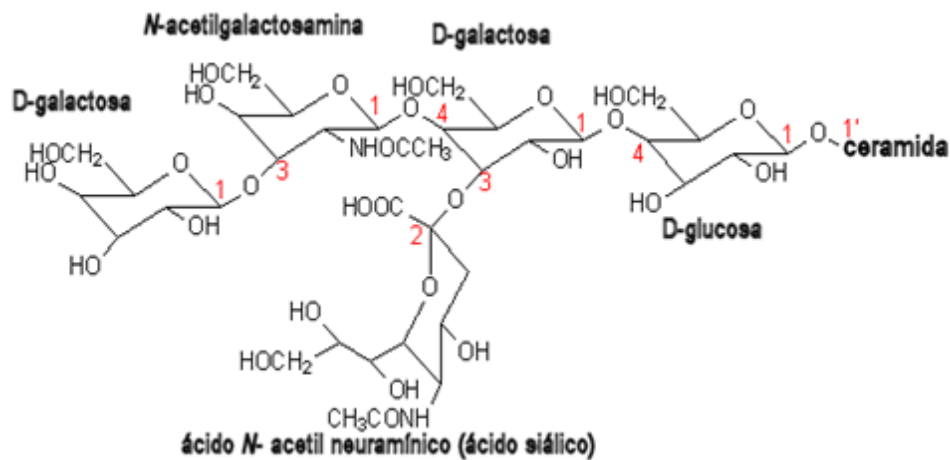


Figura 5. Fórmula estructural del gangliósido G_{M1} .

La porción oligosacárida de los gangliósidos, se extiende más allá de la superficie de la membrana, participa en el reconocimiento célula-célula, y sirve como sitio de unión para hormonas y toxinas bacterianas.

El gangliósido G_{M1} (Figura 5), sirve como un receptor de la membrana celular para la toxina del cólera, una proteína secretada por el patógeno *Vibrio cholerae*. También las toxinas de las bacterias del tétanos, del botulismo y de la difteria, se unen selectivamente a ciertos oligosacáridos de los gangliósidos presentes en la superficie celular.

Algunos desórdenes de almacenamiento de lípidos (gangliosidosis), implican acumulación de gangliósidos en las células. Las dos gangliosidosis más comunes, conducen al almacenamiento de los gangliósidos G_{M1} (gangliosidosis generalizada) y G_{M2} (enfermedad de Tay-Sachs)

Por lo anterior, los gangliósidos tienen además una importancia médica.

Colesterol.

El colesterol es un componente mayoritario de las membranas plasmáticas animales. En las membranas de organelos, se encuentra en menor cantidad. Las

membranas de procariontes no contienen colesterol (ver Tabla 2). Un poco más de la mitad del colesterol del cuerpo proviene de síntesis y el resto es proporcionado por la dieta promedio.

El colesterol es una molécula planar rígida, más pequeña y con un carácter anfipático menor que el de otros lípidos. El colesterol al igual que los esteroides, que son predominantemente de origen eucarionte, es derivado de un compuesto llamado ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 6a).

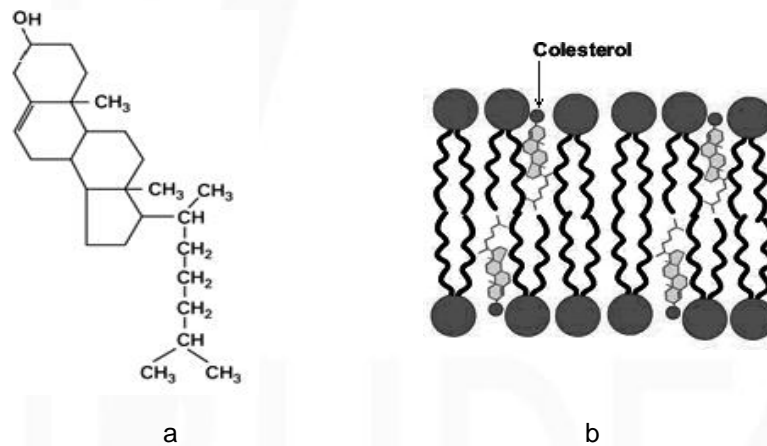


Figura 6. a) La estructura química del colesterol, **b)** Las moléculas de colesterol están orientadas e intercaladas en ambas monocapas lipídicas.

El colesterol, es una molécula anfipática y como tal se orienta con su pequeño grupo OH polar hacia la superficie de la membrana interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos, y con su región hidrofóbica (anillo esteroide) embebida en el interior de la membrana (Figura 6b).

El colesterol, es un modulador o tampón de los cambios de la fluidez de la bicapa lipídica. El efecto neto del colesterol en la fluidez de la membrana depende la proporción de fosfolípidos (PC, PE) y esfingolípidos (SM). Además, el colesterol restringe el movimiento de las colas de los fosfolípidos en la zona cercana a los grupos polares y hace a la membrana menos deformable, esto es, refuerza la estabilidad de la membrana.

El colesterol es un precursor de los ácidos biliares formados en el hígado. Es también precursor de hormonas esteroidales (cortisol, aldosterona, andrógenos, estrógenos, progestágenos), y glicósidos cardíacos.

El colesterol está presente en los tejidos y en el plasma ya sea como colesterol libre o como una forma almacenable, combinado con un ácido de cadena larga a la forma de éster de colesterilo. En el plasma, ambas formas son transportadas en lipoproteínas.

Los porcentajes de algunos de los principales tipos de lípidos de una variedad de membranas, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Composición lipídica (% en peso lípido total) de membranas típicas.

	Mielina	G. R.	Mitocondria	Microsoma	<i>E. coli</i>
Colesterol	25	25	5	6	0
PC (lecitina)	11	23	48	55	0
PE (cefalina)	14	20	28	18	82
SM	6	18	0	0	0
PS	7	11	0	9	0
PG	0	0	1	0	7
Resto*	37	3	18	13	11

*Principalmente cerebrósidos en el caso de mielina, y cardiolipina (difosfatidilglicerol) en el caso de mitocondria y *E. Coli*.

Bicapa lipídica.

A pesar de la variabilidad en la composición fosfolipídica de las membranas biológicas, la unidad estructural es siempre una bicapa (Figura 7), una estructura laminar compuesta de dos capas de moléculas de fosfolípidos en aposición cuyas cabezas polares enfrentan el medio acuoso y cuyas colas alifáticas forman un medio hidrofóbico de alrededor de 3 nm (30 Å) de espesor.

La bicapa lipídica, es una consecuencia de la orientación espontánea energéticamente más favorable de las moléculas de fosfolípidos (tienen forma

cilíndrica) y de esfingolípidos en un medio acuoso. Las cabezas hidrofílicas de los lípidos están en contacto con el agua en cada superficie de la bicapa, y las colas hidrofóbicas de cada monocapa están excluidas del contacto con el agua en el interior, interaccionando entre ellas.

La estabilidad de la bicapa depende de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas acil lipídicas de los fosfolípidos: las interacciones de van der Waals entre las cadenas alifáticas que favorecen el empaquetamiento de las colas. También contribuyen los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares de los fosfolípidos y el agua.

Otros lípidos que poseen grupos de la cabeza hidratados más anchos que las cadenas alifáticas tales como ácidos grasos libres, lisofosfolípidos (sólo tienen un ácido graso) y detergentes tales como el dodecil sulfato de sodio (SDS), tienen forma cónica, y forman micelas (estructuras esféricas constituidas por moléculas con sus regiones hidrofóbicas agregadas en el interior excluidas del contacto con el agua y sus regiones polares en la superficie interaccionando con el agua) cuando se colocan en un medio acuoso.

El colesterol no forma bicapas por sí sólo, pero se integra fácilmente en las bicapas formadas por otros lípidos anfipáticos.

Las mismas fuerzas impulsoras de la formación de bicapas lipídicas proveen otra propiedad importante, el autosellado. Si se interrumpe mecánicamente la continuidad de una bicapa, ésta se cierra o autorrepara por razones termodinámicas ya que es energéticamente desfavorable que un borde libre con cadenas alifáticas esté expuesto al agua.

La bicapa lipídica es un fluido bidimensional, en que los fosfolípidos, difunden rápidamente en el plano de la membrana. La difusión lateral de lípidos en las membranas, se ha estudiado cuantitativamente con técnicas espectroscópicas, y la de lípidos y proteínas de membrana, por medio de la técnica de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo o FRAP ("fluorescent recovery after photobleaching").

Los fosfolípidos intercambian lugar con sus vecinos $\sim 10^7$ veces por segundo, lo que significa que una molécula puede difundir en el plano de la

membrana 1-2 μm en 1 segundo. Los fosfolípidos pueden experimentar también movimientos de rotación en torno a un eje perpendicular a la membrana y de flexión (Figura 8). Sin embargo, estudios recientes sugieren que no todos los lípidos difunden libremente en la membrana plasmática.

El flip-flop o difusión transversal de los fosfolípidos (Figura 7) rara vez ocurre espontáneamente debido a que no está termodinámicamente favorecido. Sin embargo, las células poseen enzimas llamadas flipasas, que mueven activamente ciertos fosfolípidos desde una superficie de la membrana a la otra. Estas enzimas desempeñan un rol en el establecimiento de la asimetría lipídica en las membranas celulares.

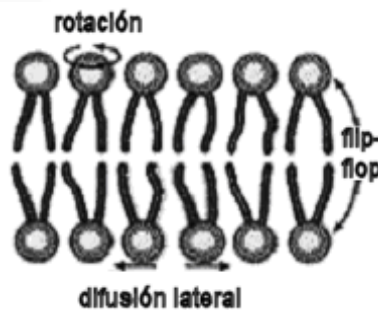


Figura 7. Bicapa lipídica. Algunos de los movimientos que exhiben los fosfolípidos en la bicapa.

Fluidez de las membranas.

La fluidez es un reflejo de la viscosidad dentro de la membrana. La viscosidad está determinada por la movilidad de los componentes químicos individuales de la membrana.

A baja temperatura, los fosfolípidos están en un estado gel en que las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos están totalmente extendidas, y las interacciones de van der Waals entre colas adyacentes están maximizadas conduciendo a una estructura rígida, cristalina. A medida que la temperatura aumenta, se produce una transición de fase a un estado cristal-líquido, con un incremento de la fluidez como se muestra en la figura siguiente.

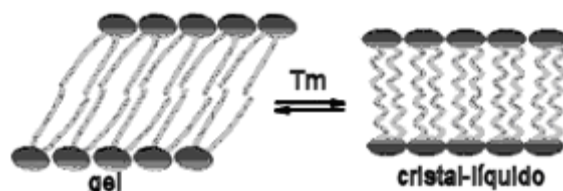


Figura 8. Estructuras gel (rígida) y cristal-líquido (fluida) de la bicapa fosfolipídica.

Los doble enlaces cis de los ácidos grasos, interfieren la transición al estado gel porque impiden que las cadenas alifáticas de las colas de los fosfolípidos se compacten y formen una estructura más rígida, y disminuyen la temperatura de transición de fase (T_m).

El anterior fenómeno, ha sido estudiado en liposomas unilamelares (vesículas esféricas constituidas por una bicapa lipídica que separa el medio externo de un compartimento acuoso interno) preparados a partir de un fosfolípido puro o de una mezcla de ellos. También los liposomas, se han empleado en estudios de transporte biológico aunque limitados por el pequeño tamaño de estas vesículas. Para tal efecto, se incorporan proteínas en los liposomas (proteoliposomas) al momento de prepararlos. Así, los liposomas han sido utilizados como modelos de membrana siendo menos complejo su estudio que el de las propias membranas biológicas.

Otro tipo de preparación de membranas sintéticas o artificiales empleadas han sido las membranas planas ("black lipid membranes") las que se forman al pincelar con una solución de lípido un orificio de 1-2 mm de diámetro existente en un tabique de material hidrofóbico (teflón) que separa dos compartimentos acuosos. Esta técnica se ha empleado en estudios de permeabilidad de dichas membranas, o de la función de canales o proteínas transportadoras incorporadas a estas membranas artificiales.

El interior de una bicapa lipídica de una membrana, es normalmente altamente fluido, ya que los ácidos grasos están a una temperatura sobre sus T_m . En el estado fluido, las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos están desordenadas y en constante movimiento.

Los organismos poiquilotermos o hibernadores y los procariontes pueden regular la composición lipídica, y así la fluidez de la membrana, a fin de responder a cambios de temperatura en el medio externo. El grado de fluidez puede ser controlado en dichos organismos por modificación de: a) la longitud de las cadenas alifáticas de los ácidos grasos; mientras más corta es la cadena menor la T_m y viceversa, y b) la cantidad de doble enlaces presentes en dichas cadenas; la introducción de doble enlace baja la T_m .

Importancia de la fluidez.

Muchos procesos celulares básicos dependen del movimiento de componentes de la membrana, lo que es posible gracias a la fluidez de la membrana. La fluidez permite que ocurran entre otros procesos celulares: el ensamblaje de membranas, la asociación de proteínas de membrana, la unión de ligandos a sus receptores y que se genere la transducción de señales, el funcionamiento correcto de los sistemas de transporte y las enzimas (transducción de energía), la distribución de los lípidos y proteínas de membrana desde sus sitios de síntesis, y la distribución de moléculas de membrana entre células hijas cuando una célula se divide.

Rafts o microdominios lipídicos.

Por muchos años, se asumió que la distribución de los lípidos en las membranas, si bien asimétrica era al azar. Recientes evidencias indican que islas de esfingolípidos y colesterol pueden segregarse de los otros lípidos para formar los "rafts" (balsas) o microdominios lipídicos.

La cara externa del raft consiste principalmente de: esfingolípidos, glicoesfingolípidos y colesterol e influye en la organización de la cara interna que presenta principalmente colesterol y fosfolípidos con ácidos grasos saturados. Debido a que las cadenas alifáticas de sus lípidos son más largas y rectas que la mayoría de los lípidos de membrana, los rafts poseen un mayor grosor y son más ordenados, menos fluidos que los microdominios vecinos ricos en fosfolípidos. Los rafts tienen un tamaño aproximado 50 a 70 nm. Se cree que proteínas ancladas

por GPI y proteínas miristoiladas están asociadas a rafts. Los rafts participarían en: polarización y tráfico de membranas, transducción de señales e infección viral.

A partir de rafts lipídicos por polimerización de caveolina, proteína integral con dos dominios globulares con un dominio hidrofóbico con forma de horquilla que une la proteína a la cara citosólica de la membrana plasmática, se forman las caveolas, pequeñas invaginaciones locales de las membranas plasmáticas de células endoteliales y epiteliales. Tienen un diámetro de 50 a 100 nm. Se relacionan con funciones tales como: endocitosis, transcitosis de albúmina y otras proteínas en endotelios, homeostasis del colesterol y transducción de señales.

Alteraciones patológicas de la composición lipídica y de la fluidez de la membrana.

Hay dos tipos de anomalías reconocidas en los lípidos de membrana y ambos pueden ser atribuidos a causas hereditarias. El primer grupo incluye a la fibrosis quística o cística del páncreas, glicosuria renal, cistinuria y acidosis tubular renal, y el síndrome de Fanconi (disfunción del túbulo proximal renal) entre otras patologías.

El segundo grupo involucra defectos en las enzimas encargadas del metabolismo de esfingolípidos, de las cuales algunas están confinadas principalmente en el sistema nervioso causando neurodegeneración y acortamiento de la expectativa de vida, mientras otras tienen implicancia en una serie de otros tejidos. Las dolencias se caracterizan por una acumulación de esfingolípidos específicos de membrana en el interior de las células; el defecto generalmente radica en la falla del catabolismo (hidrólisis) de los lípidos que tiene lugar en los lisosomas. Se conocen varias enfermedades de este tipo que se manifiestan a menudo en la infancia; Niemann-Pick (esfingomielinosis), Tay-Sachs (gangliosidosis G_{M2}) y Gaucher (cerebrosidosis). Alteraciones del metabolismo de cerebrósido sulfato (Leucodistrofia metacromática) y trihexósido ceramida (enfermedad de Fabry) han sido a su vez documentadas.

Existen anomalías de la fluidez de la membrana en ciertas enfermedades. En la cirrosis hepática provocada por la ingesta de alcohol, los eritrocitos se destruyen prematuramente en el bazo. El contenido de colesterol en

las membranas de los glóbulos rojos está aumentado en 25-65%. También se ha informado que la razón de ácidos grasos insaturados/saturados está disminuida significativamente. Estos cambios pueden afectar la fluidez de la membrana del eritrocito y eventualmente las funciones de la célula. Así, el efecto intoxicante del alcohol en el sistema nervioso puede deberse a la modificación de la fluidez y a la alteración funcional concomitante de receptores y canales ubicados en las membranas.

Individuos con abetalipoproteinemia que presentan falla en el transporte y absorción de lípidos, tienen aumentado el contenido de esfingomielina y disminuido el de fosfatidilcolina en las membranas celulares, lo que produce una modificación de la fluidez de la membrana de los glóbulos rojos (acantocitosis, forma espinada).

Proteínas de membrana.

Todas las membranas celulares poseen la estructura de un bicapa lipídica, sin embargo, mucha de las funciones claves de una membrana son debidas a las proteínas que la atraviesan o que se asocian con ella.

Todas las membranas biológicas contienen proteínas cuyas propiedades dependen del tipo de célula y de la localización subcelular.

El tipo y cantidad de proteínas que componen las membranas es muy variable. Por ejemplo, la membrana mitocondrial interna contiene poco más de 70% de proteínas y la mielina sólo 18%. El alto contenido de lípido de la mielina posibilita que aisle eléctricamente a una neurona de su medio ambiente.

En una membrana que contiene un 50% de proteínas y ya que las proteínas son mucho más grandes que los lípidos, hay 50 a 100 moléculas de fosfolípidos por molécula de proteína. Las proteínas de membrana son principalmente glicoproteínas.

Asociación de las proteínas a las membranas biológicas.

Las proteínas de membrana pueden clasificarse de acuerdo a sus interacciones con las membranas en: integrales o intrínsecas, periféricas o extrínsecas y unidas o ancladas por lípidos (Figura 9).

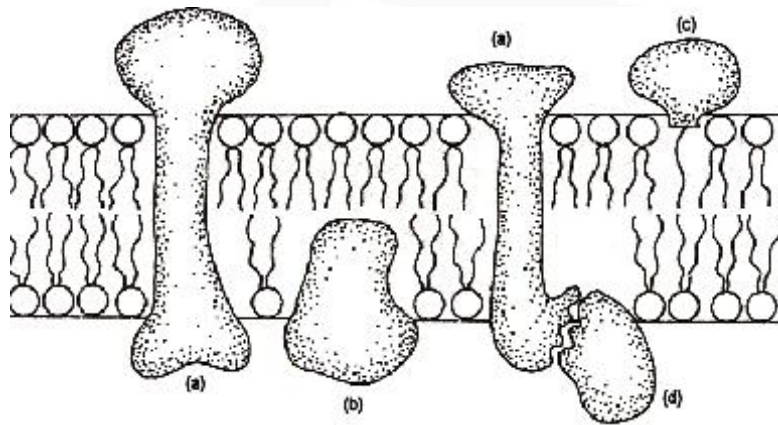


Figura 9. Tipos de proteínas de membrana.

Proteínas integrales.

Las proteínas integrales, requieren detergente a fin de ser extraídas desde las membranas. Lo anterior pone de manifiesto que la interacción de las proteínas integrales con la bicapa lipídica es de tipo hidrofóbico (Figura 9a).

La inserción de proteínas integrales en el interior apolar de la bicapa, se pudo visualizar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de superficies de fractura por congelamiento o criofractura ("freeze-fracture"). En esta técnica la membrana en estudio es congelada rápidamente a -196°C y luego es fracturada con una cuchilla de ultramicrotomo. La fractura ocurre por la parte central de la bicapa, separándose en las dos monocapas constituyentes con sus superficies hidrofóbicas expuestas. Al observar al TEM, réplicas metálicas de las superficies, se aprecian en ellas partículas de 5-10 nm de diámetro, que corresponden a proteínas integrales que penetran la bicapa. En general, las superficies expuestas de una misma membrana difieren en el número y tamaño de

las partículas, lo que significa que las proteínas integrales no tienen una distribución simétrica en las membranas. Al observar preparaciones de bicapas lipídicas, éstas muestran sólo superficies de criofractura lisas.

Una proteína integral unipaso, atraviesa la bicapa con un dominio hidrofóbico interior, formado por alrededor de 20 residuos de aminoácidos generalmente apolares, y con dominios extracelular y citoplasmático hidrofílicos, de tamaño variable dependiendo de la función de la proteína, hacia las fases acuosas.

La glicoforina A, glicoproteína de la membrana del eritrocito, fue la primera proteína de esta clase en la que se demostró por métodos químicos que atraviesa una vez la bicapa. Esta proteína integral presenta: a) un dominio N-terminal hidrofílico en el lado externo de la membrana, que consta de 72 residuos de aminoácidos y de 16 cadenas de oligosacáridos (~60% de la masa molecular), b) un dominio hidrofílico de 40 residuos de aminoácidos en el lado citosólico, con numerosos residuos de aminoácidos con carga eléctrica y el extremo C-terminal, y c) un segmento hidrofóbico de 19 residuos de aminoácidos que atraviesa la bicapa. Un aspecto destacable en esta glicoproteína es la presencia de ácido siálico y por tanto de carga negativa en el extremo de cada cadena de oligosacárido las que pueden permitir a los eritrocitos repelerse unos a otros y prevenir el agrupamiento de los mismos cuando circulan por vasos finos.

Otras proteínas transmembránicas (canales y transportadores) atraviesan varias veces la bicapa. Por ejemplo, los transportadores de glucosa atraviesan 12 veces la membrana. Un tipo importante de receptores hormonales (receptor acoplado a proteína G) atraviesan la membrana 7 veces.

Algunas proteínas integrales están inmersas (alfa hélices hidrofóbicas) sólo parcialmente en la bicapa (Figura 9b), por años se creyó que este tipo de proteína no existía, pero la melitina (veneno de abeja) y la prostanglandina H₂ sintasa comprueban lo contrario.

Muchas proteínas transmembránicas, se asocian a otras proteínas transmembránicas para formar dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. Por ejemplo, receptores para proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina y lamininas) son conocidas como integrinas, proteínas heterodiméricas con una

subunidad alfa y una beta, cada una de las cuales atraviesa la membrana sólo una vez. Las subunidades se mantienen unidas por interacciones no covalentes.

Además de unirse entre sí y con otros componentes de la membrana, las proteínas pueden unirse a proteínas del citoplasma que las anclan a los microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios o forman parte de alguna cadena de transducción de señales. Análogamente, hay proteínas que reconocen y se unen a componentes de la matriz extracelular, o forman estructuras que les permiten asociarse a células vecinas, como es el caso de los desmosomas, uniones oclusivas y uniones comunicantes.

La región de la proteína que atraviesa la membrana es en la mayoría de los casos una α -hélice, pero en otros como el de las porinas de la membrana externa de bacterias Gram negativa (*E. Coli*) y las porinas de la membrana mitocondrial externa es un barril β , en el cual 8-22 hojas beta antiparalelas conforman una estructura cilíndrica en forma de barril. Estas estructuras, presentan poros centrales que permiten el transporte de pequeñas moléculas hidrofílicas que incluyen nutrientes y productos de deshecho. No todos los barriles beta son proteínas de transporte. Algunas de estas últimas proteínas de bacterias funcionan como receptores o enzimas.

Las mismas fuerzas termodinámicas que favorecen la formación de una α -hélice en el interior apolar de una bicapa lipídica estabilizan también los barriles beta. En estos barriles β de membrana, cada hoja beta está unida rígidamente a sus vecinas por uniones hidrógeno, de manera que es improbable que ocurran cambios conformacionales como sucede en las α -hélices de proteínas de membrana.

Proteínas periféricas.

Las proteínas periféricas (Figura 9d), pueden ser extraídas desde las membranas por tratamientos suaves como soluciones de alta fuerza iónica o con tampones de alto o bajo pH. Al removerlas o solubilizarlas, no se altera la estructura de las bicapas lipídicas.

Este tipo de proteínas de membrana, están asociadas con la membrana a través de interacciones débiles no covalentes: puentes salinos e interacciones electrostáticas. Aunque los puntos de interacción podrían ser las cabezas polares de los fosfolípidos, las proteínas periféricas suelen estar unidas específicamente a determinadas proteínas integrales por interacciones no covalentes. Es el caso de la ankirina unida al canal aniónico presente en eritrocitos.

Fosfolípidos de membranas cargados negativamente (PS) pueden interactuar con regiones positivas de proteínas, permitiendo una interacción electrostática entre ellas que mantiene unida dichas proteínas a la bicapa lipídica.

Numerosas proteínas periféricas, se unen a los dominios citoplasmáticos de proteínas integrales de membrana, tales como las cateninas unidas a proteínas transmembránicas de adhesión llamadas cadherinas. Estas interacciones proteína-proteína anclan el citoesqueleto a proteínas transmembránicas de adhesión.

Las interacciones proteína-proteína, también proporcionan un modo de transmitir información a través de una membrana. La unión de un ligando al dominio extracelular de un receptor transmembránico puede cambiar la conformación de su dominio citoplasmático, propiciando interacciones con proteínas citoplasmáticas las que transmiten a su vez señales intracelulares.

Proteínas ancladas por lípidos.

En las células eucariontes, existen proteínas que tienen uno o más lípidos de diferentes tipos unidos a ellas covalentemente. Estos lípidos proporcionan una ancla hidrofóbica que se inserta en la bicapa lipídica y mantiene a estas proteínas unidas a una u otra superficie de la membrana plasmática y a ciertas otras membranas celulares (Figura 9c).

Las proteínas de membrana, pueden estar asociadas a la cara citosólica de una membrana a través de simple cadena alifática de ácido mirístico (14:0) que es unido postraduccionalmente al grupo amino de un residuo de glicina del extremo N-terminal del polipéptido como ocurre en la proteína tirosina quinasa Src (sarcoma de Rous) y otras proteínas que participan en señalización celular o a

través de ácido palmítico (16:0) unido vía enlace tioéster a un residuo interno de cisterna de la proteína (Figura 10b).

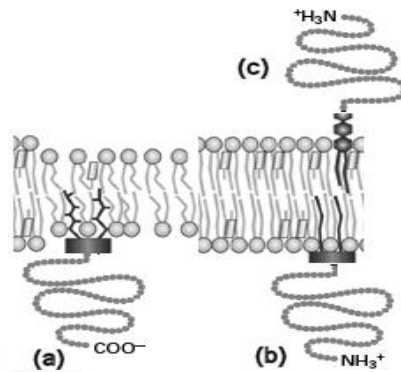


Figura 10. Proteínas de membrana ancladas a la bicapa.

Un segundo grupo de proteínas citosólicas está asociada a membranas por un grupo prenilo (farnesil de 15 átomos de carbono o geranilgeranil de 20 átomos de carbono) que es añadido postraduccionalmente a través de un enlace tioéster al grupo -SH de un residuo de cisteína del extremo C-terminal (Figura 10a). En algunos casos, un segundo grupo geranilgeranil o un grupo palmitato está unido a un residuo cisteína vecino reforzando la unión a la membrana (proteína Ras). Las proteínas ancladas por estas cadenas alifáticas están localizadas en la superficie interna de la membrana plasmática.

Algunas proteínas de la superficie celular y proteoglicanos altamente glicosilados de la matriz extracelular están unidas a la superficie externa de la membrana plasmática por un tercer tipo de grupo de anclaje, un “linker” oligosacárido, GPI (glicosilfosfatidilinositol).

Las anclas de GPI son derivados del fosfatidilinositol, el cual está inmerso en la bicapa mediante sus dos cadenas alifáticas, y lleva una corta cadena oligosacárida unida covalentemente al residuo carboxi terminal de una proteína a través de fosfoetanolamina (Figura 10c).

Las proteínas ancladas por GPI están siempre en la cara extracelular de la membrana plasmática. El antígeno de superficie Thy-1 (linfocitos T), proteínas de

adhesión (T-cadherina) y varias enzimas (fosfatasa alcalina, acetilcolinoesterasa, 5'-nucleotidasa) son algunos ejemplos de este tipo de proteína de membrana.

La fosfatasa alcalina placentar está concentrada en rafts lipídicos. Aunque como ya se indicó, esta última proteína y otras ancladas por GPI se ubican en la cara opuesta de la membrana a la que se asocian las proteínas ancladas por grupos acilos, ambos tipos de proteínas se encuentran en los microdominios lipídicos. Por contraste, las proteínas ancladas por grupos prenilados no se hallan concentradas en rafts (Figura 10a).

Investigaciones recientes, han indicado que la asociación de las proteínas con membranas puede ser compleja y la definición entre proteínas integrales y periféricas de membrana ha llegado a ser confuso en ciertos casos, tales como aquellas que están unidas a las membranas por tallos o anclas lipídicas. Aquí, este último tipo de proteínas serán consideradas como proteínas integrales de membrana, aunque hay que señalar de igual forma que en algunos textos son consideradas como proteínas periféricas de membrana.

Funciones de las Proteínas de Membrana.

La fisiología celular, se sustenta fundamentalmente en las proteínas de membrana. Las proteínas de membrana son diferentes y características de cada tipo celular y tipo de membrana. Realizan numerosas funciones en las membranas, entre ellas se pueden citar:

Estructural. Las células poseen un citoesqueleto de naturaleza proteica que constituye un almacén alrededor del cual se organizan todos sus componentes, y que dirige fenómenos tan importantes como el transporte intracelular o la división celular. En los tejidos de sostén (conjuntivo, óseo, cartilaginoso) de los vertebrados, las fibras de colágeno forman parte importante de la matriz extracelular y son las encargadas de conferir resistencia mecánica tanto a la tracción como a la compresión.

Transporte. Lo realizan proteínas, generalmente integrales, cuya función es la translocación (cambio de lugar) de moléculas a través de la membrana desde un compartimiento a otro. El transporte de solutos, es realizado por

transportadores, bombas y canales. Por ejemplo, aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas ingresan a las células mediante transportadores. A menudo el transporte ocurre desde una región donde el soluto está presente a más baja concentración a una región donde está a mayor concentración. Este tipo de transporte necesita de energía metabólica.

Recepción de señales externas (transducción de señales). Efectuada por proteínas, generalmente integrales, llamadas receptores que reconocen moléculas (ligandos) específicas (factores de crecimiento, neurotransmisores) y hormonas que no pueden penetrar la bicapa lipídica y transmiten dichas señales a través de las membranas provocando estimulación o inhibición de actividades celulares internas.

Por ejemplo, la hormona antidiurética o vasopresina, se une a receptores ubicados en los riñones y modifica la permeabilidad de las membranas plasmáticas al agua aumentando su reabsorción.

Catálisis. Proteínas, tanto integrales como periféricas, que catalizan reacciones en el interior o exterior celular. Por ejemplo, lactasa presente en la membrana plasmática de las células epiteliales intestinales hidroliza lactosa.

Unión célula-célula. La adhesión célula-célula en uniones adherentes y desmosomas, está mediada por proteínas de adhesión transmembránicas específicas pertenecientes a la familia de cadherinas.

Unión célula-matriz. Interacciones célula-matriz (adhesiones focales y hemidesmosomas) son mediadas por proteínas integrales de membrana heterodiméricas (familia de integrinas).

Reconocimiento y adhesión celular. Glicoproteínas transmembránicas llamadas CAM (moléculas de adhesión celular), participan en el reconocimiento y adhesión celular que ocurre en la formación de algunos tejidos epiteliales durante el desarrollo embrionario antes de formar uniones estables (oclusivas, anclantes y comunicantes).

Anclajes del citoesqueleto. Proteínas periféricas situadas en la región citoplasmática de la membrana y que sirven de punto de unión o anclaje para los filamentos del citoesqueleto.

Marcadores de identidad de la célula. Glicolípidos y glicoproteínas característicos de cada individuo y que sirven de reconocimiento para células procedentes de otro individuo. Las cadenas de carbohidratos procedentes, tanto de los glicolípidos, como de las glicoproteínas dan lugar a una especie de cubierta denominada glicocáliz. Una clase importante de tales marcadores de identidad son los antígenos mayores de histocompatibilidad.

Funciones reguladoras. Muchas proteínas se unen al ADN y de esta forma controlan la transcripción génica. De esta forma el organismo se asegura que la célula, en todo momento, tenga todas las proteínas necesarias para desempeñar normalmente sus funciones. Las distintas fases del ciclo celular son el resultado de un complejo mecanismo de regulación desempeñado por proteínas como son las ciclinas.

Movimiento. Todas las funciones de motilidad de los seres vivos están relacionadas con las proteínas. Así, la contracción del músculo resulta de la interacción entre dos proteínas, la actina y la miosina. El movimiento de la célula mediante cilios y flagelos está relacionado con las proteínas que forman los microtúbulos.

Defensa. La propiedad fundamental de los mecanismos de defensa es la de discriminar lo propio de lo extraño. En los vertebrados superiores, las inmunoglobulinas se encargan de reconocer moléculas u organismos extraños y se unen a ellos para facilitar su destrucción por las células del sistema inmunitario.

Otras funciones. Los fenómenos de transducción (cambio en la naturaleza físico-química de señales) están mediados por proteínas. Así, durante el proceso de la visión, la rodopsina de la retina convierte (o mejor dicho, transduce) un fotón luminoso (una señal física) en un impulso nervioso (una señal eléctrica).

Las proteínas de membrana difunden lateralmente en la bicapa.

El experimento de L. D. Frye y M. Edidin (1970), demostró que las proteínas difundían lateralmente en las membranas (Figura 11). En este experimento realizado a 37°C, se indujo la fusión de células humanas y de ratón con ayuda del virus Sendai inactivado, obteniéndose una célula híbrida, heterocarión (célula con dos núcleos). Se preparó anticuerpos contra las proteínas de membrana de ambos tipos celulares y se le unieron covalentemente sustancias fluorescentes. Los anticuerpos contra proteínas humanas fueron marcados con rodamina (de color rojo) y los anticuerpos contra proteínas de ratón marcados con fluoresceína (de color verde). Los anticuerpos, se agregaron a las células fusionadas.

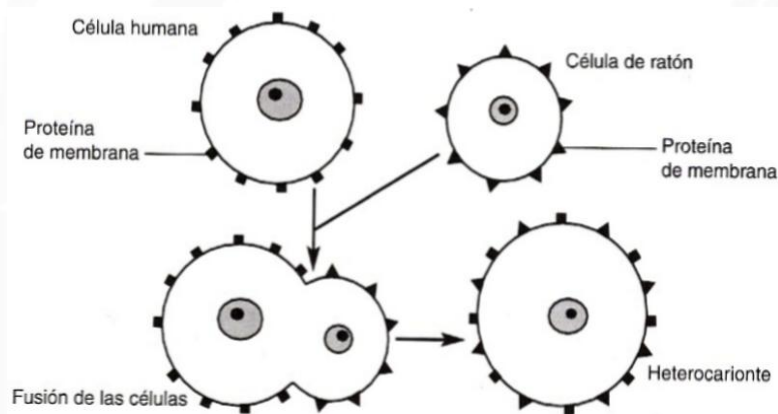


Figura 11. Movilidad lateral de proteínas de membrana evidenciada por experimento de fusión celular.

Mediante microscopía de fluorescencia, se observó a tiempo cero que la membrana plasmática del heterocarión aparecía mitad roja y mitad verde, esto es, los dos tipos de proteínas estaban segregados en las dos mitades del heterocarión. Al cabo de 40 minutos las proteínas de membrana del heterocarión, se habían entremezclado completamente.

El agregado de inhibidores del metabolismo o de síntesis de proteínas no afectó este proceso, pero si lo hizo la disminución de la temperatura por debajo de

15 °C. Lo anterior, señala que las proteínas de membrana habían difundido en el plano de la membrana, en un evento independiente de energía metabólica y de la inserción en la membrana de proteínas recién sintetizadas.

El anterior experimento, mostró que aparentemente las proteínas pueden difundir en el plano de la membrana sin restricción, pero, actualmente se sabe que su movimiento puede estar restringido por razones funcionales.

Entre el 30 y 90% de todas las proteínas integrales de membrana son libremente móviles, dependiendo del tipo celular. Algunas proteínas integrales están unidas permanentemente al citoesqueleto subyacente; estas proteínas son totalmente inmóviles en la membrana.

Las células presentan dominios específicos en las membranas.

La restricción de proteínas a una parte de la membrana constituye un dominio (en células funcionalmente especializadas). Los dominios de membrana son cruciales para las funciones de células polarizadas como las células epiteliales.

Las células epiteliales alineadas en la pared intestinal o que constituyen los túbulos microscópicos del riñón son células altamente polarizadas cuyas diferentes superficies (apical y basal) llevan a cabo funciones distintas (Figura 12).

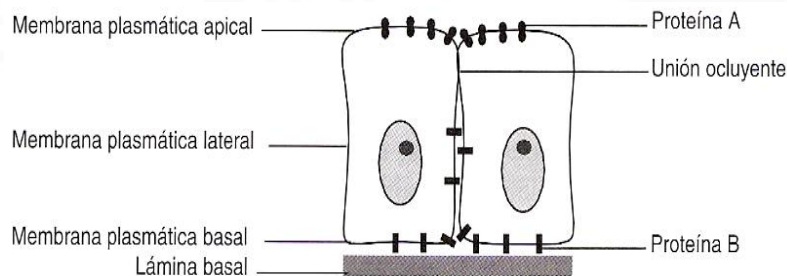


Figura 12. Dominios en membranas de células epiteliales.

Así, existe evidencia que la membrana plasmática apical de células epiteliales intestinales posee proteínas integrales que funcionan como transportadores de solutos orgánicos (azúcares y aminoácidos) y otras como enzimas (por ejemplo, disacaridasas); la membrana lateral y la membrana basal de células epiteliales del intestino tienen bombas que mueven iones a través de ellas. También dicha membrana basal, posee proteínas transportadoras que translocan azúcares hacia el torrente sanguíneo diferentes a las presentes en la membrana apical.

La organización polarizada, depende de las uniones que las células epiteliales establecen unas con otras. Los dominios son creados por las uniones ocluyentes que las células epiteliales establecen con las vecinas.

Las membranas son estructuras asimétricas.

Las membranas biológicas son estructuralmente y funcionalmente asimétricas. Dependiendo del tipo celular y del organelo particular en la célula, una membrana contiene cientos de diferentes proteínas.

Los nexos, uniones oclusivas y sinapsis, ocupan regiones más reducidas de la membrana y generan asimetrías locales más pequeñas.

Asimetría de las proteínas.

Cada proteína de membrana presenta una topología definida relativa al citosol, de modo que las propiedades de una superficie de la membrana son muy diferentes a las de la otra superficie. Esta asimetría ha sido llamada "lateralidad" de la membrana.

Las superficies interna y externa de todas las membranas biológicas conocidas tienen diferentes componentes y diferentes actividades enzimáticas. Un claro ejemplo de lo anterior es la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que regula la concentración de Na^+ y K^+ en las células. Esta proteína de transporte está localizada en la membrana plasmática de casi todas las células en organismos superiores. La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ está orientada de modo tal que bombea activamente Na^+ hacia

fuera de la célula y K^+ hacia el interior. Además, el ATP debe estar en el interior celular para impulsar la bomba.

La ouabaína, un inhibidor potente y específico de esta bomba es efectivo sólo si actúa externamente.

En general, los dominios de las proteínas expuestos en una cara de la bicapa son diferentes de aquellos expuestos en la otra cara, reflejando una asimetría funcional como sucede con las proteínas transmembránicas que atraviesan la bicapa con orientaciones específicas: receptores, transportadores, canales.

Las proteínas de membrana tienen una orientación única porque ellas son sintetizadas e insertadas en la membrana de una forma asimétrica. Esta asimetría absoluta es preservada porque las proteínas de membrana no rotan desde un lado de la membrana al otro y porque las membranas son siempre sintetizadas por el crecimiento de membranas preexistentes.

Además, enzimas específicas están exclusivamente en el exterior o interior de las membranas, como en las membranas mitocondriales y las plasmáticas.

Asimetría lipídica.

Una característica de las membranas es la asimetría en la composición de lípidos de la bicapa. Aunque la mayoría de los fosfolípidos están presentes en ambas monocapas, ellos son normalmente más abundantes en una u otra superficie de las membranas. La asimetría de las bicapas lipídicas es consecuencia de su modo de biosíntesis, pero esta asimetría no es absoluta, excepto para los glicolípidos.

En la membrana plasmática de los eritrocitos, los fosfolípidos que poseen un grupo colina (SM y PC), se encuentran predominantemente en la monocapa externa y los lípidos con grupos amino (PS y PE), se encuentran en la cara citosólica. También el fosfatidilinositol, se halla en la cara citosólica de la

membrana plasmática. Grandes cantidades de colesterol, se hallan presentes en ambas monocapas de membranas plasmáticas.

Ya se señaló que formas fosforiladas del fosfatidilinositol unidas a la cara citosólica de la membrana plasmática, por ejemplo, PI(4)P y PI(4,5)P₂, participan en vías de señalización intracelular.

Fosfatidilserina, más abundante en la cara citosólica, es translocada a la cara extracelular por acción probablemente de una flipasa, en aquellas células que van a experimentar muerte celular programada o apoptosis. La fosfatilserina expuesta en la superficie celular sirve como señal para que macrófagos fagociten linfocitos viejos, mientras su aparición en la superficie externa de plaquetas lleva a la coagulación sanguínea.

En las bicapas constituidas de fosfolípidos puros, éstos no difunden de una monocapa a otra (flip-flop). En las membranas naturales, la difusión transversal o flip-flop es catalizada por flipasas, como ya se mencionó anteriormente.

Asimetría de carbohidratos.

Una asimetría interior-exterior es proporcionada por la ubicación de carbohidratos unidos a proteínas y lípidos de membrana. Las cadenas de carbohidratos de los glicolípidos y glicoproteínas, se ubican en la superficie externa de la membrana plasmática.

Hay también asimetrías regionales en las membranas como las de las células mucosales intestinales. En las membranas plasmáticas de las células epiteliales, los glicolípidos están confinados a la superficie apical expuesta, donde estas moléculas pueden ayudar en la protección de la membrana contra las difíciles condiciones que presenta esta zona (bajo pH y enzimas degradativas).

Los carbohidratos de membranas están presentes en glicolípidos y glicoproteínas.

Los hidratos de carbono presentes en las membranas varían de especie a especie, entre individuos de la misma especie y entre células del mismo individuo.

Dependiendo del tipo celular, el contenido de carbohidrato de las membranas va de 2 a 10%. Más del 90% de los hidratos de carbono de membrana están unidos covalentemente a proteínas formando glicoproteínas (mucoproteínas); el resto de los azúcares están covalentemente unidos a lípidos constituyendo los glicolípidos.

Las glicoproteínas de membrana pueden contener oligosacáridos o bien polisacáridos. Los oligosacáridos están unidos a las proteínas como ya se ha indicado antes por medio de enlaces covalentes N-glicosídicos o bien O-glicosídicos.

Los polisacáridos unidos covalentemente a proteínas son glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos, polisacáridos largos, lineales y altamente cargados compuestos por una sucesión de una misma unidad disacárido en la que uno de los monómeros es siempre es un aminoazúcar y el otro un ácido glucorónico, un ácido idurónico o una galactosa) y constituyen las glioproteínas complejas denominadas proteoglicanos. Estas moléculas prevalecen en el medio extracelular.

Los proteoglicanos son los principales componentes del tejido conectivo y participan con otras proteínas estructurales, colágeno y elastina, en la organización de la matriz extracelular.

Las glicoproteínas tienen dominios de secuencias hidrofílicas e hidrofóbicas. Son moléculas anfipáticas.

Las glicoproteínas y glicolípidos son especialmente abundantes en la membrana plasmática de células eucarióticas y se ubican en la cara no citosólica de la membrana celular.

La membrana que cubre las microvellosidades, es altamente especializada, y presenta una gruesa cubierta extracelular, rica en polisacáridos, denominada cubierta celular o glicocáliz (Figura 13).

En el caso del epitelio intestinal, algunas glicoproteínas, que forman parte del glicocáliz, corresponden a disacaridasas y a γ -glutamyltranspeptidasas, enzimas que participan en el proceso digestivo. Además, en muchas células contribuyen a esta estructura glicoproteínas y proteoglicanos adsorbidos a la superficie celular y que se han secretado al espacio extracelular.

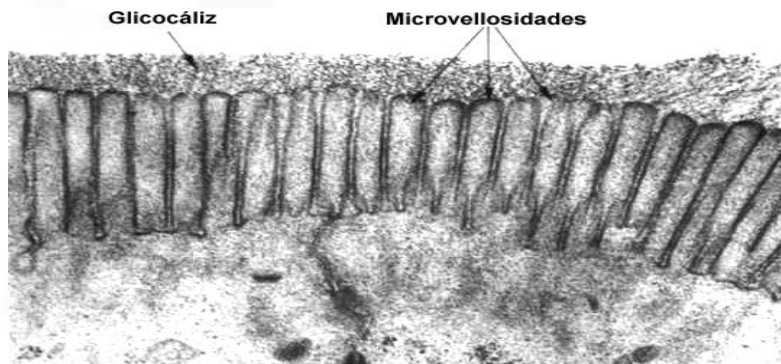


Figura 13. Glicocáliz de microvellosidades de células epiteliales intestinales visualizada por microscopía electrónica de transmisión.

Una de las funciones relevantes del glicocáliz es proteger a la superficie de las células de agresiones químicas y mecánicas. Así, en el caso de las células ubicadas en la superficie de la mucosa intestinal, su cubierta celular las protege del contacto con los alimentos y de la acción de las enzimas digestivas.

La presencia de ácido siálico en las cadenas de oligosacáridos de los glicolípidos, proporciona a pH fisiológico una carga negativa neta a la superficie de la célula. Esta carga eléctrica atrae a los cationes del líquido extracelular los que quedan retenidos en la cara no citosólica de la membrana celular.

Las cadenas de carbohidratos de glicolípidos y glicoproteínas, permiten el reconocimiento celular. Lo anterior es posible debido a la diversidad que tienen estas cadenas, las que pueden variar en el número de azúcares (de 15 a varios

cientos), en su ramificación y en sus secuencias de azúcares. Además, los glicolípidos y las glicoproteínas varían de especie a especie, de individuo a individuo de la misma especie, y aún de célula a célula del mismo individuo.

El rechazo de tejidos transplantados por nuestro sistema inmune es debido al reconocimiento de glicolípidos y glicoproteínas únicos.

Funciones de los hidratos de carbono de membranas.

Las glicoproteínas tienen una importante participación en: reacciones antígeno-anticuerpo, función hormonal, catálisis enzimática, fertilización. También los oligosacáridos del glicocáliz sirven como marcadores para una variedad de interacciones célula-célula.

Un ejemplo de interacciones célula-célula es la adhesión de leucocitos (neutrófilos) circulantes a las células endoteliales de vasos sanguíneos en la respuesta inflamatoria de tejidos injuriados. El paso inicial es una débil y reversible adhesión entre ligandos glicoproteicos (receptores) para selectinas que se hallan en la superficie del leucocito y selectinas (glicoproteínas que contienen un dominio lectina que se une específicamente a un ordenamiento particular de azúcares en un oligosacárido) ubicadas en la membrana plasmática de células endoteliales del área dañada. Cuando los neutrófilos encuentran las selectinas de las células endoteliales, ellos forman adhesiones transitorias que enlentecen dramáticamente su movimiento a través del vaso sanguíneo. Mientras estas interacciones tienen lugar, se produce un proceso de activación de integrinas de la superficie del neutrófilo, gatillado por varios agentes (incluyendo el factor de activación de plaquetas liberado por el endotelio), las cuales se unen con alta afinidad a ICAMs (moléculas de adhesión intercelular) de la superficie de la célula endotelial provocando la detención del movimiento de los neutrófilos y la fuerte adhesión de ellos al vaso sanguíneo, iniciando el proceso de extravasación en el tejido dañado.

Debido a que las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos en la membrana celular se proyectan hacia el espacio extracelular, ellas pueden interactuar con componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento y anticuerpos.

La especificidad de los grupos sanguíneos ABO humanos es establecida por componentes oligosacáridos de ciertas glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de los eritrocitos. La porción carbohidrato de estas moléculas, la cual constituye el determinante antigénico, está genéticamente determinado en los humanos y otros animales.

En la interacción célula-célula, el rol de las glicoproteínas es la coordinación y la regulación de adhesión, crecimiento, diferenciación celular, y tamaño de las células. La alteración de estos procesos puede conducir a la pérdida del control de la división celular y del crecimiento, propiedad característica de células cancerosas.

Se cree que alteraciones en la estructura de glicoproteínas y otros glicoconjugados en la superficie de células cancerosas son importantes en el fenómeno de metástasis en que células cancerosas dejan su tejido de origen (por ejemplo, mama), y migran por el torrente sanguíneo a un sitio distante en el cuerpo (por ejemplo, cerebro), y crecen de una manera no regulada, con resultados catastróficos para el individuo afectado.

Modelos de la Membrana Plasmática.

Los primeros indicios acerca de la naturaleza química de la membrana celular los obtuvo Overton en 1925. Este investigador, observó que aquellos solutos solubles en lípidos atravesaban más rápidamente las membranas plasmáticas que los no solubles.

Los primeros modelos de estructura de membrana incorporaron una bicapa lipídica como el rasgo estructural sobresaliente. La evidencia para estos modelos, provino de experimentos realizados en fantasmas de eritrocitos por Gorter y Grendel en 1925. En esa misma época, se realizaron estudios que mostraban que la solubilidad en lípidos no era el único factor determinante en el paso de solutos a través de las membranas, así mismo mediciones de las tensiones superficiales en estructuras lipídicas indicaban la probable presencia de proteínas en las membranas.

En 1935, Danielli y Dawson propusieron un modelo en el cual se incorporaban proteínas. La membrana celular estaba constituida por una bicapa lipídica emparedada entre dos capas de proteínas globulares. Posteriormente en 1954, estos investigadores modificaron el anterior modelo incorporando poros constituidos por proteínas que se extendían a través de la membrana para dar cuenta de la permeabilidad selectiva de las membranas que ellos habían estudiado. Estos modelos proponían membranas simétricas.

Este modelo fue después modificado por Robertson en 1959 a la luz de nueva información, especialmente relacionadas con aspectos ultraestructurales de membranas que él estudió al microscopio electrónico de transmisión. La mayoría de esos estudios fueron en membranas plasmáticas de mielina pero el modelo propuesto, habitualmente denominado como hipótesis de la membrana unitaria, fue sugerido como la estructura básica de todas las membranas celulares. En este modelo, las proteínas que cubren las superficies de la bicapa lipídica tienen una estructura β extendida más que una configuración globular, y están asimétricamente distribuidas en la membrana.

A pesar del efecto unificador de la hipótesis de Robertson, surgieron ciertas inconsistencias como que cada membrana de los organelos tenía su propia función particular. La pregunta que surgió en ese momento fue: ¿cómo las membranas pueden variar en función si todas ellas tienen la misma estructura? También se realizaron observaciones que mostraban variaciones en el espesor de las membranas y que ponían en duda la generalización hecha por Robertson.

Al inicio de la década del 70, dos enfoques experimentales complementarios demostraron que las proteínas atraviesan la bicapa lipídica. Primero, como ya se mencionó, micrografías electrónicas de membranas congeladas y fracturadas en dos mediante un cuchillo (técnica denominada criofractura), mostraron proteínas embebidas en la bicapa lipídica. Segundo, el marcaje químico de las proteínas de membrana mostró que muchas atraviesan la bicapa, exponiendo diferentes partes del polipéptido a la fase acuosa en ambos lados. La microscopía fluorescente usando etiquetas ("tags") fluorescentes demostró que los lípidos de membrana y algunas proteínas de membrana difunden en el plano de la membrana. Estudios espectroscópicos cuantitativos mostraron que la difusión lateral de lípidos es un proceso rápido, pero la difusión transversal es lenta. Esta información fue incorporada en 1972 por S. Jonathan

Singer y Garth Nicholson en su modelo de “Mosaico Fluido” (Figura 14) para la estructura de las membranas biológicas.

El modelo de mosaico fluido, es hasta ahora aceptado generalmente como el modelo de organización estructural de todas las membranas biológicas.

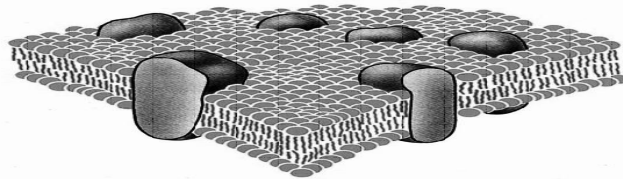


Figura 14. Modelo de mosaico fluido.

En este modelo de membrana, se propone que el elemento estructural fundamental de las membranas biológicas es una bicapa lipídica continua formada por fosfolípidos, la cual aparece interrumpida por proteínas inmersas en ella mantenidas por interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de membrana y los dominios hidrofóbicos en las proteínas.

La bicapa lipídica, es de carácter Fluido debido a que la mayoría de las interacciones de sus componentes son no covalentes, lo que permite tanto a los lípidos como a las proteínas de las membranas difundir lateralmente, conservando su orientación con respecto al plano de la bicapa.

Las proteínas que median la mayoría de las funciones de la membrana forman un Mosaico que es libre de cambiar constantemente. Algunas proteínas emergen sólo a un lado de la membrana; otras tienen dominios expuestos a ambos lados de la membrana.

El modelo de mosaico fluido de las membranas, ha probado ser una muy útil hipótesis para explicar muchos, pero ciertamente no todos los fenómenos que tienen lugar en las membranas biológicas.

Nuevos datos experimentales muestran que la compartimentación de los componentes de membrana puede ser tan importante para una efectiva transducción de señales como es la fluidez de la membrana.

Técnicas actuales muestran por ejemplo que hay proteínas de membrana que difunden de una forma compleja que indica que hay una considerable heterogeneidad lateral en la estructura de las membranas, otras están confinadas, al menos transientemente, a pequeños dominios, y unas pocas proteínas de membrana experimentan un rápido transporte hacia el borde celular, quizás impulsadas por proteínas motoras. Todo lo anterior, ha hecho necesario la revisión del modelo de membrana elaborado por Singer y colaboradores.

Dinámica de las membranas.

En este contexto el término dinámica es usado para describir el hecho que la estructura de la membrana cambia en el tiempo.

Las membranas y sus componentes son estructuras dinámicas. Los lípidos y proteínas en membranas tienen un recambio tal como sucede en otros compartimientos de la célula. Lípidos distintos presentan diversas velocidades de recambio y las velocidades de especies individuales de proteínas de membrana pueden variar ampliamente.

En tiempos cortos (horas), esta capacidad para el cambio puede visualizarse por las modificaciones en la posición de moléculas individuales dentro de la membrana como resultado de su energía cinética y de la naturaleza fluida de las membranas.

En tiempos largos (días), estos cambios pueden implicar significativas modificaciones en los componentes de las membranas. Por ejemplo, la introducción de más colesterol al inicio del invierno (variaciones estacionales o geográficas), o el cambio en las clases de proteínas de membrana que afectan las propiedades de intercambio de las membranas.

Los procesos principales responsables para estos cambios son la endocitosis y la exocitosis. La parte de la célula que está más directamente

implicada en estos procesos es el sistema de endomembranas con vesículas responsables de añadir/remover partes de la membrana.

Resumen.

- Las membranas son estructuras complejas y dinámicas que establecen límites cerrados entre diferentes compartimientos. El espesor de la mayoría de las membranas es de 6 a 10 nm.
- Las membranas están compuestas principalmente de lípidos y proteínas. La razón lípido/proteína varía de 1:4 a 4:1. Dicha variación depende del tipo de membrana, del tipo de organismo y del tipo de célula.
- Las membranas también contienen carbohidratos que forman parte de glicolípidos y glicoproteínas.
- La composición en lípidos y proteínas varía de una membrana a otra. Los componentes lipídicos principales de las membranas animales son fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol.
- Los lípidos de membrana son moléculas relativamente pequeñas que poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas – moléculas anfipáticas. Forman espontáneamente capas bimoleculares cerradas en medio acuoso.
- Las bicapas lipídicas son barreras al flujo de moléculas polares con carga o sin carga.
- Las diferentes membranas tienen proteínas específicas que son responsables principales de las distintas funciones de las membranas. Funcionan como transportadores, bombas, canales, receptores, enzimas, transductores de información y energía. Estas proteínas están inmersas en las bicapas lipídicas que proporcionan un microambiente adecuado para su funcionamiento.
- Las membranas presentan proteínas integrales y periféricas. Algunas proteínas están unidas a lípidos de cadena larga que las anclan a una u otra superficie de la membrana.
- Las membranas son ensamblajes no covalentes. Las proteínas y lípidos que las componen, se mantienen unidos por numerosas interacciones no covalentes, las cuales son de carácter cooperativo.
- Las membranas son altamente asimétricas. Las dos caras de las membranas biológicas siempre difieren en composición una de otra.
- Las membranas son estructuras fluidas. Los lípidos difunden lateralmente en las membranas, al igual que numerosas proteínas.

- La mayoría de las membranas celulares están polarizadas eléctricamente, el interior es negativo. El potencial de membrana juega un rol protagónico en el transporte de moléculas con carga eléctrica (iones), conversión de energía y excitabilidad celular.

Bibliografía

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. "Biología Molecular de la Célula". Ediciones Omega, Barcelona. 4ª edición. 2003.

Cooper, G. M. "La Célula". Editorial Marbán, Madrid. 2ª edición. 2002.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. "Biología Celular y Molecular". Editorial Panamericana. 4ª edición, 2002.

Nelson, D. L, & Cox M. M. "Principios de Bioquímica". Ediciones Omega S.A. Tercera Edición, 2000.

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C



CAPÍTULO II

SISTEMAS DE ENDOMEMBRANAS (RE Y GOLGI), SISTEMA VACUOLAR Y LISOSOMAS

Fidelina González, Gabriela Sconzo, Giussepina Turturici, Fabiana Geraci, Giovanni Giudice.
Depto Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo. Università di Palermo. Palermo. Italia.

Temas.

1. Retículo endoplásmico rugoso.
2. Retículo endoplásmico liso.
3. Golgi.
4. Vesiculación y secreción.
5. Formación de los lisosomas y función.
6. Endocitosis y exocitosis.
7. Proyecto Genoma Humano y la vía secretora.

Aplicación al área de la salud.

1. Enfermedad de Parkinson.
2. Enfermedades producidas por defectos enzimáticos en los lisosomas.
3. Fibrosis quística o fibrosis cística.

Retículo Endoplásmico Rugoso.

1. Generalidades.
2. Péptido señal.
3. Traslocación cotraduccional. Traslocón.
4. Proteínas solubles y la inserción de proteínas transmembrana. Peptidasa señal. Complejo peptidasa señal.
5. Control de calidad en el retículo endoplásmico. Chaperonas. Plegamiento de las proteínas. Glicosilación. Complejo oligosacariltransferasa.
6. Formación de puentes disulfuro.

Retículo endoplásmico liso.

1. Generalidades.
2. Síntesis de lípidos y fosfolípidos. Vitamina A.
3. Síntesis de hormonas esteroides
4. Calcio y sodio.

5. Metabolismo de Glúcidos.
6. Detoxificación.
7. Formación de vesículas que van del RE al Golgi.

Golgi.

1. Generalidades.
2. Glicosilación de proteínas.
3. Grupos fosfato proteínas lisosómicas
4. Sulfatación de proteínas.
5. Empaquetamiento.
6. Condensación.
7. Acumulación.
8. Proteólisis final.
9. Distribución específica.
10. Vesiculación.

Lisosomas.

1. Generalidades.
2. Formación de lisosomas.
3. Endosoma primario.
4. Membrana plasmática del lisosoma.
5. Funciones de los lisosomas.

INTRODUCCIÓN

Direccionamiento de proteínas en la célula: biogénesis de organelos y secreción de proteínas.

Una célula de mamífero contiene alrededor de 10.000 proteínas diferentes y el funcionamiento adecuado de cada célula depende de la correcta ubicación de las proteínas ya sea como parte de una membrana o dentro del compartimiento apropiado, formando parte del contenido de estos compartimientos, como puede ser la matriz mitocondrial, el citosol, los lisosomas, etc.

Cuando el mensajero, ARN o ácido ribonucleico que lleva la información para la síntesis de la proteína, ingresa al citoplasma proveniente del núcleo, se une a la subunidad menor de los ribosomas, al que luego se une la subunidad mayor, para iniciar la lectura del mensajero y por tanto la síntesis de proteína. Por otro lado una proteína madura, como la conocemos y funcionalmente normal, en la mayoría de los casos tiene que pasar por una serie de modificaciones que están relacionadas con el **transporte** y **destino** hacia organelos y vesículas. La clasificación de cada proteína hacia su compartimiento es de importancia fundamental para la organización y funcionamiento de la célula eucariótica. Hay distintos niveles de secreción de una proteína lo que define dos vías distintas: la **vía secretoria** y la **vía citosólica**.

En la vía secretoria se sintetizan las proteínas destinadas al Golgi, lisosomas y secreción al exterior de la célula sea tanto constitutiva, que siempre se está produciendo, y regulada, cuya secreción obedece a una señal. En la vía citosólica se sintetizan las proteínas destinadas al citoesqueleto, peroxisomas, mitocondrias y núcleo. En este capítulo se hace referencia a las proteínas que van a la vía secretoria y en el capítulo siguiente a las proteínas de la vía citosólica.

En la célula, las funciones desarrolladas por el sistema de endomembranas retículo endoplásmico y Golgi están asociadas a la formación de membranas, síntesis de las proteínas y exportación de sustancias hacia el exterior y a la síntesis y al empaquetamiento de las proteínas destinadas a lisosomas. Las

funciones desarrolladas por los lisosomas están orientadas a la degradación de múltiples sustancias y estructuras. En tanto que la detoxificación y síntesis de esteroides se sitúan en el retículo endoplásmico liso entre otras funciones tan importantes como almacenamiento de calcio, síntesis de fosfolípidos, síntesis y almacenamiento de glicógeno, degradación de glicógeno (glicogenolisis) y transformación de pigmentos biliares, entre otras funciones. El sistema endoplásmico está formado por membranas que permite la separación del contenido interno del externo que es el citosol con el que se comunica a través de canales proteicos. En tanto que la intercomunicación entre retículo endoplásmico rugoso y Golgi es a través de formación de vesículas que yeman desde la superficie de los organelos y se fusionan con otra cisterna cercana liberando el contenido interno al lumen de la cisterna receptora más cercana. Estas vesículas forman parte del Aparato de Golgi y almacenan y transportan las sustancias que van a formar tanto parte de los lisosomas como de aquellas destinadas a la secreción al exterior de la célula. Este proceso se conoce como la vía secretoria en oposición a la vía citoplasmática en la cual los ribosomas, asociados a través del mensajero conformado por polirribosomas libres hacen la síntesis de proteínas en el citosol.

Retículo Endoplásmico Rugoso

1. Generalidades.

La descripción morfológica de estos organelos se debe principalmente a la microscopía electrónica de transmisión. El retículo endoplásmico es una red de túbulos y cisternas o sacos ramificados e interconectados. El diámetro de los túbulos y cisternas oscila entre 400 y 700 Å ($\text{Å} = 1 \text{ Angstrom es igual a } 10^{-10} \text{ m}$). La membrana del retículo endoplásmico es de 50 a 60 Å de espesor. Sobre la cara citoplasmática del RER se pueden contabilizar alrededor de 13 millones de ribosomas en los hepatocitos.

El retículo endoplásmico (RE) es una red que ocupa gran parte del citoplasma de las células. Los sáculos y túbulos se encuentran interconectados a través de la membrana continua que rodea un espacio interno, el lumen, este puede llegar a ocupar el 10% del volumen total de la célula. La membrana del

retículo permite mover selectivamente las sustancias entre el lumen y el citosol. Esta se conecta también con la envoltura nuclear, que está conformada por una doble membrana. La membrana del retículo es una membrana que tiene bajo contenido en colesterol, menor que el contenido de colesterol de la membrana plasmática que rodea a la célula y que en el resto de las membranas de la vía secretoria, esto permite mayor fluidez de la membrana (visto en el capítulo de membranas celulares). Se ha demostrado experimentalmente que una mayor concentración de colesterol en la membrana del retículo impediría la traslocación del polipéptido sintetizado por el ribosoma, debido a una desorganización de los componentes del traslocón. La función del retículo endoplásmico rugoso es participar en la síntesis de proteínas, plegamiento, control de calidad, glicosilación primaria y transporte de las proteínas mediante el proceso de formación de vesículas (vesiculación) al Aparato de Golgi.

La superficie del retículo endoplásmico rugoso está cubierto por ribosomas en la cara citoplasmática de la membrana del retículo. Aquí ocurre la producción y procesamiento de proteínas que van a ser exportadas, o secretadas de la célula. Los ribosomas son el mesón de la formación de la proteína. La proteína ingresa al interior del retículo endoplásmico rugoso a través de la membrana, y puede seguir dos vías: como **proteína soluble** o formando parte de membranas. Estas últimas pueden anclarse a la membrana como una **proteína transmembrana**, pudiendo ser unipaso, bipaso o multipaso. Todo el proceso depende de las señales, que en este caso corresponden a secuencias hidrofóbicas, que lleve la proteína en formación. En el retículo endoplásmico ocurre también la glicosilación primaria de las proteínas que van a ser transportadas, esto es la agregación de azúcares a residuos aminoacídicos de la proteína.

2. Péptido señal.

Una vez asociadas las subunidades de los ribosomas al mensajero, se inicia la síntesis de proteínas en el citoplasma, que se detiene si en la secuencia de aminoácidos se lee la correspondiente a un péptido señal, que es reconocido por la proteína citoplasmática **SRP** (es una sigla derivada del inglés que significa partícula de reconocimiento de la señal) que se une a la secuencia del péptido señal y ancla al ribosoma a la membrana del retículo endoplásmico a través del receptor de la partícula (RP) situado en el retículo endoplásmico. La secuencia

señal se encuentra en el extremo NH₂-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Esta secuencia de alrededor de 15-35 aminoácidos, en el extremo amino terminal N-terminal se inicia con un trecho de aminoácidos hidrofílicos, seguidos de una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos (8-15), que forman una estructura de alfa hélice, denominado **core hidrofóbico**, seguidos por aminoácidos básicos, es rico en metionina (dominio M), que se ha demostrado conforman un sitio de reconocimiento del péptido señal. Esta secuencia distingue a las proteínas que van a la vía secretora de aquellas que van a la vía citosólica.

La partícula receptora de la señal (SRP) reconoce y se une a la secuencia señal de anclaje de la proteína en formación y se integra al ribosoma. La proteína SRP está formada por 6 polipéptidos y una molécula corta de ARN (ARN7sl). La región que interactúa directamente con el core hidrofóbico es un polipéptido de 54 kDa (SRP54). En su estructura tiene una región altamente hidrofóbica, que forma un bolsillo hidrofóbico a la que se ancla el core hidrofóbico del péptido señal recién formado, y un sitio de unión para GTP. El ARN contenido en esta partícula tiene por misión interrumpir la lectura del mensajero, al aparearse las secuencias complementarias del mensajero con el ARN del SRP, mientras se asienta el ribosoma al RER. La unión de la proteína SRP a la secuencia inhibe la traducción (lectura del ARN mensajero), por lo cual esta se detiene transitoriamente.

La SRP con el péptido señal, integrados a la subunidad mayor del ribosoma, se une al complejo receptor de SRP o proteína de anclaje de SRP. El receptor SRP es un complejo de dos proteínas, la subunidad alfa y la subunidad beta, esta última es una proteína integral de membrana del retículo endoplásmico rugoso, en tanto que la subunidad alfa es la encargada de unir GTP, para lo cual tiene un sitio de unión. Tanto la SRP como el receptor de SRP son proteínas que requieren de la unión de GTP, para lo cual tienen una región de unión de GTP, y liberan GDP luego de escindir el péptido señal. La partícula que ancló al ribosoma a través del péptido señal se libera y la síntesis de proteínas se reanuda. El proceso de traslocación cotraduccional de la proteína culmina con el final de la traducción (proceso de síntesis de proteína).

En el momento que se ancla el ribosoma a través de receptor de SRP, se asienta sobre el complejo de traslocación de membrana, a través de la cual la proteína que va a ser sintetizada pasa al lumen del retículo para insertarse en la membrana (si es proteína integral de membrana) o para ingresar al lumen (si es

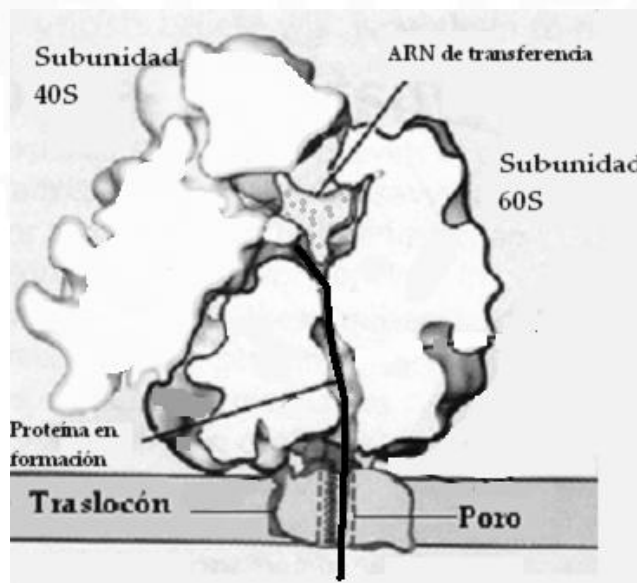
proteína soluble) y es a la vez anclado a la cara externa del retículo endoplásmico rugoso a través de la subunidad mayor que se une a la riboforina I y II, proteínas pertenecientes a otro complejo de proteínas integrales de la membrana del RER, que participan en la glicosilación de la proteína, denominado **OST**.

3. Traslocación cotraduccional. Traslocón.

Existen dos tipos descritos de traslocación en eucariontes, una es la **traslocación cotraduccional** que ocurre en mamíferos y la otra es la **traslocación posttraduccional** que ocurre en levaduras.

En la traslocación cotraduccional, la subunidad mayor del ribosoma queda asentada sobre el traslocón, que es un complejo proteico a la forma de canal que contiene un poro acuoso y que está bloqueado en la cara interna por una proteína, que cierra el poro, se ha demostrado que esta es una chaperona. A través del traslocón ingresará la proteína en formación (Figura 1).

Figura 1. Estructura del ribosoma eucariótico unido al complejo traslocón en la membrana del retículo endoplásmico (Modificado de Cell 107:361 (2001). (Con permiso de la editorial*)).



El traslocón está conformado por un core de complejos heterotriméricos y proteínas asociadas. Estos complejos se conocen como Sec61, y las proteínas que lo conforman se denominan alfa, beta y gamma. La proteína alfa atraviesa la membrana, atravesándola 10 veces, la subunidad beta y gamma sólo una vez. Otro componente importante del traslocón es la proteína TRAM, que cruza la membrana al menos 8 veces.

Cuando el ribosoma está anclado al traslocón, se reinicia la síntesis de la proteína que había sido interrumpida al unirse la partícula SRP a la secuencia señal. La secuencia señal de la proteína en crecimiento se introduce a través del poro del traslocón.

Luego que la partícula SRP se ha unido al receptor de SRP, la cadena polipeptídica es ubicada en el canal acuoso del traslocón que se encuentra cerrado en la cara interna del retículo endoplásmico, se ha postulado que es una proteína soluble, una chaperona de la familia HSP70, BiP, la que cierra el poro en la cara luminal, pero también hay evidencias que el cierre del poro se haría efectivo a través de una región de proteínas integrales de membrana, asociadas al traslocón, que son la riboforina I y la riboforina II. Estas proteínas integrales forman parte del complejo oligosacariltransferasa (OST). A medida que la cadena polipeptídica crece hasta 70 residuos pasa a través del poro del traslocón al lumen del retículo endoplásmico rugoso. Al finalizar la traducción, el ribosoma permanece unido al traslocón hasta que la proteína pueda ser completamente liberada al lumen. El poro acuoso entonces se cierra en un proceso que requiere energía a la forma de ATP. El diámetro del poro es de 40 a 60 Å. En algunos trabajos científicos se ha señalado que este poro cambia de tamaño durante la traslocación cotraduccional, inicialmente el tamaño de poro sería de 9 a 15 Å, cuando el traslocón no está unido al ribosoma y luego se expande el diámetro interno a 40 a 60 Ångstrom. Este proceso impide la liberación de iones, especialmente iones calcio, desde el lumen del retículo al citoplasma, conservándose así los gradientes iónicos críticos durante la traslocación.

La proteína TRAM.

La proteína TRAM (proteína de membrana asociada a la traslocación de la cadena polipeptídica) es una proteína glicosilada multipaso que cumple un rol

adicional en el proceso de traslocación cotraduccional. Participa en un paso inmediatamente posterior al inicio de la traslocación. Inicialmente la interacción entre el traslocón y el ribosoma es débil y luego se intensifica, es en este instante donde participa la proteína TRAM, en el proceso de traslocación. La proteína TRAM funciona de una forma dependiente de la secuencia señal de la proteína en formación, en los pasos iniciales de la traslocación para algunas proteínas. Las proteínas que requieren de TRAM son aquellas que tienen menos residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal que preceden al core hidrofóbico (alrededor de 5 aminoácidos) y tienen un core hidrofóbico de menor longitud. Las proteínas que traslocan independiente de TRAM son aquellas que tienen alrededor de 9 aminoácidos antes del core y este core es más largo. El rol de la proteína TRAM es orientar al péptido señal hacia el traslocón, interactuando con el extremo N-terminal de péptido señal. Los elementos necesarios básicos para el ingreso de péptido señal son el complejo sec61p, la proteína Tram y el receptor de SRP.

En el lumen del RER ocurre la escisión del péptido señal, mediada por una peptidasa señal que es una proteína integral de membrana que se encuentra cercana al traslocón y luego tienen lugar los procesos posttraduccionales, que ocurren en el retículo endoplásmico y culminan en el Complejo de Golgi y la adición de oligosacáridos a los residuos de asparagina de la cadena polipeptídica (oligosacáridos N-ligados). La adición de oligosacáridos es realizada por enzimas como riboforina I y II, que son también proteínas integrales de membrana.

En el lumen del RER las proteínas solubles y las integradas a la membrana son sometidas a un control de calidad por chaperonas.

4. Proteínas solubles y la inserción de proteínas transmembrana. Peptidasa señal. Complejo peptidasa señal.

Inserción de proteínas en la membrana del retículo endoplásmico. Si la proteína sintetizada es una proteína unipaso, bipaso o multipaso que va a formar parte de la membrana plasmática, de la membrana del retículo endoplásmico, del Golgi o de los lisosomas, estas se insertan en la membrana en vez de ser liberadas al lumen. Así, el ingreso de la proteína a medida que se va sintetizando, se interrumpe, formando bucles que se extienden al citosol o al lumen del retículo. Así la inserción de las proteínas integrales a la membrana del retículo es una

inserción cotraduccional. Además, las diferentes proteínas integrales pueden tener expuestos hacia el citosol el extremo N-terminal o extremo C-terminal. Estas orientaciones están establecidas en la cadena polipeptídica. Para proteínas con el extremo C-terminal expuesto al citosol, la inserción en la membrana implica dos eventos secuenciales: una secuencia señal que inicia la traslocación y que posteriormente es escindida y una secuencia de interrupción de la transferencia que ancla la proteína a la membrana.

En el caso de las proteínas multipaso el anclaje a la membrana se efectúa mediante varias secuencias internas de anclaje que interrumpen la traslocación de la proteína. Estas señales no son escindidas por la peptidasa señal, porque no son reconocidas por esta enzima. Así las proteínas multipaso resultan como una serie de bucles que continúan en ambos lados de la membrana del retículo, atravesando la membrana desde la cara citosólica al lumen del retículo y viceversa. Las secuencias hidrofóbicas que anclan la proteína a la membrana no son transferidas al lumen, sino que son insertadas en los lípidos de la membrana, y se les denomina **secuencias de detención de la transferencia** o **secuencias de anclaje**. El traslocón abre un espacio lateral, entre los trímeros que conforman la proteína, permitiendo que tales secuencias entren a la membrana lipídica. Para proteínas con múltiples dominios transmembrana, no está claro si los dominios son liberados secuencialmente o todos de una vez. Por lo tanto el traslocón es responsable de la orientación correcta de los dominios transmembrana (enfrentando la dirección adecuada desde adentro hacia afuera o viceversa).

El complejo peptidasa señal está compuesto de 6 polipéptidos de masa molecular de 25, 23, 22, 21,18 y 12 kDa. Los polipéptidos de 23 y 22 kDa son glicoproteínas. Dos de estos polipéptidos son los responsables de la actividad catalítica, cuyo sitio activo se encuentra orientado hacia el lumen del retículo. Dos de los polipéptidos tienen ubicación citosólica (12 y 25 kDa), y los otros probablemente sean responsables de la interacción con el traslocón, de hecho se ha demostrado que el traslocón interactúa con la subunidad de 25 kDa. El complejo peptidasa señal actúa en asociación con el traslocón.

5. Control de calidad en el retículo endoplásmico. Glicosilación: Complejo oligosacaryltransferasa (OST). Chaperonas: Plegamiento de las proteínas. Vías ERCQ, UPR, ERAD.

Glicosilación de proteínas.

La adición de carbohidratos o glicanos a la proteína cumple roles esenciales en el destino de la proteína. Es así que se ha demostrado que la composición de carbohidratos codifica la información crucial sobre la estructura, localización y edad de las proteínas, promueve la maduración y facilita el control de calidad de las proteínas en el lumen de la vía secretoria. Además actúan de forma estérica (en el espacio) impidiendo el acceso de proteasas. Los glicanos agregados a las proteínas en el retículo endoplásmico constituyen el 50% de la masa de la proteína, son por lo tanto modificaciones voluminosas, que le dan flexibilidad a la proteína y a la vez le confieren propiedades hidrofílicas, se ha comprobado que se extienden aproximadamente 3 nm desde la proteína.

En el retículo endoplásmico ocurre la glicosilación N-ligada de proteínas mientras la traslocación está en progreso: glicosilación cotraduccional. Las unidades de oligosacáridos de 14 residuos de azúcares son agregadas al aminoácido asparragina de la cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo **oligosacárido transferasa (OST)**. Previamente el oligosacárido es sintetizado en un lípido que está anclado a la membrana del retículo endoplásmico, dolicol, que porta el oligosacárido, a la forma de dolicol pirofosfato. Este oligosacárido es transferido a la proteína en el residuo asparragina en una secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr de la proteína, por el complejo oligosacárido transferasa. La OST tiene al menos dos sitios de unión, uno para el sitio de consenso y el otro para el oligosacárido unido al dolicol, es probable que exista otro sitio de unión al traslocón. Posteriormente son removidos cuatro residuos de azúcar: tres glucosas y una manosa del glicano. La Figura 2 indica claramente la composición del glicano transferido a asparagina, con sus respectivos enlaces y se indican las enzimas que participan en forma posterior a la unión del glicano N-ligado (a asparagina). En la Tabla 1, se detallan las funciones de cada uno de los pasos.

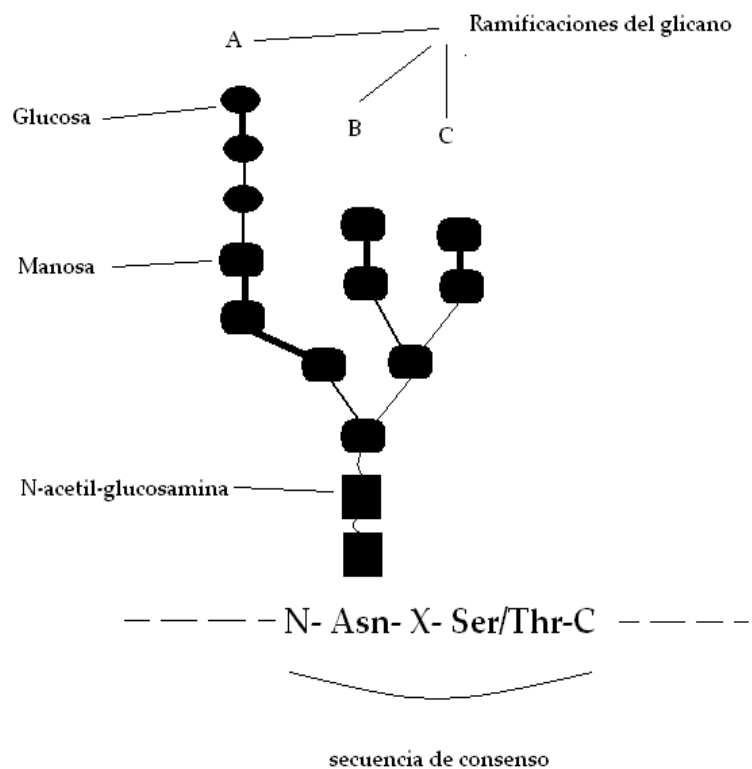


Figura 2. Composición del glicano transferido al residuo asparragina (Asn) de la proteína en formación de acuerdo a Herbert, DN, Garman, SC, Molinari, M. 2005. Trends in Cell Biology 15(7):364-370.

Tabla 1. Función de cada unidad de glicano que se une a la proteína en formación en el Retículo Endoplásmico Rugoso (de acuerdo a Herbert, DN, Garman, SC, Molinari, M. 2005. Trends in Cell Biology 15(7):364-370.).

Glicano	Modo de generación	Función
Glc3 Man9GlcNAc2	Transferido por OST	El glicano es transferido por OST desde OS-PP-Dol
Glc2 Man9GlcNAc2	Glucosidasa I	Inhibición de la unión a OST. Libera la glicoproteína para iniciarse el plegamiento
Glc1 Man9GlcNAc2	Glucosidasa II y GT	Une las chaperonas del RE: calnexina y calreticulina; ayuda al reclutamiento de la Oxidoreductasa ERp57. Evita la agregación de proteínas. Inhibe el plegamiento global y retiene a las glicoproteínas en el RE.
Man9 GlcNAc2	Glucosidasa II	Libera las chaperonas y ocurre el plegamiento y la maduración de la proteína
Man8 GlcNAc2	Manosidasa I del RE	Marca al sustrato para la vía ERAD, cuando esta es una proteína mal plegada
ManX GlcNAc2	Manosidasa II del RE	Se une a ERGIC-53 en el RE y lo marca con destino ERGIC cuando está acoplada a una proteína plegada apropiadamente.

La oligosacárido transferasa es un complejo de proteínas integrales de membrana que ha sido estudiada en levaduras y en mamíferos. En las levaduras comprende ocho unidades Ost1p, Ost2p, Ost3p/ Ost6p, Ost4p, Ost5p, Wbp1p, Swp1p y Stt3p. En eucariontes pluricelulares se han identificado los homólogos de las proteínas Ost4p y Ost5p. En mamíferos se ha determinado la presencia del homólogo de Stt3p y Ost3p/Ost6p. Se ha determinado que la proteína Stt3p es la subunidad central implicada en la transferencia del glicano al polipéptido en formación. La transferencia oportuna del oligosacárido al polipéptido en formación es facilitada por la proximidad que existe entre el complejo OST y el traslocón.

La glicosilación de las proteínas permite el correcto **plegamiento de las proteínas**, por lo tanto es necesaria que sea completa, ya que es requisito del control de calidad de la proteína en el lumen del retículo endoplásmico. Desde ya se puede señalar que la ausencia de algunos de los aminoácidos Ser o Thr en la secuencia de la proteína en el orden señalado, impide la glicosilación de la proteína.

Formación del dolicol-pirofosfato-oligosacárido dador del glicano.

El dolicol es un lípido que forma parte de la membrana del retículo, y transporta el oligosacárido formado por 14 residuos de monosacáridos que cede a la oligosacaril transferasa para ser unido a la asparagina del polipéptido en formación. El primer paso para la formación del oligosacárido es la fosforilación del dolicol. Este se fosforila para formar un dolicol pirofosfato, que son dos grupos fosfatos unidos que contienen una muy alta energía. El primer fosfato proviene de CTP, y el segundo fosfato proviene de UDP-N-acetilglucosamina (GlcNAc), incorporándose junto con el fosfato la primera molécula de sacárido al dolicol que ya contenía un fosfato. Luego se incorpora otra GlcNAc proveniente de UDP-N-acetilglucosamina, esta vez sin el fosfato, a la GlcNAc ya unida. Luego se incorporan 5 manosas de una por una, provenientes de GDP-manosa. Todos los sacáridos unidos al dolicol están orientados hacia el citoplasma y en este punto mediante un movimiento de "flipping" o "flip-flop" en la membrana del retículo quedan enfrentados hacia el lumen del retículo, donde se siguen agregando 4 manosas provenientes de GDP-manosa, y luego las tres glucosas que provienen de UDP-glucosa.

Chaperonas y plegamiento de las proteínas.

Luego de la traslocación al lumen del RE y la glicosilación, las proteínas se encuentran con las chaperonas que facilitan el proceso de maduración y detección de un producto proteico defectuoso. Las chaperonas constituyen una clase de proteínas que se unen a polipéptidos no plegados o parcialmente plegados, que tienen la función de ayudar al plegamiento de las cadenas polipeptídicas en formación, ayudar al replegamiento de las proteínas denaturadas o evitar la agregación de las superficies hidrofóbicas expuestas de

las proteínas que presentan problemas en el plegamiento evitando la agregación y promoviendo el plegamiento. Están presentes tanto en eucariontes como en procariontes. Las chaperonas ayudan a las proteínas a plegarse, acelerando el proceso, estabilizando intermediarios inestables y decreciendo las barreras de activación del plegamiento. Reconocen superficies hidrofóbicas de las proteínas, se unen a ellas, evitando la agregación de proteínas. Juegan un rol importante en la transducción de señales, en la mantención del la organización del citoplasma y de compartimientos intracelulares ya que no sólo están presentes en el interior del retículo sino que también en el citoplasma, núcleo, mitocondrias, etc. Se ha estimado que alrededor del 30% de las proteínas sintetizadas en una célula son defectuosas o aberrantes. Las proteínas mal plegadas son inherentemente tóxicas al organismo. Además estas proteínas si no son eliminadas pueden tender a la agregación, debidos a interacciones hidrofóbicas.

Las chaperonas que interactúan en forma inmediata con el polipéptido recién formado son la calnexina y la calreticulina, ambas son chaperonas tipo lectina. La calnexina es una proteína de membrana y la calreticulina es soluble. Ambas tienen un sitio para unir al glicano de la glicoproteína que está al estado monoglucosilado, tiene sólo una glucosa en la ramificación A (ver Tabla 1). La unión a la calnexina o calreticulina aumenta la eficiencia del plegamiento, ya que enlentecen el proceso para dar tiempo a un plegamiento correcto, evitando la agregación con otras proteínas en el interior del RE. Si la interacción es con una proteína aberrante, esta proteína permanecerá mayor tiempo unida a estas chaperonas. Por lo tanto la ubicación de los glicanos es esencial para dirigir el plegamiento correcto, el dominio de la proteína donde se ubica el glicano que está unido a la chaperona es el último en plegarse. La importancia de la transferencia del glicano N-ligado completo también influye en la calidad de una proteína ya que aquellos incompletos no serán reconocidos por la chaperona.

Es así que el retículo endoplásmico rugoso juega un papel primordial en el control de calidad de las proteínas, solubles o transmembrana; esta vía de estricto control de calidad de las proteínas se denomina ERQC (que significa control de calidad en retículo endoplásmico) y tiene asociada una vía de degradación de proteínas ERAD (ERAD, que significa degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico) que es el reconocimiento de las proteínas defectuosas en el RE, su marcaje para exportación y la degradación en el citoplasma y que consta de tres pasos:

1) reconocimiento de los polipéptidos aberrantes por **chaperonas** presentes en el lumen del retículo endoplásmico, esto se inicia desde el momento de entrada del péptido al lumen del retículo, cuando la síntesis de proteína está en progreso.

2) exportación de las proteínas solubles al citoplasma a través del poro del traslocón (**retrotraslocación**)

3) degradación de los polipéptidos aberrantes, mal plegados, previa ubiquitinación, en el proteasoma que se encuentra en el citoplasma. La degradación de los polipéptidos ubiquitinados produce oligopéptidos y unidades de ubiquitina. El proteasoma es un complejo proteasa citosólico muy abundante que consta de una partícula core 20S que tiene actividad proteolítica y uno o dos RP19S, que le da el aspecto de un tubo con tapas abatibles en ambos extremos del tubo. El proteasoma es una macroestructura que recicla proteínas a péptidos pequeños, que luego son degradados a aminoácidos en el citoplasma.

Cabe señalar que en algunos casos, las proteínas transmembrana pueden ser degradadas directamente por el proteasoma o por proteasas en la cara citosólica.

¿Cómo se detecta una proteína mal plegada? Se ha postulado un mecanismo molecular primario de detección de proteínas mal plegadas denominado con la sigla **UPR** (que significa **respuesta a proteínas mal plegadas**), asociada a la vía ERAD, mediante este mecanismo las células eucarióticas contrarrestan la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico, evitando la agregación de proteínas en el interior del retículo.

Hay evidencias que la presencia de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo, inducen mediante un complejo mecanismo al aumento de la síntesis de chaperonas. Esto implica que habría señales que partirían desde el interior del retículo hasta el núcleo, que aumentarían el número de mensajeros de las chaperonas, que luego serían traducidos en el RE. Se postula que la proteólisis activaría factores que entrarían al núcleo y se unirían al ADN facilitando la síntesis de mensajeros de las chaperonas.

¿Dónde ocurre la **degradación de proteínas**? Como ya se ha señalado, las proteínas secretadas son marcadas y trasladadas al interior del lumen del RE a través de un canal proteico ubicado en la membrana del RE. En el lumen estas proteínas son plegadas correctamente antes de ser transportadas a través de vesículas que las trasladará hacia el siguiente compartimiento de la vía secretora. En tanto, las proteínas mal plegadas serán retenidas en el RE, y finalmente serán degradadas, en el citosol. Las proteínas mal plegadas vuelven al citosol a través del mismo poro del traslocón y pasan al citosol. Las chaperonas BiP o calnexina y PDI (proteína disulfuro isomerasa) que están en el lumen del RE evitan la agregación de proteínas e intervienen en la decisión de transportar las proteínas para ser secretadas, o bien para ser degradadas. Así, las chaperonas pueden recubrir la señal de salida de las proteínas o anclar estas proteínas defectuosas en el lumen del retículo endoplásmico rugoso. Las chaperonas en el citosol a la vez participan en la exportación de las proteínas defectuosas provenientes del RE, y para marcarlas con residuos de ubiquitina (poliubiquitinación, visto en el capítulo de proteínas) y dirigir las hacia los proteasomas citosólicos para su degradación por el proteasoma que se encuentra en el citoplasma.

Reglucosilación.

La calreticulina y la calnexina, son ayudadas en el reconocimiento de las proteínas mal plegadas por la glucosil transferasa (GT) dependiente de UDP. GT es una proteína de 174 kDa que tiene dos dominios, uno para la actividad transferasa de la glucosa a la glicoproteína, en el glicano, específicamente en la ramificación A (Figura 2, Tabla 1), y el otro dominio es el sensor de plegamiento, que comprende alrededor del 75% de la proteína. La proteína GT reconoce los residuos hidrofóbicos expuestos en glicoproteínas en formación, realizando así una actividad complementaria con calnexina y calreticulina, que se asocian a la porción hidrofílica de la proteína, es decir a la porción glicanos N-ligados. La GT agrega glucosa a aquellas moléculas que detecta como glicoproteínas mal plegadas. Esta es una marca de retención en el RE y que da tiempo para que la proteína mal plegada pueda plegarse correctamente. Los siguientes son los pasos que se siguen en el lumen del retículo:

- 1) La enzima Glucosidasa I remueve la glucosa terminal de la ramificación A del glicano de una proteína.

2) La enzima Glucosidasa II remueve la siguiente glucosa. En este punto se une la calnexina, que es la chaperona unida a la membrana.

3) La enzima Glucosidasa II remueve la tercera glucosa, siempre que la glicoproteína esté bien plegada, y la proteína enseguida es empaquetada para salir del RE al Golgi, por formación de vesículas con cubierta de coatómero COP I. Si la proteína no está bien plegada, entonces interactúa con calreticulina seguida por la adición de tres nuevas glucosas obtenidas de UDP-glucosa. Un nuevo ciclo da la posibilidad de un plegamiento correcto.

Formación de puentes disulfuro.

El estado de oxidación del retículo endoplásmico promueve la formación de los puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la proteína. Es así que las proteínas que están en el RE son modificadas covalentemente por la formación de enlaces o puentes disulfuro. Esta reacción es catalizada por proteínas que actúan como agentes oxidantes o aceptores de electrones, en el RE antes que las proteínas nativas puedan seguir su curso hacia el Golgi. También estas oxireductasas tienen la facultad de reducir los puentes disulfuro para facilitar la retrotraslocación de las proteínas defectuosas a través del traslocón hacia el citosol. La calnexina y la calreticulina participan en el proceso guiando las oxireductasas como la ERp57 a los sitios de formación de puentes disulfuro en la proteína en formación o en la maduración de la proteína. Además la enzima denominada proteína disulfuro isomerasa (PDI) presente en el lumen del retículo, es la responsable de reubicar los puentes disulfuro a lo largo de la proteína. La proteína disulfuro isomerasa contiene dos cisteínas en su secuencia que están muy cercanas entre sí, y que tienen la propiedad de interconvertirse fácilmente entre la forma reducida (SH) y la forma oxidada (S-S). La PDI oxidada facilita la formación de puentes disulfuro (S-S) en la proteína en maduración, actuando como un oxidante que reduce. La PDI reducida ayuda a la formación de puentes disulfuros correctos dentro del sustrato. Sale inalterada de la reacción.

Control de calidad de la síntesis proteica: Vía ERAD.

La vía ERAD (ERAD, significa degradación asociada al retículo endoplásmico) es la exportación desde el RE al citosol de las proteínas mal

plegadas para su posterior degradación. En este mecanismo de reconocimiento y unión a las proteínas mal plegadas en el lumen del retículo participan las chaperonas. Las chaperonas probablemente están implicadas en la distinción de intermediarios de plegamiento de las proteínas terminalmente defectuosas y en la iniciación del marcaje para su degradación. En el retículo endoplásmico, las proteínas no glicosiladas mal plegadas son reconocidas por BiP, pero la interacción subsecuente es con proteínas miembros de la familia PDI, anclada a la membrana del retículo endoplásmico. Los miembros de la familia PDI forman los puentes disulfuro en la proteína, PDI es requerida para exportar sustratos con puentes disulfuro al citoplasma. En la vía ERAD, la interacción con PDI u otros miembros de la familia es un requisito para la exportación al citoplasma, tenga o no puentes disulfuro el sustrato.

El plegamiento incorrecto lleva a una asociación prolongada con chaperonas, escindiéndose un residuo de manosa del N-glicano de la proteína por manosidasa I del RE (Mns1p) y el reconocimiento del glicano sin este residuo de manosa por Htm1p, que marca a la glicoproteína mal plegada para su degradación. El marcaje para la exportación de las proteínas mal plegadas no glicosiladas puede ser mediada directamente por PDI. Las proteínas mal plegadas son exportadas al citosol a través de un canal formado por Sec61p y múltiples proteínas accesorias. Durante la exportación las proteínas son oligoubiquitinadas por un conjunto de enzimas E2-E3.

Römisch (2005) señala tres escenarios mediante los cuales una proteína mal plegada llega hasta el proteasoma, de acuerdo al nivel de ubiquitinación de la proteína:

1. Cuando los sustratos pobremente ubiquitinados se encuentran en el canal Sec61p con destino al citoplasma, son ayudados por E4 que aumenta el tamaño de la cadena de ubiquitina y posterior deglucosidación por otras enzimas citosólicas antes de ser reconocido por la subunidad regulatoria del proteasoma 19SRP.
2. Alternativamente la **ubiquitinación** puede ser mediada por el complejo ubiquitín ligasa: SCF-N-glicano. SCF (sigla del inglés, proteína Skp1-Cul1-caja F) es un receptor perteneciente a una familia de ubiquitín ligasa que reconoce y agrega ubiquitina a proteínas N-glicosiladas que han sido transportadas al citosol. Estas proteínas constan de 4 subunidades y la subunidad que contiene un lugar que

reconoce y se une al sustrato. En mamífero se han reconocido dos miembros de la familia SCF^{FBS1} y SCF^{FBS2} . FBS1 se expresa principalmente en neuronas y se une fuertemente a la fracción quitobiosa de glicoproteínas desnaturalizadas. FBS2 se expresa en gran cantidad de células distintas.

3. A un alto nivel de ubiquitinación del sustrato, el **proteasoma** se une directamente al canal Sec61p y extrae la proteína mal plegada desde el RE.

Retículo endoplásmico liso

1. Generalidades.

El retículo endoplásmico liso es más tubular que el retículo endoplásmico rugoso, y estos túbulos se encuentran profusamente anastomosados formando una verdadera red de túbulos. El retículo endoplásmico liso no tiene ribosomas en su superficie externa. Está conformado por canales tubulares que se anastomosan, facilitando la intercomunicación de los contenidos del mismo.

El retículo endoplásmico liso está implicado en la producción de lípidos, síntesis de bloques de carbohidratos (glicógeno) destinados al metabolismo de carbohidratos, detoxificación de drogas y venenos y almacenamiento de calcio. Por lo tanto, en algunas células como neurona y células musculares se encuentra muy desarrollado porque requieren del metabolismo de lípidos y carbohidratos, o en hepatocitos, donde contribuye a la detoxificación, metabolizando drogas como barbitúricos o alcohol. En las células musculares el retículo endoplásmico libera el calcio almacenado y gatilla la contracción muscular.

En las células de los diferentes tejidos el retículo endoplásmico liso juega un rol muy importante en la regulación del calcio, y de los iones cloruros, en el transporte de los lípidos y la síntesis y circulación de fosfolípidos y glicoproteínas de membrana, en el metabolismo de los lípidos, lipoproteínas y glicógeno, en la síntesis de hormonas esteroidales y en la detoxificación.

2. Síntesis de lípidos y fosfolípidos. Vitamina A.

En las células pigmentadas de la retina, el retículo endoplásmico liso está implicado en la esterificación de la vitamina A, la rodopsina, el pigmento visual, está compuesto de un aldehído de la vitamina A.

3. Síntesis de hormonas esteroides.

Participa en la producción de esteroides, como sucede en la glándula adrenal y en las gónadas, formados a partir de colesterol se sintetizan estrógenos, testosteronas, cortisol y progesterona, vías en las que intervienen las enzimas mencionadas anteriormente. Los esteroides en las células de la corteza adrenal difunden, no van incorporados a gránulos de secreción como en el caso de las proteínas.

4. Calcio y sodio.

En las células regula la distribución de los iones calcio, ya que el lumen del retículo endoplásmico es el principal sitio de almacenamiento de la célula. En las células musculares, se denomina retículo sarcoplásmico, regula la contracción. Contiene en su interior una ATPasa dependiente de Calcio. La liberación de los iones calcio promueve la contracción.

5. Metabolismo de Glúcidos.

En el retículo endoplásmico liso de hepatocitos, la presencia de Glucosa 6 fosfato interviene en el metabolismo del glicógeno (hepático). En el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos ocurre la síntesis de glicógeno y almacenamiento como gránulos en el exterior del retículo endoplásmico liso disponible para la degradación de glucógeno con la liberación de glucosa 1 fosfato.

6. Detoxificación.

Aumenta en los hepatocitos luego de la exposición a barbitúricos; transforma los fármacos liposolubles en productos hidrosolubles que pueden ser excretados por el riñón. También metaboliza el alcohol producto de beber en exceso. Contiene hidrolasas, lipooxidasas y metilasas que son responsables de estos procesos.

7. Formación de vesículas que van del RE al Golgi.

La mayor parte de las proteínas exportadas desde el retículo endoplásmico salen del organelo en vesículas que yeman desde la porción lisa de retículo endoplásmico, esta región carece de ribosomas. El retículo endoplásmico liso no se encuentra tan desarrollado en algunas células y por esto es denominado retículo endoplásmico de transición.

¿Por qué se produce la retención de proteínas en el RE? Algunos autores se refieren a esto como regulación de los **sitios de salida** de los productos proteicos en los que intervendrían dos estructuras proteicas, una el coatómero COP II que forma la cubierta externa de la vesícula que sale del RE con destino a las cisternas cis del Golgi y una proteína SAR, una GTPasa (intercambia GTP por GDP, pudiéndose de esta manera hacer el movimiento de vesículas entre compartimientos) de la familia Ras. En estos sitios de salida, también denominados RE de transición (ERGIC), se inicia la yemación de las vesículas, con la incorporación de los coatómeros en la parte externa, que van unidos a otras proteínas integrales de membrana, como lo muestra el esquema. Micrografías electrónicas muestran que en estos sitios se producen numerosas vesículas que migran hacia el Golgi, y se fusionan con las cisternas cis del Golgi. Las vesículas tienen dimensiones de alrededor de 50 nm.

A nivel de la exportación del RE, la clasificación de las proteínas en los sitios de salida determina si una proteína puede abandonar el RE. Aquí las señales de exportación y retención, los efectos de la movilidad de proteínas en el RE y la inclusión selectiva en los sitios de salida del RE son factores cruciales. Como conclusión se debe señalar que en el retículo el plegamiento y la maduración están constantemente sujetos a procesos de ensayo-error, y una

fracción sustancial de proteínas es degradada rápidamente después de la síntesis. Es así como el proceso de plegamiento y ensamble de proteínas está asociado a la exportación por transporte vesicular.

El Aparato o Complejo de Golgi

1. Generalidades.

El aparato o complejo de Golgi es un organelo constituido por una serie de sacos aplanados o cisternas y vesículas asociadas, cuya función principal es la modificación postraduccional y clasificación de proteínas sintetizadas en el RE y destinadas por medio de vesículas a: lisosomas, membrana plasmática o a secreción. El Golgi está ubicado cerca del núcleo, del retículo endoplásmico y del centrosoma. Su tamaño es variable y su desarrollo depende del tipo celular y de su estado metabólico y del ciclo celular.

La unidad básica del organelo es el sáculo, que consiste en una vesícula o cisterna aplanada con una región central de 0,5-1 μm de diámetro. Las cisternas o sáculos presentan una forma curva concéntrica, con una cara convexa y otra cóncava, se disponen en pilas paralelas separadas por 20 a 30 nm. Esta serie de sáculos apilados conforman un dictiosoma.

En las células animales, el número de dictiosomas varía entre 3 y 7. El Golgi está compuesto de una asociación de dictiosomas. Los dictiosomas están polarizados. Tienen una cara cis (proximal o formadora), generalmente convexa y cercana a la envoltura nuclear y al retículo endoplásmico, y una cara trans, (distal o de maduración), cóncava, rodeando la región que contiene vesículas grandes que contienen el material procesado.

Forman también parte del Golgi, una serie de vesículas regularmente esféricas que se forman a ambos lados de los extremos del Golgi, y entre los sáculos. En la cara cis se localizan las denominadas vesículas de transición y en la cara trans las vesículas de secreción. Es frecuente encontrar la denominación con la sigla TGN, que significa red trans Golgi, al lugar donde emergen las

vesículas de secreción. Es posible diferenciar también túbulos tanto en la cara distal como en la cara proximal del Golgi. El Aparato de Golgi tiene la característica de ser un organelo muy dinámico dentro de la célula. Todas las proteínas que lo componen son transitorias, llegan al Golgi desde el retículo endoplásmico y salen del Golgi con diversos destinos en la célula. Consta con una enorme diversidad de proteínas, más de 1000 tipos distintos.

Los microtúbulos asociados a proteínas motoras constituyentes del citoesqueleto mantienen la localización, la forma y, por tanto las funciones del aparato de Golgi. En el curso de la mitosis, el Golgi se fragmenta en pequeñas vesículas que se diseminan por todo el citoplasma. Los microtúbulos también participan en el reciclaje de membranas hacia el RE y en el transporte de material de secreción de la red trans del Golgi.

El Aparato de Golgi realiza tres funciones principales, esenciales para el crecimiento, la homeostasis y la división de la célula. Opera como proveedor de carbohidratos en el procesamiento y modificación de proteínas y lípidos que se mueven a través de la vía secretoria. Sirve de centro de transporte y direccionamiento de proteínas en la célula y recibe membranas desde el retículo endoplásmico y las envía a la membrana plasmática u otros sitios celulares. Actúa como andamiaje membranoso donde se anclan las proteínas del citoesqueleto y las sorteadas con distintas señales.

Los siguientes mecanismos transcurren en el Aparato de Golgi en las células animales:

1. maduración de las glicoproteínas provenientes de retículo.
2. intervención en los procesos de secreción, almacenamiento, transporte y transferencia de glicoproteínas.
3. Formación de membranas: membrana plasmática, membrana del retículo y la membrana de la envoltura nuclear.
4. Formación de los lisosomas.

En el Golgi ocurren una serie de modificaciones postraduccionales (modificaciones que ocurren luego que las proteínas han sido sintetizadas), procesos de empaquetamiento y distribución de sustancias que ocurren en determinadas cisternas:

ERGIC (compartimiento intermedio Golgi- Retículo Endoplásmico) o VTC (complejo Tubulo Vesicular) o compartimiento pre GOLGI intermedio. Corresponde a un compartimiento que se encuentra entre el retículo endoplásmico rugoso y el Golgi.

1. Cisterna cis o CNG.

- Adición de Grupos fosfato a las proteínas destinadas a los lisosomas. Se agregan en la cisterna cis del Golgi. Fosforilación de las glicoproteínas destinadas a los lisosomas, fosforilación de la manosa del oligosacárido de las proteínas y remoción de manosa no fosforilada.

2. Cisterna media.

- Sulfatación de proteínas, estos grupos sulfatos se agregan a residuos de oligosacáridos unidos las proteínas, sulfatación de residuos específicos de tirosina. Síntesis de proteoglicanos. Los proteoglicanos corresponden a glicoproteínas altamente glicosiladas.
- Remoción de manosa, y se agregan residuos de N-acetilglucosamina al oligosacárido.
- Glicosilación de proteínas en residuos de treonina o serina, conformando los grupos glicanos O-ligados a las glicoproteínas.

3. Cisterna trans y red trans Golgi o TNG.

- Empaquetamiento, distribución de las moléculas en regiones de la cisterna donde va a ocurrir la vesiculación para el transporte de las sustancias, dependiendo del destino de las proteínas. Es la organización de las sustancias para ser exportadas posteriormente en lugares específicos de la cisterna.
- Remoción de galactosa y se agrega ácido siálico o N-acetilneuramínico (NANA).
- procesamiento del oligosacárido N-unido termina con el agregado de los últimos ácidos siálicos.
- Condensación, pérdida de agua necesaria para el empaquetamiento, esta pérdida de agua de las sustancias permite reducir el volumen para la exportación desde el Golgi.
- Acumulación de las proteínas en regiones específicas de la cisterna, necesario para el empaquetamiento.
- Proteólisis final, ejemplo proteólisis específica de proproteínas (ej., proinsulina). Es el procesamiento de proteínas que pasan a través del Golgi, donde pierden parte de la cadena polipeptídica para transformarse a la forma activa.

Normalmente la parte de las proteínas que son escindidas del producto final corresponde a regiones donde se encuentran péptidos señales que han enviado a la proteína como preproteína hasta la cisterna donde es procesada. Ejemplo de esto es la insulina. La insulina es transportada desde el retículo endoplásmico rugoso como proinsulina al Golgi, y tiene como parte de la cadena polipeptídica a un péptido C, además del péptido A y péptido B. Este péptido C es escindido de la cadena polipeptídica antes de abandonar el Golgi. La función de esta parte de la cadena polipeptídica es asegurar el paso por el Golgi.

- Distribución específica de los productos a través del proceso de vesiculación, está dada por señales peptídicas principalmente que envían a las proteínas en distintos tipos de vesículas y de compartimientos endocíticos (endosomas, lisosomas, vacuolas).

En resumen.

- Todas las cisternas participan en los procesos de vesiculación: formación de pequeños cuerpos rodeados por membranas y que contienen sustancias que van a ser transportadas dentro de la célula o hacia afuera de la célula.
- Glicosilación de proteínas. En el Golgi ocurre la glicosilación en los residuos de aminoácidos de la proteína serina o treonina. Estos aminoácidos contienen un grupo hidroxilo al que se agregan cadenas de azúcares a las proteínas.

Vesiculación o Tráfico vesicular

Las etapas en un paso de transporte mediado por vesículas (tráfico vesicular):

1. **Clasificación** y acumulación del material a ser transportado en el organelo, debajo de la membrana.
2. **Vesiculación o yemación**, mediante el reclutamiento de proteínas citosólicas que recubrirán la vesícula formada y facilitarán la formación de la vesícula. Estas proteínas citosólicas incluyen a proteínas de la cubierta sea de clatrina o coatómeros y a sus proteínas adaptadoras.

3. Desprendimiento, escisión o **liberación** de la vesícula mediante la intervención de una proteína: la dinamina y una vez libre la vesícula de su organelo formador de la vesícula se liberan las proteínas de la cubierta.

4. **Direccionamiento / transporte** de la vesícula, a un destino especificado por las proteínas de direccionamiento.

5. **Reconocimiento** de la membrana de destino de la vesícula, mediante proteínas integrales de membrana del complejo SNARE tanto en la vesícula como en el organelo blanco y fijación de estos complejos con proteínas solubles citosólicas SNAP y NSF.

6. **Fusión de las membranas** de la vesícula y de la membrana de destino y liberación del contenido del orgánulo al organelo blanco.

En la vía secretora es posible diferenciar distintos tipos de vesículas, como las que van del RE de transición al Golgi y viceversa, entre las cisternas del Golgi y dos tipos diferentes de secreción celular: Un tipo de **secreción constitutiva** y otro tipo de **secreción regulada**. Ambos tipos de secreción se diferencian porque la vesícula puede vaciar su contenido en cuanto alcanza la membrana celular al abandonar la cara trans del Golgi, y en este caso hablamos de secreción constitutiva o bien se almacena transitoriamente en el citosol cerca de la membrana esperando una señal que indique que la vesícula debe vaciar su contenido al exterior, y en este caso hablamos de secreción regulada. Este último caso podemos ejemplificarlo con la secreción de insulina en las células beta de los islotes de Lagerhans en el páncreas. Las vesículas que participan en la secreción constitutiva tienen cubierta de coatómero COP I, en tanto que las de la secreción regulada tienen cubierta de clatrina.

Sistema vacuolar.

Las distintas vesículas se pueden diferenciar por las cubiertas proteicas que llevan en el lado citoplasmático. Hay tres tipos de vesículas de acuerdo a la cubierta proteica: vesículas con cubiertas de clatrina, vesículas recubiertas por coatómero COP I y vesículas cubiertas por coatómero COP II.

Vesículas recubiertas de clatrina.

Aisladas por primera vez en oocitos del zancudo *Aedes aegypti*, las vesículas con cubiertas de clatrina tienen un diámetro entre 50 y 100 nm, siendo el elemento básico la clatrina, proteína heterodimérica formada por 3 cadenas pesadas (1675 aminoácidos, 180 Kda, codificada por el gen HC17) y tres livianas (35-40 Kda), organizadas en una estructura denominada **trisquelión**. Existen dos tipos de cadenas livianas, alfa y beta.

La síntesis de las subunidades que conforman la clatrina ocurre en el citoplasma, en polisomas libres, es decir en la vía citoplasmática y luego se organiza la clatrina a la forma de trisqueliones. Luego ocurre la polimerización de clatrina para conformar los canastillos de clatrina alrededor de las yemas en formación que conformarán las vesículas. Este proceso ocurre en la cisternas trans y red trans del Golgi y también en la cara citosólica de la membrana plasmática, por lo tanto las vesículas revestidas por clatrina participan en el transporte de sustancias entre la red trans del Golgi a la membrana plasmática, y desde la membrana plasmática en los procesos de endocitosis y también en la formación de lisosomas. La polimerización de la clatrina es dependiente de su concentración en el citoplasma, definiéndose así una concentración crítica de trisqueliones que hace posible la polimerización de estas unidades que forman la cubierta o canastillo de clatrina. Las vesículas recubiertas por clatrina dan origen a las vesículas que participan en la secreción regulada por receptor.

Otros procesos donde se forma cubierta de clatrina son la endocitosis mediada por receptor, la fagocitosis, la transcitosis y la pinocitosis.

¿Por qué no se autopolimeriza la clatrina en la célula?

En la célula la autopolimerización de la clatrina no es posible porque los trisqueliones solubles están asociados a una chaperona citosólica (hsp70), en un mecanismo análogo al de respuesta a las proteínas mal plegadas del RER, por lo tanto su polimerización siempre está asociado a la formación de vesículas intracelulares recubiertas. La clatrina se une a las membranas mediante unas proteínas denominados adaptadores o adaptinas, de las cuales las más importantes son las adaptinas AP, GGA. Las adaptinas AP también se les

denominan "Ratón Mickey", porque su estructura molecular se asemeja a la cara de este personaje de Disney.

Entre la red de **clatrina** y la membrana de la vesícula hay un espacio de 20 nm en el que se encuentran las partículas de **proteínas adaptadoras**, de 350 Kda.

Se han descrito 4 complejos de **adaptadores** diferentes:

- 1) Los adaptadores que reconocen las regiones de membrana que contienen receptores con la señal de transporte.
- 2) Los adaptadores que reconocen la carga a transportar, es decir el contenido de la vesícula.
- 3) Los adaptadores que reclutan los trisqueliones de clatrina.
- 4) Los adaptadores que reclutan las proteínas auxiliares.

Vesículas recubiertas por coatómeros.

Las vesículas con cubierta de coatómeros COP I y COP II dirigen el tráfico de proteínas y membranas entre los compartimientos iniciales de la vía secretoria. Estas cubiertas proteicas participan en la selección de las proteínas a transportar y deformar la membrana de la cisterna dadora, para formar yemas al inicio del proceso y luego vesículas. Las vesículas cubiertas por la proteína COP II salen del retículo endoplásmico con destino a la red cis del Golgi.

Las vesículas con cubierta COP I, median la vía retrógrada que recicla selectivamente las proteínas desde la cara cis del Golgi al retículo endoplásmico, también de retorno entre cisternas vecinas del Golgi, participando en el traslado de proteínas y sustancias entre las cisternas del Golgi y mantienen la estructura normal del complejo Golgi interfásico.

Proceso de vesiculación.

Además de las proteínas de cubierta mencionadas anteriormente y las moléculas adaptadoras, también en el proceso de vesiculación participan pequeñas moléculas que unen GTP en el caso de la formación del canastillo de clatrina, que son necesarias para la formación de la vesícula revestida.

Formación del canastillo o jaula de clatrina.

La formación de la vesícula con cubierta de clatrina a la forma de canastillo o jaula está dirigida por partículas de ensamble que promueven la polimerización de los trisqueliones dependiendo de la concentración de estos en el citoplasma una vez iniciada la yemación. El contenido de proteínas a transportar también se acumula en este punto, donde se encuentran mayormente concentradas. Una vez formada la vesícula interviene la dinamina, una proteína citosólica que liga y cierra la vesícula, liberándola definitivamente de su sitio de formación hidrolizando GTP a GDP.

Formación de cubierta de coatómero COP I y COP II.

La formación de la vesícula COP I y COP II se inicia cuando una enzima asociada al Golgi cataliza el intercambio de GDP por GTP en una proteína en la cara citoplasmática del Golgi, ARF (ARF corresponde a un factor de ribosilación de ADP), iniciando la polimerización de los coatómeros COP I que a su vez induce la yemación de la vesícula.

Sistema endocítico.

¿Cómo se orienta una vesícula que contiene material a transportar desde el sitio que se genera al sitio donde debe depositar su carga?

La opción del destino de la vesícula, especialmente en el sistema endosoma-lisosoma está dado por péptido señales contenidos en los dominios citosólicos de las proteínas transmembrana. Como parte de estas señales están

los voluminosos residuos hidrofóbicos que contienen tirosina o leucina. Son señales cortas, con arreglos lineales de aminoácidos. No son conservadas, son motivos degenerados donde 2 ó 3 tienen importancia crítica en la función desempeñada. Las señales de direccionamiento de proteínas en la vía endocítica permiten que desde la membrana plasmática las proteínas permanezcan formando parte de ella o sean internalizadas en los endosomas, que en la red trans Golgi viajen hasta la membrana plasmática o a los endosomas, o bien que desde los endosomas sean reciclados a la membrana plasmática o a los lisosomas. En estas decisiones de direccionamiento en la célula participa también una maquinaria molecular que reconoce a aquellas señales y libera las proteínas a sus destinos tentativos.

Lisosomas

1. Generalidades.

Los lisosomas son organelos rodeados de membrana de alrededor de 250 a 500 μm , su nombre se debe a que el organelo puede lisar es decir romper o degradar productos dentro de la célula, como proteínas, ácidos nucleicos (ADN, ARN), carbohidratos y lípidos. Su ruptura en una célula causaría la destrucción total de ésta. Tienen una membrana que rodea al lisosoma y que contiene una mezcla de enzimas hidrolíticas que sirven como el principal compartimiento degradativo para macromoléculas dentro del sistema vacuolar. Son el destino final de muchos materiales celulares endocíticos, autofágicos y secretorios marcados debidamente con una señal para su destrucción. La degradación en los lisosomas es crítica en muchos procesos fisiológicos incluyendo el recambio de proteínas normales de la célula, los productos de la degradación de las proteínas pueden ser reutilizados por la célula, la regulación en cadena de los receptores, la liberación de los nutrientes endocitados, la inactivación de organismos patógenos y el procesamiento de antígenos. Los lisosomas juegan un rol fundamental en la homeostasis de iones metálicos y en la reparación de membranas.

La identificación de los lisosomas al microscopio basado en la apariencia es difícil debido a la heterogeneidad de formas. La identificación de los lisosomas

es más precisa a través de proteínas integrales de membranas altamente glicosiladas, denominadas **Lamp** (proteínas de membrana asociada al lisosoma), **Limp** (glicoproteína de lisosomas de rata de 35 a 50 kDa), **Lgp** (glicoproteínas lisosómicas). Los lisosomas tienen la característica del lumen ácido, albergando numerosas hidrolasas dependientes de un medio ácido. El gran espectro de enzimas degradativas contenidas en los lisosomas asegura la completa digestión de los materiales liberados a los lisosomas.

En los lisosomas están ausentes los receptores manosa fosfato catión dependiente (cd) y catión independiente (ci) que los distingue del último compartimiento endosómico.

2. Formación de lisosomas.

Los lisosomas se forman a partir del Golgi a través de compartimientos endosómicos. Hay dos modelos propuestos para la biogénesis de los lisosomas, uno es el modelo de maduración de los lisosomas que implica la formación de endosomas tempranos por coalescencia de vesículas originadas en la membrana plasmática. La remoción de vesículas reciclables y la adición de vesículas de la red trans Golgi transforma estos endosomas en endosoma tardíos y eventualmente lisosomas.

El otro modelo de transporte vesicular propone que los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y los lisosomas son compartimientos estables. El transporte procede desde los endosomas tempranos a través de vesículas transportadoras de endosomas con características de un cuerpo multivesicular, a endosomas tardíos los cuales maduran a lisosomas.

Las interacciones entre endosomas tardíos y lisosomas incluyen el modelo "kiss and run", contacto transiente entre endosomas tardíos y lisosomas. Este modelo propone que los endosomas y los lisosomas sufren ciclos repetidos de fusión y fisión permitiendo la transferencia de materiales y mantención de los lisosomas maduros. Una reciente variación de este modelo propone la fusión de endosomas tardíos con lisosomas, dando origen a un organelo híbrido con una subsecuente reformación de los lisosomas.

Vías de direccionamiento de proteínas desde red Trans Golgi al lisosoma. Las hidrolasas destinadas a los lisosomas llevan covalentemente unida la marca de manosa-6-fosfato que se une a los receptores de manosa-6-fosfato ubicados en la membrana de la red trans Golgi. El complejo hidrolasa-receptor va incorporado a vesículas hasta los endosomas tempranos o tardíos. Aquí en los endosomas, las hidrolasas se disocian del receptor y son liberadas a los lisosomas, mientras los receptores se reciclan de regreso a la red trans Golgi. Otras vías independientes de manosa-6-fosfato existen aparentemente como vías directas y son las de las proteínas integrales del lisosoma, como las proteínas Lamp-1 (Lamp: proteínas de membrana asociadas al lisosoma), que van directamente desde la red trans Golgi al lisosoma o también como vía indirecta desde el Golgi a la membrana plasmática y luego a los endosomas.

El direccionamiento de proteínas de los receptores de manosa fosfato y de las proteínas lisosómicas es mediado por señales presentes en los dominios citoplasmáticos de estas proteínas. Las señales son reconocidas por moléculas citosólicas que son reclutadas en las membranas en los sitios de formación de las vesículas como red trans Golgi, membrana plasmática y endosomas. Las moléculas que reconocen las proteínas a transportar son los complejos adaptadores AP-1, AP-2, AP-3 y AP-4.

AP-1 juega un rol como reciclador de receptores de manosa-6-fosfato y como mediador del transporte de receptores de manosa-6-fosfato y proteínas integrales de los lisosomas desde la red trans Golgi a los lisosomas.

AP-2 está implicado en una rápida internalización desde la membrana plasmática y probablemente participan en la endocitosis de los receptores de manosa-6-fosfato y tráfico de las proteínas de las membranas lisosómicas a través de la vía indirecta hasta los lisosomas.

AP-3 ha sido implicada principalmente en la biogénesis de organelos relacionados a los lisosomas y participaría también en el direccionamiento de proteínas de algunas proteínas de membrana lisosómica a los lisosomas desde sitios intracelulares (red trans Golgi o endosomas).

AP-4 se localiza en la red trans Golgi y podría estar implicada en el direccionamiento de proteínas de moléculas a los lisosomas, pero no hay

evidencias para confirmar esto. El complejo COP I media el direccionamiento de proteínas de proteínas entre los endosomas tempranos y tardíos. Así los complejos AP y COP I participan en el direccionamiento en la ruta a los lisosomas, aunque todavía no es muy claro cuales de estos complejos son responsables primariamente del marcaje del volumen de proteínas lisosómicas a los lisosomas.

Otra familia de proteínas de cubierta que facilitan el transporte de proteínas desde la red trans Golgi al sistema endosoma/lisosoma son las proteínas GGA, con tres miembros en los mamíferos: GGA1, GGA2 y GGA3. Esta proteínas se localizan en las yemas y en las vesículas con cubiertas en el área de la red trans Golgi. El reclutamiento de las GGA a la red trans Golgi es mediada por factores de ADP-ribosilación de la familia de proteínas ARF (que significa factor de ribosilación de ADP), en virtud de una interacción directa entre la región GAT, una región de unión de ligandos variable de las GGA y el GTP unido a ARF. El dominio GAE en el carboxilo terminal de las GGA interactúa con gama-sinergina, una potencial molécula regulatoria. Algunas GGA tienen una región GAT que se une a la clatrina.

Rabs y SNARE implicadas en el transporte a los lisosomas.

Una vez que las vesículas transportadoras se forman con las proteínas cargo direccionados en el interior, las vesículas deben ser marcadas y fusionadas a compartimientos aceptores. Una clase de proteínas pequeñas que unen GTP, denominadas Rab, se localizan en la membrana plasmática y en los organelos de las vías secretoras y endocíticas y funcionan en el transporte de vesículas y en el proceso de anclaje y fusión. En la etapa de unión de GTP, las proteínas rabs unen las membranas y reclutan las moléculas regulatorias y efectoras del anclaje y fusión. Rab-7 y Rab-9 se localizan en la superficie de los compartimientos endocíticos tardíos. Rab-7 se requiere para el transporte al lisosoma y Rab-9 media el reciclaje de los receptores de manosa fosfato desde el endosoma tardío a la red trans Golgi.

El marcaje y la fusión de membranas requieren también de las proteínas de membrana asociadas a vesículas VAMP/sinaptobrevina, syntaxina y familias de proteínas asociadas a sinaptosoma SNAP-25, de 25 kDa. Estas proteínas son

denominadas en conjunto como receptores de proteínas de anclaje (SNAP) factor N-etilmaleimida sensibles (NSF) o SNARE. Sintaxina-7 y VAMP-7 median la fusión heterotípica y homotípica que implican a los lisosomas. Sintaxina-8 se encuentra en los endosomas, lisosomas y posiblemente en la red trans Golgi y media el direccionamiento desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos. El grado en que estas u otras SNARE se requieren para el direccionamiento de los lisosomas maduros es incierto. Las interacciones funcionales entre las v-SNARE (SNARE de membrana de vesículas) y t-SNARE (SNARE del organelo blanco) en múltiples vías de direccionamiento y entre las v-SNARE o t-SNARE con varios otros sistemas sugiere la participación de efectores Rab y lípidos modificados.

Rutas para la liberación de materiales desde la vacuola de la levadura.

Al menos seis vías están implicadas en el tráfico vacuolar de la levadura:

1. Endocitosis desde la superficie celular
2. Vía del citoplasma a la vacuola
3. Autofagia
4. Herencia de vacuolas durante la división celular
5. Vía de la carboxipeptidasa Y (CPY) desde el trans Golgi
6. Vía de la fosfatasa alcalina (ALP) desde el trans Golgi

La endocitosis es esencial en la regulación de los niveles de proteínas de membranas que funcionan como receptores y requiere de una comunicación regulada entre los mediadores endocíticos y el citoesqueleto de actina.

3. Endosoma primario.

El sistema endosómico juega un importante rol en el procesamiento de nutrientes derivados extracelularmente, en la regulación de receptores activados de la superficie celular, mantención de la homeostasis de la membrana y defensa contra patógenos. Los ligandos internalizados son vaciados al inicio a los endosomas, donde ocurre una serie de eventos de clasificación o direccionamiento. Subsecuentemente, los ligandos o complejos ligando-receptor

son vaciados a los lisosomas para su degradación o bien reciclados a la membrana plasmática o al Golgi.

4. Membrana del lisosoma.

La membrana limitante de los lisosomas está conformada por una familia de proteínas altamente glicosiladas cuya función sería mantener la estabilidad y la integridad de la membrana del lisosoma, a estas proteínas más abundantes en la membrana del lisosoma se les denomina proteínas mayores de la membrana del lisosoma, esta función es atribuida a la alta glicosilación de estas proteínas. La superficie interna de la membrana limitante del lisosoma está completamente tapizada por una capa de carbohidratos, generando un glucocálix continuo. El principal rol de estas proteínas, presentes en lisosomas y endosomas tardíos, es la protección de la membrana lisosómica de la degradación de las hidrolasas ácidas que contiene el lisosoma. Los lisosomas contienen además en sus membranas un ácido graso especial que no es atacado por las lipasas, es el ácido liso-bis-fosfatidico.

Además la membrana del lisosoma participa en los procesos de autofagia, en la fusión de membranas de organelos secretorios, en la biogénesis de lisosomas y endosomas e interacción de las vesículas del sistema fusión-fisión vesicular. En común son proteínas integrales de membrana que tienen dominios altamente glicosilados al interior del lumen y un pequeño dominio citoplasmático de 10-11 aminoácidos como Lamp-1, proteína de membrana asociada al lisosoma de 120 kDa. Lamp1 se encuentra distribuida en la membrana de los endosomas tardíos y los lisosomas. A veces también se ha detectado en bajas concentraciones en la membrana plasmática y en los endosomas tempranos. Lamp1 se integra a los lisosomas a través de la vía endocítica a partir del Golgi, el mecanismo de integración al lisosoma es distinto a la integración de las proteínas solubles que lo hacen a través del receptor de manosa-6-fosfato. En el caso de Lamp-1, y de las otras proteínas de membrana del lisosoma es a través de la señal ubicada en el dominio citoplasmático de la proteína, en el extremo carboxilo terminal y es separada en la cisterna trans del Golgi de las demás proteínas destinadas a otros compartimientos y de aquellas lisosómicas solubles. Desde allí son transportadas hasta los endosomas tardíos y enseguida a los lisosomas.

La fusión de los lisosomas con la membrana de otros organelos es un paso clave para la adquirir los materiales internalizados o biosintetizados a ser degradados. Los lisosomas se fusionan con endosomas tardíos y fagosomas (fusión heterotípica, a la fusión que ocurre entre distintos organelos) y también con otros lisosomas (fusión homotípica, fusión que ocurre entre dos organelos iguales).

La membrana de los lisosomas está compuesta de fosfolípidos y colesterol y una abundante cantidad de carbohidratos. Más aún algunas proteínas de membrana deben mediar la función de acidificar el lumen del lisosoma como es la bomba de protones ubicada en la membrana del lisosoma. Además debes ser trasladados a través de la membrana los aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos productos de la actividad degradativa del lisosoma y los nutrientes como la vitamina B12 y el colesterol.

Componentes menores en la membrana del lisosoma:

Los componentes menores de la membrana del lisosoma tienen roles tan importantes como la mantención del pH ácido interno del lisosoma. Esta función es desarrollada por una bomba de protones vacuolar que es una protón-ATPasa tipo V ubicada en la membrana del lisosoma que usa la energía derivada de la hidrólisis del ATP para impulsar la traslocación de protones desde el citoplasma al lumen lisosómico. La bomba de protones es un complejo proteico conformado por 13 subunidades. Ocho de estas subunidades se encuentran en el lado citosólico de la membrana del lisosoma y es responsable de la hidrólisis del ATP. Cinco subunidades forman la parte integral del complejo y median la traslocación de protones. Este proceso es contra gradiente, por esto necesita del ATP. Las personas que presentan una de las subunidades de la fracción del complejo encargada de la traslocación de protones defectuosa, específicamente la subunidad de 116 kDa, producto de una mutación, desarrollan severas osteopetrosis, por una inhibición de la desmineralización en la matriz del hueso, producida a raíz de este defecto de una deficiente acidificación de los lisosomas.

Otros componentes menores de la membrana del lisosoma son los transportadores de aminoácidos que trasladan los aminoácidos resultantes de la degradación de proteínas que tiene lugar en el lisosoma al citoplasma, para

ser usados en la síntesis de proteínas. Uno de estos transportadores es el transportador de cisteína. El transportador defectuoso producto de mutación del gen CTNS que codifica al receptor de cisteína, causa cistinosis que afecta la función renal. Otro transportador identificado es el transportador de lisina.

Los transportadores de monosacáridos envían al citoplasma los monosacáridos resultantes de la degradación de oligosacáridos en el lisosoma, como el transportador de ácido siálico denominado sialina. Una mutación en el gen AST que codifica la sialina, produce la enfermedad de Salla.

Un posible transportador de nucleótidos es la proteína LAPPTM4 alfa.

Un transportador de colesterol, codificado por el gen NPC-1, cuya mutación causa el síndrome de Niemann- Pick tipo C.

Un transportador de vesículas sinápticas en las neuronas y sensor del pH ácido del lisosoma, codificado por el gen CLN3, cuya mutación causa la lipofuscinosis ceroides neuronal o enfermedad de Batten.

Un transportador de hierro, NRAMP2, asociado a transferrina.

Algunas proteínas de membrana del lisosoma están implicadas en funciones enzimáticas como LALP70 implicada en el metabolismo de los nucleótidos di- y trifosfato. LAP es una fosfatasa ácida implicada en desfosforilación. La enzima acetil Co A: alfa glucosamida N-acetil transferasa, responsable de la transferencia de los grupos acetilos al heparan sulfato. Una mutación en el gen de esta enzima causa la enfermedad de San Filippo Tipo C (MPS III C), esta es una enfermedad de almacenamiento lisosómico en las cuales el heparan sulfato no digerido y la heparina se acumulan en los lisosomas.

Bomba de Protones.

La **bomba de protones** dependientes de ATP de endosomas tardíos y lisosomas corresponde a ATPasas que son responsables de la acidificación de estos compartimientos. La acidificación de los compartimientos vacuolares juega

un rol importante en una variedad de procesos de tráfico de membrana como la endocitosis mediada por receptor, la acidificación de endosomas que sirve como una señal que activa la liberación de los ligandos internalizados de sus respectivos receptores, como ocurre en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o insulina. Este desacoplamiento permite que los receptores ocupados ya liberados de sus ligandos reciclen a la superficie celular donde pueden ser reutilizados, mientras que los ligandos pueden ser marcados con destino a los lisosomas para ser degradados.

La acidificación de los endosomas es requerida también para la formación de vesículas transportadoras de endosoma que están implicados en el movimiento de ligandos en la vía endocítica, y también favorece la fusión de membranas endosómicas y envoltura del virus de la influenza, en este último caso provoca la infección viral.

En el marcaje intracelular de enzimas lisosómicas recientemente sintetizadas, la acidificación vacuolar juega un rol similar al de la endocitosis. En este caso, las enzimas lisosómicas unidas al receptor manosa-6-fosfato son liberadas al último compartimiento de reciclaje (endosoma tardío) donde el pH ácido causa la disociación, receptor manosa-6-fosfato-ligando (donde el ligando es una proteína con la marca manosa-6-fosfato), permitiendo que los receptores reciclen al trans Golgi y a las enzimas ser dirigidas a los lisosomas. En los lisosomas y en la vacuola de las levaduras el pH interno ácido permite la activación de las hidrolasas ácidas implicadas en la degradación de macromoléculas.

El pH ácido es generado por bomba de protones que tienen dos dominios funcionales, el dominio citoplasmático V1 de 570 kDa y el dominio de membrana V0 de 260 kDa. El dominio citoplasmático es el responsable de la unión del nucleótido, ATP, y de la actividad catalítica. Este dominio está compuesto por 9 subunidades diferentes, 2 de las cuales, con tres moléculas cada una forma un hexámero, responsable de la hidrólisis y unión del ATP, las restantes participan en la activación y ensamble de este dominio para conformar la molécula completa, que en su forma general se asemeja tanto en estructura y conformación de las subunidades a las partículas F de la membrana interna de la mitocondria, al estar conformada por una base anclada a la membrana, un pedúnculo y una cabeza rotatoria. El dominio V₀ de la ATPasa del sistema

endocítico, participa de la traslocación del protón a través de la membrana. Este dominio consta de proteínas altamente hidrofóbicas, denominadas proteolípidos, cuya rotación permite la entrada del protón. Además, es posible que en este dominio se puedan formar canales de agua que permiten a los protones tener acceso a grupos carboxilos escondidos de los proteolípidos.

5. Funciones de los lisosomas.

Los lisosomas contienen numerosas enzimas que cumplen funciones degradativas, algunas de estas son:

- Nucleasas: degradan ácidos nucleicos, rompen enlace fosfodiéster.
- Proteasas: degradan proteínas, rompen enlace peptídico.
- Lipasas: degradan lípidos.
- Glucosidasas: degradan carbohidratos.

Exocitosis y endocitosis

Autofagia.

La autofagia es un complejo proceso celular que implica rearrreglos dinámicos de membrana en condiciones fisiológicas. Luego de la inducción de la autofagia, en condiciones de hambruna, el citoplasma es secuestrado en vesículas y vaciado a organelos de degradación, el lisosoma en mamíferos y la vacuola en la levadura. El proceso es único y convierte el material intracelular en uno extracelular. Constituye un proceso de adaptación a condiciones ambientales diferentes. Cuando en condiciones experimentales se cultivan células sin los nutrientes adecuados a su sobrevivencia, en el citoplasma se forman rápidamente vacuolas o vesículas en el citosol conteniendo un gran volumen de proteínas y organelos. Estas vesículas se denominan autofagosomas y tienen corta vida media, de alrededor de minutos, antes que las hidrolasas lisosómicas inicien la degradación del contenido de macromoléculas, permitiendo la liberación de unidades monoméricas desde el lumen lisosómico al citosol. Esta forma de autofagia se denomina macroautofagia. La membrana del autofagosoma se caracteriza por una relativa ausencia de proteínas

transmembrana, lo que la hace una vesícula transportada al lisosoma, destinada a la degradación hidrolítica del lisosoma. La autofagia inducida por hambruna no es selectiva ya que tiene el propósito de generar bloques de construcción necesarios para que la célula pueda sobrevivir a la inanición. En los mamíferos el hígado, que es un órgano muy noble, tiene una alta capacidad de autofagia, lo que permite en condiciones de hambruna suministrar bloques de construcción molecular durante hambrunas.

La **autofagia**, junto con el proteasoma son los dos mecanismos degradativos que permiten la degradación de proteínas, siendo la autofagia el principal mecanismo para la degradación de proteínas de larga vida, y el único mecanismo para el recambio de organelos, incluyendo mitocondrias y peroxisomas, que ocurre cuando estos organelos están en desuso o funcionan mal. La membrana que rodea a organelos en desuso proviene del retículo endoplásmico liso.

La **perioxofagia** es otra forma de autofagia, destinada exclusivamente a la degradación de peroxisomas. Se ha descrito la macropexofagia y la micropexofagia dependiendo si el peroxisoma es englobado completamente o parcialmente.

Fagocitosis.

Rutas endocíticas en mamíferos. Johannes y Lamaze (2002) han propuesto 5 rutas en mamíferos.

- **Macropinocitosis** es una respuesta transitoria a factores de crecimiento y agentes mitógenos (que promueven o estimulan la mitosis) que contribuye a la incorporación de la fase fluida a través de la formación de grandes vesículas de tamaño heterogeneo. Los macropinosomas corresponden a estructuras grandes heterogeneas, vesiculares, dinámicas de rango 0,5-2 micrómetros.

La **macropinocitosis** puede ocurrir en forma constitutiva en algunas líneas celulares. Contribuye a la incorporación de antígenos y marcaje de células que presentan antígenos. La formación de macropinosomas sigue al plegamiento de la membrana plasmática, y conduce a la internalización

masiva de membrana desde la superficie celular y es probable que sea regulada por vías de reciclaje en la endocitosis. Probablemente en la activación de este proceso participa ARF6-GTPasa.

- **Endocitosis asociada a clatrina**, es la formación de fositas o depresiones en la superficie de la membrana plasmática que en la cara citoplasmática está recubierta de clatrina formando un canastillo que da soporte a la fosita o depresión. Se forman vesículas del rango de 120 nm.
- **Invaginaciones sin cubierta proteica**, se hunden para formar vesículas lisas que comúnmente se observan a la microscopía convencional en diversas células y participan en la incorporación de la fase fluida a la célula.
- **Balsas lipídicas** (lipid rafts), son conjuntos de lípidos en las membranas ricos en colesterol que son capaces de invaginarse formando vesículas de muy pequeño tamaño a través de cual ingresan sustancias a las células.
- **Caveolas** son vesículas no originadas por endocitosis que ingresan sustancias a la célula por un proceso no mediado por clatrina.

Endocitosis y Pinocitosis.

- Endocitosis mediada por clatrina
- Endocitosis mediada por receptor
- Caveolas y caveosomas

Las **caveolas** son depresiones planas de superficie lisa de 50-80 nm de diámetro que cubren la superficie de células de diferentes tejidos, cubriendo hasta el 35 % de la superficie celular. Las caveolas son estructuras estacionarias y permanecen en el lugar debido a que son sustentadas por citoesqueleto cortical de actina subyacente a la membrana plasmática. Sólo luego de algunas señales específicas se desprenden de la membrana como vesícula endocítica. Las caveolas son abundantes en adipocitos, endotelio, músculo, pero no se han detectado en linfocitos y algunas células nerviosas, su forma varía dependiendo de la célula donde se encuentren. Participan en los procesos endocíticos constitutivos aparentemente y se caracterizan por la presencia de caveolina-1, denominada también VP21, una proteína integral de membrana que consta de 33 aminoácidos que forman un dominio central hidrofóbico, que forma un loop o vuelta en la capa bilipídica de la membrana, flanqueado por dominios citoplasmáticos expuestos N- o C-terminales. Esta proteína une colesterol y

ácidos grasos y es palmitoilada (un ácido palmítico, un ácido graso de 16 carbonos) en su extremo C terminal y forma oligómeros de alto peso molecular. Se cree que esta propiedad es importante para la formación de las caveolas pero el mecanismo exacto no es conocido aún. El ingreso de las sustancias a través de caveolas desembocan en caveosomas, y desde el caveosoma pueden ingresar al Golgi o al Retículo endoplásmico o al núcleo. No está claro si estas sustancias pueden volver a la membrana plasmática o a endosomas.

En la formación de la vesícula que va al interior de la célula, o **caveosoma**, participa la dinamina, una GTPasa que también participa en la formación de las vesículas endocíticas con cubierta de clatrina, uniéndose al cuello de la caveola. La dinamina une los extremos de la depresión y cierra la vesícula, formando el caveosoma. En este proceso, estudiado en el ingreso del virus SV40 ("simian virus"), que gatilla una cascada de señales que induce a la fosforilación de tirosin quinasas lo que produce en las caveolas unidas a actina del citoesqueleto, se depolimerice la actina transitoriamente, reclutándose los monómeros de actina alrededor de la caveola que transporta el virus, formando un parche de actina. Concomitantemente la dinamina es reclutada en la caveola que transporta el virus produciéndose una explosiva polimerización de actina en el parche de actina. La vesícula cargada con el virus se desprende de la membrana plasmática y se puede mover al citosol. Luego de la internalización, el citoesqueleto de actina vuelve a su posición normal.

El **caveosoma** es un compartimiento interno preexistente de pH neutro, no degradativo, que contiene caveolina en la membrana plasmática y esta es rica en colesterol y glicoesfingolípidos. Participan en la internalización de componentes de membrana como glicoesfingolípidos, proteínas con anclaje GPI, ligandos extracelulares como ácido fólico, albúmina, toxinas bacterianas (cólera, tétanos). Los caveosomas son estructuras tubovesiculares, heterogeneas en tamaño y forma y las partículas virales aparecen como porotos en una vaina, como se ha visualizado a la microscopía electrónica. Durante la acumulación de partículas virales se hacen muy dinámicos, desprendiéndose desde el caveosoma extensiones tubulares más grandes cuyas membranas carecen de caveolina 1. Estas vesículas son transportadas a lo largo de microtúbulos hasta el retículo endoplasmático.

Cabe señalar que la caveolina está presente además en caveosomas, membrana plasmática y TGN (del inglés, red Trans Golgi).

En resumen, la función de las caveolas en la célula es mantener la homeostasis de colesterol, reciclaje de las proteínas con anclaje GPI, transporte de glicosfingolípidos, transcitosis de componentes del plasma sanguíneo (albúmina).

La transcitosis es el paso de las sustancias a través de vesiculación en las células epiteliales o endoteliales desde la superficie apical de la célula a la región basal, o viceversa, como ejemplo adicional se puede citar el paso de inmunoglobulina G a través del epitelio mamario desde el plasma sanguíneo a la leche materna.

Balsas lipídicas ("lipid rafts").

Son regiones de la superficie celular organizados como microdominios basados en lípidos que participan en procesos endocíticos independientes de dinamina. Las balsas lipídicas de la membrana plasmática son consideradas como islas altamente ordenadas de colesterol y lípidos saturados, son móviles lateralmente en el plano de la bicapa desordenada más fluída de lípidos no saturados. Las balsas lipídicas son relativamente resistentes a la acción de detergentes no iónicos que solubilizan las regiones lipídicas adyacentes a las balsas. En las balsas se incluyen proteínas con anclaje GPI, glicerol fosfoinositol, a aquellas proteínas con doble grupo acilo como tirosín quinasa, las de la familia Src, y subunidades de las proteínas G, también proteínas palmtoiladas y asociadas a colesterol como caveolinas. Algunas proteínas pueden asociarse en forma regulada a las balsas lipídicas como las proteínas H-ras. La endocitosis mediada por balsas, es una vía micropinocítica específica para proteínas con anclaje GPI, es un proceso independiente de caveolina 1, característico de las caveolas, por lo tanto es un ingreso a la célula independiente de caveolas, independiente de dinamina y de clatrina.

Se les ha definido como conjuntos dinámicos de colesterol y glicosfingolípidos que están presentes en el plano lateral de las membranas, tienen importancia en el transporte lateral de membranas. Se ha demostrado

experimentalmente que el colesterol y los esfingolípidos pueden organizarse en dominios de fase líquida ordenada separados. Estos microdominios se estabilizan a través de interacciones con el citoesqueleto y pueden agregarse entre ellos para formar plataformas mayores en respuesta a variados estímulos. Dada su naturaleza, existe la posibilidad del transporte endocítico de sustancias específicas al interior de la célula, de hecho hay transporte, pero este no ha sido comprobado experimentalmente. Mutaciones de genes implicados en la biosíntesis de esteroides o ceramidas bloquean totalmente la incorporación endocítica.

Exocitosis, ectocitosis. Ambos procesos implican la salida de sustancias desde la célula, y regulan la composición proteica de la membrana. En ambos procesos es posible que se liberen vesículas. En el proceso de exocitosis, se liberan exosomas, e tanto que en la ectocitosis, ectosomas.

Exosomas y ectosomas. Ectocitosis lleva a la formación de ectosomas, también denominados micropartículas. Estas vesículas generadas por yemación desde la célula hacia el exterior y posterior desprendimiento de la vesícula. Los exosomas son vesículas generadas por proceso endocítico que genera vesículas que se acumulan dentro de cuerpos multivesiculares (MVB) y son liberados por exocitosis. Exosomas y ectosomas difieren en tamaño y composición. La mayoría de las células produce exosomas y ectosomas, excepto los eritrocitos que producen sólo ectosomas en condiciones de estrés. En la formación de los eritrocitos, sin embargo, la pérdida de los receptores de transferrina ocurre por exocitosis. Otro ejemplo de liberación de ectosomas ocurre en los condrocitos que liberan continuamente ectosomas cargados con anexina I, que induce la precipitación del calcio y formación de hueso.

Retrómero.

El retrómero es un complejo proteico que participa en la vía de recuperación de receptores desde el sistema endocítico al TGN. Se ha demostrado su participación en la recuperación de un tipo de MPR (CI-MPR: receptor de manosa fosfato catión independiente). El retrómero se encuentra presente en endosomas tempranos y de maduración intermedia entre endosoma temprano y tardío, principalmente. El retrómero impide la liberación de los

receptores a los lisosomas. El retrómero es un complejo heteropentamérico tanto en levaduras como en mamíferos. En levaduras está formado por Vps5p, Vps17p, Vps26p, Vps29p, Vps35p. La subunidad Vps35p reconoce un dominio citosólico de Vps10p, que es equivalente de MPR de mamíferos, y forma un subcomplejo estable con Vps29p. Vps5p y Vps17p unen PIP (fosfoinositol fosfato). Estos dominios tienden a oligomerizar y por lo tanto sirven como andamio para el ensamble de posibles cubiertas de membrana que conducen a la formación de vesículas. Vps26 se ha propuesto que promueve el ensamble de carga selectiva del subcomplejo Vps35p-Vps29p con el subcomplejo estructural Vps5p-Vps17p. En los mamíferos las subunidades se denominan hVps26p, hVps29p, hVps35p y dos homólogos de Vps5p de la levadura que son las nexinas de direccionamiento o clasificación 1 y 2 (Snx1, Snx2).

La unión del retrómero al receptor de manosa 6 fosfato (MPR) se produce en TGN en mamíferos o en su equivalente en la levadura el Golgi Tardío. El dominio citosólico de MPR en el Golgi, contiene señales agrupadas de dileucina en el carboxilo terminal, proteínas que unen ARF que contiene orejas gama y AP1. Estas interacciones cooperan al empaquetamiento de los complejos MPR-hidrolasas en vesículas con cubierta de clatrina que yeman desde TGN y llevan los complejos hasta endosomas tempranos o más avanzados. En la levadura los complejos MPR-hidrolasa se disocian por causa del pH ácido de los endosomas, luego de lo cual las hidrolasas son transportadas junto con la fase fluída al lumen del lisosoma mientras que los MPR reciclan al TGN. En mamíferos la subunidad hVps35 reconoce el dominio citosólico de CIMPR, que no corresponde a la señal YSKV que es la señal implicada en la endocitosis, ni la señal de agrupamiento o cluster de dileucina, responsable del direccionamiento del receptor del TGN al endosoma. La función del retrómero es extraer los MPR desocupados desde vesícula intraluminales en endosomas a través de la captura de un compartimiento tubular de reciclamiento. En el reconocimiento de membranas altamente curvadas participan las sintaxinas del retrómero.

Proyecto Genoma Humano y la vía secretora

Las investigaciones realizadas con vistas a dilucidar la ubicación e identificación de los genes en la especie humana han logrado esclarecer la

participación de 103 genes en la vía secretoria:

- 7 genes participan en la glicosilación
- 10 genes participan en el metabolismo de lipídilinositol
- 17 genes en la glicosilación primaria en el retículo plasmático
- 10 genes en el plegamiento de las proteínas
- 6 genes en la degradación de proteínas
- 11 genes en el transporte RE- Golgi
- 5 genes en el transporte retrógrado o inverso Golgi- RE
- 6 genes en la glicosilación en la cisterna media del Golgi
- 4 genes en la vesiculación
- 7 genes en la secreción
- 11 genes en la formación de membranas

Aplicación al área de la salud

1. Enfermedad de Parkinson (PD), un ejemplo de una patología conformacional.

La enfermedad de Parkinson, junto con la enfermedad de Alzheimer, encefalopatías producidas por priones, pertenecen a las denominadas enfermedades conformacionales (por conformación o disposición espacial defectuosa de una proteína), y demuestran una clara evidencia de la relación entre la funcionalidad coordinada del retículo endoplásmico y del **UPS** (sigla traducida del inglés que significa sistema ubiquitín-proteasoma). Este último sistema probablemente no esté funcionando bien, es decir, la degradación de proteínas marcadas con ubiquitinas mediada por este sistema sería poco eficiente, acumulándose proteínas en la célula que con el tiempo conllevaría a la muerte celular. La funcionalidad de UPS en estado normal se evidencia por una eficiente degradación de las proteínas. En estas patologías, a través de los años, se van acumulando selectivamente sustratos debido al estrés oxidativo, desregulación transcripcional, acumulación de proteínas tóxicas, inducción a la apoptosis debido al estrés del retículo endoplásmico, finalmente agregación de proteínas (denominados **agregasomas**, cuerpos que son producto de la acumulación de proteínas), causas por las cuales se produce la muerte celular.

La enfermedad de Parkinson, es una enfermedad neurológica que se manifiesta principalmente en adultos mayores que no se puede detener, controlar, ni prevenir, sólo los síntomas pueden ser reducidos mediante el uso de fármacos u otro.

Una de las manifestaciones de la enfermedad a nivel celular es la acumulación de proteínas (alfa sinucleína en la enfermedad de Parkinson) a nivel de la neurona, lo que también es característico de la enfermedad de Huntington (donde se acumula huntingtina), y de la enfermedad de Alzheimer (donde hay acumulación de beta-amiloide).

Investigaciones de los últimos 5 a 10 años han demostrado que estas acumulaciones de proteínas en el caso del Parkinson se deben a mutaciones del gen de la proteína, que afectan el correcto plegamiento, y además por la naturaleza hidrofóbica de la proteína, esta tendería a formar acúmulos (agregasomas), favorecido por modificaciones posttraduccionales de la proteína como glicosilación, nitración y fosforilación. En el caso de PD las mutaciones producidas en el gen pueden afectar la secuencia primaria de la proteína a causa de delección, sustitución, adición o duplicaciones internas en el gen; puede ocurrir también duplicación del gen normal completo, lo que produce una sobreexpresión del gen. La alta concentración de la proteína también favorecería la formación de agregasomas.

Otra forma por la cual se manifiesta la enfermedad es por alteración de genes responsables de la ubiquitinación, aunque en el caso de mutaciones en el gen parkin, que produce la proteína parkina, no se acumula como agregasomas. La parkina tiene actividad de ubiquitín ligasa, es decir es responsable de catalizar la formación de la unión de moléculas de ubiquitina a las proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma en el citoplasma.

Recientes ensayos *in vitro* han demostrado que al incentivar la acción de chaperonas (HSP70), mediante el uso de fármacos es posible disminuir el tamaño de los agregasomas.

Hay otras formas de Parkinson a nivel genético pero las mencionadas arriba tienen directa relación con la vía secretoria.

2. Enfermedades producidas por defectos enzimáticos en los lisosomas.

Estas enfermedades corresponden a defectos en las enzimas contenidas en los lisosomas y que producen acumulación de sustancias en la célula que son nocivas a la homeostasis celular. Casi todas estas enfermedades son causadas por defectos genéticos recesivos, es decir quienes manifiestan la enfermedad son homocigotos recesivos en este locus. Entre estas enfermedades se pueden mencionar Mucopolisacaridosis I (MPS I), enfermedad de Pompe, enfermedad de Gaucher, entre otras.

La mucopolisacaridosis I es causada por un gen recesivo que codifica la enzima alfa-L-iduronidasa. Las mutaciones causan ausencia de la enzima o una enzima defectuosa. Esto da por resultado la acumulación progresiva de glicosaminoglicanos (GAG) en el lisosoma que causa en el tiempo la destrucción por daño irreversible de las células y por ende del órgano afectado.

La enfermedad de Pompe es una enfermedad debilitante en adultos y en niños que manifiestan debilidad muscular y dificultades respiratorias, por pérdida de fuerza del diafragma. La causa de la enfermedad reside en una enzima la alfa glucosidasa ácida deficiente. Esta enzima es la responsable de degradar el exceso de glucógeno en el lisosoma, resultando por tanto la acumulación de glucógeno que interfiere con el funcionamiento del músculo.

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad recesiva autosómica desencadenada por la presencia de dos alelos mutados del gen de la glucocerebrosidasa, localizado en el brazo largo del cromosoma 1, en la región 21. Se han identificado a la fecha más de 100 alelos que al estado homocigoto causan la enfermedad debido a una disminución de la actividad catalítica de la enzima total o parcialmente o bien reducen su estabilidad o vida media. En individuos normales la glucocerebrosidasa degrada glucocerebrósido, un glucolípido proveniente de las membranas celulares de los leucocitos y eritrocitos envejecidos dentro de los lisosomas de las líneas de los monocitos/ macrófagos. En individuos con esta enfermedad se produce gran acumulación de glucocerebrósido dentro de los monocitos/macrófagos, estas se conocen como células de Gaucher que muestran un citoplasma con aspecto de papel arrugado debido a las fibrillas y depósitos acordonados de glucocerebrósido. Estas células se acumulan progresivamente en hígado, bazo y médula ósea.

Las mutaciones más comunes corresponden a mutaciones de punto que afectan la actividad enzimática, estas son designadas como N370S y L144P. Otras dos mutaciones de mayor envergadura no producen la enzima. Esta enfermedad tiene graves consecuencias neurológicas. Existen al menos 3 tipos sobre la base de su severidad neurológica. El tipo 1: no implica al sistema nervioso central, el tipo 2 y 3 implica al sistema nervioso central de forma aguda el primero y subaguda el segundo respectivamente. Estas son enfermedades multisistémicas, es decir afectan a varios órganos a la vez. Uno de los más afectados es el hígado que aumenta varias veces su volumen causando una hepatomegalia.

3. Fibrosis quística o fibrosis cística.

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria codificada por un locus ubicado en el brazo largo del cromosoma 7. Su manifestación ocurre en individuos que son homocigotos para el alelo recesivo que produce la enfermedad. La manifestación fenotípica corresponde a la alteración de la forma de un canal de cloruros. Es una proteína defectuosa que no cumple con la función. Las mutaciones en el gen que produce la fibrosis quística pueden ser de varios tipos. Se han descrito al menos una veintena de mutaciones agrupadas en 4 clases que implican a productos defectuosos que son degradados en la célula antes de alcanzar la membrana plasmática (Tabla 2, Figura 3).

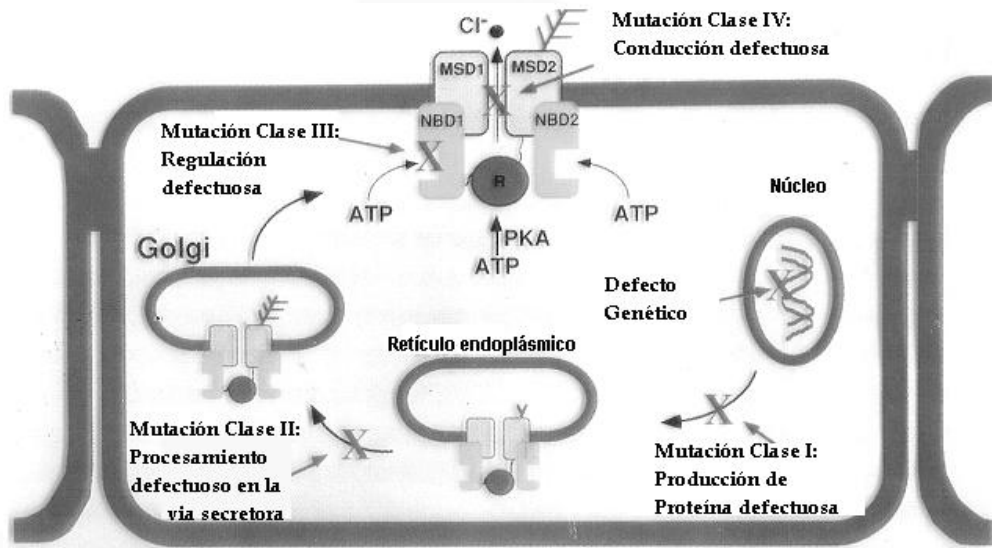
El canal tiene distintos dominios que conforman el poro, dos dominios que fijan ATP y el dominio regulador, que es una especie de tapón que se articula por un brazo y abre o cierra el poro. Las mutaciones por lo tanto bloquean el paso de cloruros desde el interior de la célula epitelial al exterior. Los canales de cloruro se encuentran en forma normal en la cara apical de la célula epitelial.

Tabla 2. Mutaciones recesivas que producen fibrosis quística. (Welsh MJ & AE Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 73 (7): 1251-1254.).

Clases de Mutación	Defecto	Ejemplo	Dominio afectado en la proteína	Aspectos clínicos
I	Producción de proteína defectuosa causada por mutaciones sin sentido y corrimiento marco de lectura	G542X 3905InsT 621+G-T	NBD1 NBD2 MSD1	Insuficiencia pancreática
II	Procesamiento o maduración de la proteína en la vía secretora	Δ I507 Δ F508 (*) N1303K	NBD1 NBD1 NBD2	Insuficiencia pancreática
III	Regulación del transporte de cloruros. Falta de reconocimiento de nucleótidos	G551D G1244E	NBD1 NBD2	Insuficiencia pancreática
IV	Conducción defectuosa del cloruro	R117H (**)	MSD1	Suficiencia pancreática
<p>NBD: dominio que une nucleótidos MSD: dominio de la proteína que atraviesa la membrana Δ: (delta): letra griega que indica delección, es decir mutación que causa la ausencia de uno o varios desoxinucleótidos en la secuencia de ADN (*) causa un procesamiento defectuoso y también afecta la regulación del canal de sodio. Esta es la mutación más frecuente (**) causa una conducción defectuosa y disminución del tiempo que el canal se mantiene abierto</p>				

Figura 3. Modelo propuesto para explicar el camino que sigue en la célula la formación de un canal de cloruros y la forma como se manifiestan las mutaciones.

Modificado de Welsh MJ & AE Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 73 (7): 1251-1254. (Con permiso de la editorial)*.



*Agradecimientos: Agradecemos a los autores y a la editorial la facilitación de las figuras en este capítulo.

Bibliografía:

Herbert, DN, Garman, SC, Molinari, M. 2005. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends in Cell Biology* 15(7):364-370.

Johannes y Lamaze (2002). Clatrin-dependent or not: Is it still the question? *Traffic*. 3:443-451.

Römisch, K. 2005. Endoplasmic Reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 21: 435-456.

Welsh MJ & AE Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73 (7): 1251-1254.

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C



CAPÍTULO III

ARMAZÓN CELULAR Y ORGANELOS: CITOESQUELETO, MITOCONDRIA, PEROXISOMAS Y NÚCLEO

Fidelina González, Gabriela Sconzo, Giussepina Turturici, Fabiana Geraci, Giovanni Giudice
Depto Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo. Università di Palermo. Palermo. Italia.

1. Citoesqueleto, organización para la arquitectura y los movimientos de la célula.

1. Microtúbulos.
2. Centrosoma.
3. Filamentos intermedios.
4. Microfilamentos.
5. Proteínas motoras asociadas.

2. Mitocondria, organización para la producción de energía y participación en la herencia.

1. Compartimentos mitocondriales, localización de funciones mitocondriales.
2. Transporte de proteínas de la mitocondria codificadas en el núcleo.
3. Origen de los fosfolípidos en las membranas de la mitocondria.
4. ADN y genes mitocondriales.

3. Peroxisomas, organización para la destoxificación celular, metabolismo de lípidos y de hormonas esferoidales.

1. Biogénesis de los peroxisomas y transporte de las proteínas peroxisomales.
2. Funciones de los peroxisomas: Metabolismo y Destoxificación.

4. Núcleo, organización para el almacenamiento y procesamiento de la información genética.

1. Envoltura y poros nucleares.
2. Lámina nuclear.
3. Cromatina y cromosomas.
4. Compartimientos nucleares y función en el procesamiento de la información genética.

5. Enfermedades producidas por mutaciones en proteínas que conforman el citoesqueleto.

6. Enfermedades producidas por mutaciones mitocondriales.

7. Enfermedades producidas por defectos en los peroxisomas, peroxisomopatías: Enfermedad de Zellweger.

8. Laminopatías.

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C

Citoesqueleto

Citoesqueleto organización para la arquitectura y los movimientos de la célula.

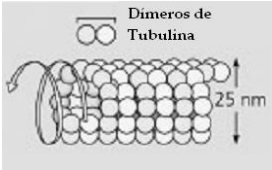
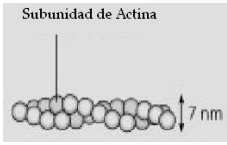

Es una estructura celular dinámica que está compuesta por filamentos y microtúbulos que se extienden por todo el citoplasma. Cumple diversas funciones en la célula entre las cuales está el mantener la forma celular, regular la posición de los organelos, dirigir y ejecutar el movimiento celular y el control transmembrana de la célula, el transporte intracelular, la endocitosis y fagocitosis, la dirección de crecimiento de la neurona, el desarrollo de la capilaridad, la migración de los leucocitos, la quimiotaxis celular, la migración de fibroblastos en cicatrización de heridas, la mecanosensibilidad del oído interno, la morfogénesis de embriones, la invasión y la metástasis de células cancerosas y el movimiento intracelular de bacterias.

Componentes de citoesqueleto. Los componentes del citoesqueleto son microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos.

Microfilamentos de actina de 5 a 9 nm de diámetro.

Componentes estructurales: En la célula podemos distinguir los monómeros de actina, los filamentos de actina, correspondientes a la disposición lineal de los monómeros de actina para formar unidades filamentosas. Los manojos de filamentos de actina, que son filamentos organizados paralelamente y sustentados por proteínas que mantienen unidos a los filamentos de actina unos a otros. La red ramificada, que es la organización tridimensional en el espacio intracelular.

Tabla 1. Estructura y función de elementos del citoesqueleto (Modificado de W.M. Becker, I.J. Kleinsmith & J. Hardin. The World of the Cell (San Francisco, Ca. B Cummings). 2000 p. 753).

	Microtúbulos	Microfilamentos	Filamentos intermedios
Estructura	Túbulos huecos Pared consistente de 13 columnas de moléculas de tubulinas	Dos bandas de actina entrelazadas	Proteínas fibrosas superenrolladas formando cables engrosados
Diámetro	25 nm, con lumen de 15 nm	7 nm	8- 12 nm
Subunidad proteica	Tubulinas que constan de α -tubulina y β -tubulina	Actina	Una o varias proteínas diferentes de la familia de las queratinas, dependiendo del tipo celular
Función principal	Mantenión de la forma celular: estructuras que resisten la compresión Motilidad celular (como cilios y flagelos) Movimientos cromosómicos en la división celular Movimientos organelares	Mantenión de la forma celular (estructuras que soportan tensión) Cambios en la forma celular Motilidad celular (como pseudópodos en amebas y macrófagos) Contracción muscular Ciclosis: movimiento del citoplasma División celular: formación del surco de clivaje o de división celular.	Mantenión de la forma celular (estructuras que soportan tensión) Anclaje del núcleo y de algunos otros organelos Formación de la lámina nuclear
	 <p>Dímeros de Tubulina 25 nm</p>	 <p>Subunidad de Actina 7 nm</p>	 <p>Subunidad Proteica Subunidad Fibrosa 10 nm</p>

Forma celular:

El esqueleto de actina es el más importante componente del citoesqueleto celular. La actina se localiza en la periferia de la célula, por debajo de la membrana plasmática formando una red que la sustenta. Al tener propiedades de gel viscoso elástico, el citoesqueleto de actina mantiene la forma celular y sustenta los cambios de la forma. La dinámica de la actina permite la extensión de la membrana plasmática. Los manojos de actina de la red de filamentos sustentan la estructura celular. Los motores de miosina asociados permiten la contractilidad y transporte de vesículas. Los manojos de actina y los filamentos intermedios permiten la adhesión celular. La red de lámina sustenta la estructura nuclear.

En el caso del citoesqueleto de actina, este es una matriz porosa, formando un andamio como sendas o caminos a lo largo de las cuales las miosinas transportan sus cargamentos o se deslizan para realizar la contractilidad celular. Los manojos de filamentos de actina (fibras de estrés o soporte) están unidas a la matriz extracelular mediante las integrinas. Las integrinas son proteínas integrales de membrana de aproximadamente 160 kDa que participan en el anclaje a la matriz extracelular uniéndose a las proteínas fibronectina y laminina. Las integrinas están conformadas por dos subunidades, alfa y beta. La subunidad alfa tiene un dominio de unión del calcio. Dos enfermedades humanas se originan por defectos genéticos de las integrinas. **La trombostenia de Glanzmann**, en las que las plaquetas carecen del receptor celular para el fibrinógeno GpIIb/IIIa lo que lleva a la agregación anormal y tiempos de sangrado prolongados. La **deficiencia de adhesión de leucocitos** producido por la ausencia de la subunidad beta de la integrina de leucocitos y causa infecciones bacterianas recurrentes, además de retardar la curación de heridas. Esto es a causa que la ausencia de integrina dificulta el movimiento de estas células defensivas, perjudicando su capacidad de migrar hacia los lugares de infección y fagocitar los microorganismos invasores.

Control de la motilidad no muscular.

Los filamentos dinámicos producen la fuerza protrusiva necesaria para el movimiento rápido de ensamble y desensamble. Para esto es necesaria la intervención de numerosas proteínas accesorias que juegan importantes roles

regulando la dinámica de los filamentos de actina. Entre estas proteínas están las aquellas que unen monómeros, las que permiten el crecimiento del filamento, las adaptadoras, las proteínas que cortan el filamento y las proteínas que desestabilizan el filamento. Ejemplo Timosina beta 4, es una pequeña proteína de masa molecular de 5000, une G-actina, la actina monomérica globular, está presente en alta concentración en la célula (aproximadamente 0,5 mM) y secuestra G-actina manteniendo un gran volumen de actina no polimerizada en la célula. Otro ejemplo es la profilina, una proteína de masa molecular de 15000, se une al extremo de la G-actina en una proporción 1:1, promueve el intercambio de ADP por ATP. El complejo actina-profilina puede agregarse al extremo positivo o de crecimiento de un filamento, y compite con la timosina beta 4 por la actina.

Filamentos intermedios (FI).

Tienen un tamaño de alrededor de 10 nm de diámetro, son los componentes más rígidos, responsables de mantenimiento de la forma general de la célula. Se caracterizan por tener una composición variable.

Existe una alta diversidad de filamentos intermedios en cuanto se refiere a estructura mostrando una organización tripartita de dominios. Un dominio central de ubicación fija caracterizada por la presencia de segmentos de alfa hélices formados por residuos apolares, conformado una varilla central flanqueada lateralmente por los dominios de longitud variable, cabeza y cola, los cuales no están formados por hélices.

Tabla 2. Clasificación de los filamentos intermedios.

Nombre	Número de Genes que codifican FI	Tipo FI, de acuerdo a la forma de la varilla central	Grupo de ensamble de polimerización de los FI	Tamaño kDa	Distribución
Keratina (ácida)	>25	I	A	40-64	Epitelio
Keratina (Básica)	>25	II	A	52-48	Epitelio
Vimentina	1	III	B	55	Heterogéneo
Desmina	1	III	B	53	Músculo
GFAP	1	III	B	50-52	Astrocito-Astroglia
Periferina	1	III	B	54	Neuronas SNP
Sincoilina	1	III/IV	B	54	Músculo
NF-L	1	IV	B	62	Neuronas SNC
NF-M	1	IV	B	102	Neuronas SNC
NF-H	1	IV	B	110	Neuronas SNC
Alfa-Internexina	1	IV	B	66	Neuronas SNC
Lamina A/C	1	V	C	72/62	Núcleo
Lamina Beta 1	1	V	C	65	Núcleo
Lamina Beta 2	1	V	C	78	Núcleo
Nestina	1	VI	B	240	Heterogénea
Sinemina	1	VI	B	182	Músculo
Desmosina	1	VI	B	140	Músculo
Fakinina/CP49	1	Orfan	D	46	Lentes
Filensina	1	Orfan	D	83	Lentes

Tomado de Coulombe PA. 2001 J Cell Science 114:4345-4347

Microtúbulos de 25 nm de diámetro.

Microtúbulos: cilindros huecos de 25 nm de espesor y pared de 5 nm de grosor. Tienen longitud variable.

Filamentos y túbulos que se extienden por todo el citoplasma, es una estructura altamente dinámica. Tiene como función el mantenimiento de la forma celular, la regulación de la posición de los organelos, los movimientos celulares, el control transmembrana de la actividad celular.

Morfología.

Microtúbulos lábiles y microtúbulos estables. Axonema de cilios y flagelos. Centríolos. Microtúbulos lábiles se observan luego de la fijación con glutaraldehído (>4°C). Se originan del centro organizador de microtúbulos (**MTOC**). Se agrupan en haces. Microtúbulos estables se observan después de la fijación con distintos fijadores y a diversas temperaturas.

Axonema de cilios y flagelos. Centríolos. Los cilios y flagelos se caracterizan por contener un axonema. El axonema está constituido por un haz central de microtúbulos, que incluye 9 microtúbulos dobles dispuestos en círculo alrededor

CENTROSOMA

El centrosoma o centro celular está conformado por dos centríolos dispuestos cercano al núcleo. Los centríolos son organoides formados por microtúbulos organizados en tripletes, revelado por estudios de ultraestructura. El centrosoma determina la polaridad de la célula y el eje de la célula.

Los microtúbulos se observan en el centro organizador de microtúbulos (MTOC). El MTOC, corresponde a cualquier estructura que en la célula cumple la función de agrupar y organizar los microtúbulos. En las células animales el MTOC es un centrosoma, proteínas que forman una red que puede contener un par de centríolos. El MTOC puede nuclear la polimerización de subunidades de tubulina o puede unir los extremos de los microtúbulos, que se ensamblan en forma independiente en el citosol. Es probable que el MTOC sea la principal estructura organizadora de la célula y contribuya a determinar la organización de las estructuras y organelos asociados a microtúbulos como por ejemplo las mitocondrias, el Complejo de Golgi y el retículo endoplásmico. En la mayoría de

las células el MTOC se encuentra en el centro de la célula, o cercano al núcleo. Uno de los principales componentes del material pericentriolar es la γ -tubulina, capaz de formar *in vitro* el núcleo de polimerización de las subunidades de tubulina que constituyen los microtúbulos.

Composición química: citoquímica y análisis químico. Organización molecular.

Composición química. Los microtúbulos se forman a partir de la polimerización de heterodímeros de alfa y beta tubulina, contienen dineína ciliar y flagelar (formando parte del axonema), nexina (axonema) y MAPS (conjunto de diversas proteínas asociadas a los microtúbulos). La tubulina alfa y la tubulina beta se alternan para formar los protofilamentos, un conjunto de protofilamentos forma un microtúbulo. Las tubulinas forman la pared del túbulo. Los microtúbulos se caracterizan por mostrar polaridad estructural y funcional. En la mayoría de los casos el extremo negativo (-) de un microtúbulo es adyacente al MTOC desde el cual se ensambla, y el extremo positivo (+) está en posición distal. El ensamblaje y disociación de los microtúbulos depende de la concentración crítica de los dímeros de alfa y beta tubulinas. Por sobre la concentración crítica, ocurre el ensamblaje y por debajo, la disociación de los microtúbulos. Los microtúbulos tienen dos fenómenos dinámicos: en uno se agregan subunidades por un extremo y pierden subunidades por el otro extremo y en el otro caso experimentan inestabilidad dinámica, entre alargamiento o acortamiento. En todos los casos hay participación de GTP o GDP intercambiable.

Las proteínas asociadas a cada uno de los tipos de filamentos corresponden a **MAPs** (Proteínas asociadas a los microtúbulos). Estas proteínas pueden ser **proteínas de ensamblaje** que tienen dos dominios, uno de fijación a los microtúbulos y el otro es un brazo filamentosos que se extiende desde la pared del microtúbulo. Este brazo se puede fijar a membranas, filamentos intermedios u otros microtúbulos, y su longitud separa los elementos. Su función es evitar la despolimerización de los microtúbulos en el citosol, los organizan en haces o manojos y establecen enlaces cruzados entre ellos y las membranas o los filamentos intermedios ya que cuando las MAP recubren la pared externa de un microtúbulo, las subunidades de tubulina son incapaces de disociarse de los extremos del túbulo. Debido al efecto de las MAP sobre la dinámica de los microtúbulos, en la célula estas se pueden encontrar fosforiladas, y en este caso

las MAPs fosforiladas son incapaces de unirse a los microtúbulos o MAPs sin fosforilar asociada a los microtúbulos. Las MAPs son fosforiladas por una MAP quinasa y desfosforilada por una fosfatasa. Las MAP se encuentran asociadas a microtúbulos de dendritas y axones son las MAP del tipo I: MAP1A, MAP1 B y las MAP del tipo II: MAP2A, MAP2B, en dendritas; MAP2C, en dendritas embrionarias, MAP4 en células no neuronales y Tau en dendritas y axones.

Transporte intracelular.

Las vesículas limitadas por membranas dentro de la célula son transportadas a lo largo de vías bien definidas. Uno de los movimientos que son mediados por microtúbulos que sirven de carriles dentro de la neurona, es el **transporte axónico** que puede ser de dos tipos: **anterógrado**, desde el cuerpo de la neurona hacia las uniones sinápticas o retrógrado, en sentido contrario. Puede ser transportado material rodeado por membranas en vesículas, proteínas del citoesqueleto y organelos como las mitocondrias. El transporte de pigmentos en melanóforos es otro ejemplo donde el material transportado usando a microtúbulos como carriles son pigmentos. Las vesículas del Golgi y el retículo endoplásmico, también son transportadas a través de los carriles formados por microtúbulos en la célula. Si se desorganizan los microtúbulos mediante la adición de colchicina, se desorganiza la conformación reticular del RE, *in vitro*.

El transporte de las vesículas **anterógrado** a lo largo del microtúbulo es dirigido por proteínas motoras asociadas al microtúbulo. Una de estas proteínas es la **quinesina** que dirige el movimiento hacia el extremo positivo del microtúbulo, este transporte requiere de ATP. La quinesina es un dímero que consta de dos cabezas globulares conectadas por un largo tallo central. La cabeza se une a los microtúbulos y al ATP y la cola se une la membrana de las vesículas transportadas. La vesícula se conoce con el nombre de carga. Hay distintos tipos de quinesinas como las quinesinas del citosol que transportan vesículas del citosol exclusivamente hacia el polo positivo del microtúbulo, en tanto, las quinesinas del huso mitótico transportan como carga microtúbulos del huso y astrales, centrosomas, quinetocoros hacia el polo positivo o negativo de los microtúbulos.

Las **dineínas** son proteínas motoras asociadas a los microtúbulos que transportan exclusivamente la carga hacia el extremo negativo del microtúbulo,

como por ejemplo el **transporte axónico retrógrado** o el tránsito de vesículas de endocitosis desde la membrana plasmática hacia los lisosomas. Son proteínas multiméricas compuestas por dos o tres cadenas pesadas que forman complejos con un número variado de cadenas livianas e intermedias. Hay dineínas del citosol que transportan vesículas del citosol y quinetocoros (proteínas asociadas a los centrómeros de los cromosomas a los cuales se anclan los microtúbulos del huso mitótico y permiten la tracción de los cromosomas hacia los polos de la célula en anafase) durante la mitosis y la meiosis. También están las dineínas del axonema que son de dos tipos: las dineínas de brazo externo y las dineínas de brazo interno, transportan un túbulo de los microtúbulos dobles de cilios y flagelos y por lo tanto es responsable del movimiento de estas estructuras. Este movimiento requiere de ATP. Mutaciones de los genes que codifican a la dineína del axonema o a otras proteínas asociadas del axonema producen cilios o flagelos inmóviles provocando cuadros de bronquitis crónicas y esterilidad en hombres y mujeres, esto porque no funcionan los cilios del árbol respiratorio, el flagelo del espermatozoide o los cilios de las trompas uterinas. Este síndrome se conoce como el síndrome de Kartagener o de los cilios inmóviles.

Los microtúbulos en la mitosis.

Durante la mitosis se organiza el aparato mitótico que tiene dos componentes: el huso mitótico, una estructura simétrica bilateral situada a ambos lados de la placa metafásica y un par de ásteres, un conjunto de microtúbulos situados en ambos polos de la célula. El huso contiene 3 tipos de microtúbulos cuyos extremos negativos se ubican hacia el centrosoma. Los microtúbulos astrales, forman el áster e irradian desde el centrosoma hacia la corteza celular, ubicando el aparato mitótico, determinando así el proceso de citoquinesis o división del citoplasma. Los microtúbulos de los quinetocoros se fijan a los quinetocoros ubicados en el centrosoma de cada cromosoma. Los microtúbulos polares no interactúan con los cromosomas, van de polo a polo de la célula.

Origen de las proteínas del citoesqueleto.

Las proteínas del citoesqueleto se originan en polirribosomas libres y son las más abundantes de la célula. La secuencia del polipéptido carece de secuencias señales o secuencias de inserción.

MITOCONDRIA

Mitocondria organización para la producción de energía, participación en la herencia y apoptosis.

La mitocondria es uno de los organelos más grandes en las células eucarióticas. Al microscopio electrónico de transmisión aparece como estructura esférica o con forma de bastón de 0,5-1 μm de diámetro y longitud variable. La forma de la mitocondria en la célula podría estar determinada por su asociación a elementos del citoesqueleto, pero no es afectada por agentes disruptores de microtúbulos como nocodazol. Además las mitocondrias aisladas mantienen su forma tubular en medio isotónico, por lo tanto la forma tubular de la mitocondria está dada por estructuras internas de la mitocondria.

El número de mitocondrias en la célula es variable; en hepatocitos hay entre 1.000 y 2.000 mitocondrias. Su ubicación es de preferencia en la región donde la célula tiene mayor demanda de energía metabólica (ATP); en el músculo se ubican alrededor de las bandas A de las miofibrillas, en los bastones retinianos en el segmento interno, en los túbulos renales en la región basal de la célula.

Las mitocondrias son estructuras dinámicas que están constantemente cambiando de forma, dividiéndose, fusionándose y moviéndose. Los movimientos de desplazamiento y las modificaciones morfológicas dependen de los elementos del citoesqueleto los microtúbulos y los microfilamentos y las proteínas motoras asociadas a este (quinesina y dineína). Sin embargo, en algunas células como espermatozoides, células musculares y células adiposas las mitocondrias se encuentran fijas, permaneciendo en lugares bien definidos de la célula. Las mitocondrias se mueven rápidamente a lo largo de microtúbulos, son transportadas a las sinapsis o conos de crecimiento en neuronas. Las proteínas motoras juegan un rol preponderante en el direccionamiento del transporte. En las células de mamífero hay al menos dos quinesinas específicas asociadas a la mitocondria. La asociación entre mitocondria y microtúbulo permite ubicar a las mitocondrias cerca de la membrana del retículo endoplásmico de donde puede intercambiar iones calcio y lípidos. Estos últimos necesarios para la composición de la membrana de la mitocondria como fosfatidilcolina y fosfatidilserina que son sintetizados en el retículo endoplásmico y transferidos a la membrana externa de

la mitocondria. También existe asociación de la mitocondria con filamentos intermedios y con el citoplasma circundante, desconociéndose los mecanismos.

La mitocondria promedio duplica su masa y se divide en dos en cada ciclo celular manteniendo de esta forma el "pool" mitocondrial en las células hijas; sin embargo, algunas mitocondrias se dividen más rápidamente, mientras otras no se dividen durante este período. La masa mitocondrial aumenta al inicio de la fase S y a lo largo de la fase M del ciclo celular. Por lo tanto, el proceso de división de las mitocondrias está regulado y coordinado con el ciclo celular. La excepción a la regla son las mitocondrias del músculo que proliferan durante la miogénesis (formación de la célula muscular en el desarrollo), pero también luego del ejercicio. La división de la mitocondria puede ser inducida por un amplio rango de sustancias como inhibidores de la fosforilación oxidativa o flujos de iones calcio, entre otras. En vertebrados podría estar controlada por T3, una hormona de la glándula tiroides que regula las tasas metabólicas y puede inducir la división de mitocondrias.

Este organelo tiene una doble membrana que alojan espacios donde se desarrollan las funciones que conducen a la producción de energía, estos compartimientos son seis en total: la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembrana, la matriz mitocondrial y otros dos compartimientos que serán discutidos más adelante.

La **membrana externa**, lisa, permeable que presenta las siguientes estructuras:

- 1 Proteínas que forman un canal acuoso denominadas porinas a través de los cuales pasan pasivamente iones y moléculas de hasta 5 kDa. Las porinas son las proteínas más abundantes de la membrana externa de la mitocondria, y una de las diez proteínas más abundantes de la mitocondria, es también denominada canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Es una proteína integral de membrana de unos 35 kDa que es importada a la mitocondria desde la vía citosólica sin la presencia de presecuencia a la mitocondria desde el citosol a través de traslocasas de la membrana externa de la mitocondria, denominadas Tom específicamente Tom20, Tom22 y con participación de la subunidad

pequeña de Tom5 que ayuda en la transferencia de la porina hasta el canal Tom40. Intentos por caracterizar las posibles péptidos señales en la proteína precursora de la porina han llevado a la identificación de algunas regiones responsables de su ensamble. Esta proteína tiene estructura beta- barril que permite el paso de pequeñas moléculas a través de la membrana.

- 2** Receptores de importación que reconocen secuencias de direccionamiento de las proteínas citosólicas destinadas a las mitocondrias (Tom). Corresponden a proteínas de membrana que reconocen presecuencias de proteínas ya sea secuencias internas de la proteína como aquellas ubicadas en el extremo amino terminal de la proteína. Entre estos están Tom70, Tom22 y Tom20 que expone grandes dominios hacia el citosol. Las proteínas que llevan secuencias señales en el extremo amino terminal son reconocidas por Tom20 y aquellas que llevan secuencias señales internas de la proteína son reconocidas por Tom70 y transferidas al receptor central Tom22.
- 3** Elementos de translocación de proteínas codificadas en el núcleo y destinadas a las mitocondrias (Tom, GIP). Las proteínas sintetizadas en la vía citosólica requieren ser traslocadas al interior de la mitocondria a través de traslocasas con múltiples subunidades, las que están ubicadas en la membrana externa de la mitocondria se les denomina Tom, o complejo Tom que contiene en su superficie receptores para el reconocimiento específico de precursores de proteínas y un poro general de importación/ inserción (GIP) que media la traslocación de la proteína precursora al interior o a través de la membrana externa. El componente que forma el poro central, Tom40 y tres pequeñas proteínas Tom7, Tom6 y Tom5 están embebidas integralmente en la membrana externa de la mitocondria. Junto con Tom22 forman un core estable de 400 kDa que corresponde al complejo traslocasa externa Tom o complejo GIP (poro general de importación o de inserción). A través de este complejo son insertadas o importadas las proteínas codificadas en el núcleo y sintetizadas en la vía citosólica que van destinadas a la inserción en las membranas externa o interna o destinadas a la matriz mitocondrial o espacio intermembrana. El destino de las proteínas está señalado en las secuencias señales de la proteína.
- 4** Complejos de importación de colesterol. Estos complejos de importación del colesterol han sido descritos en células de Leydig tumorales en

ratones y humanos. Transportan el colesterol hacia la membrana interna de la mitocondria destinado a la síntesis de hormonas esteroidales. El colesterol en la membrana interna es convertido a pregnenolona por rompimiento de la cadena lateral de la molécula por la enzima citocromo P-450, localizada en la membrana interna de la mitocondria. La proteína que lleva el colesterol se encuentra en la membrana externa de la mitocondria se denomina receptor benzodiazepina de tipo periférico y se abrevia con la sigla PBR, fué descubierto originalmente porque una diazepam con alta afinidad en neuronas del sistema nervioso central. PBR está localizado en la membrana mitocondrial de todas las células y en especial en aquellas que hacen síntesis de esteroides. Es una proteína de 18 kDa que une isoquinolina y que media la liberación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna. Se ha demostrado que la reducción en el número de PBR en las células adrenales disminuye los niveles de glucocorticoides en circulación. En las células de Leydig la interrupción del gen PBR da por resultado el bloqueo del transporte del colesterol en la mitocondria y por lo tanto cesa la formación de esteroides. PBR está conformado por cinco alfa hélices que transportan el colesterol acomodándolo en su interior y funcionando como un canal, mediando el transporte entre las membranas de la mitocondria.

La **membrana interna** que presenta un 75% de proteínas. La membrana interna debe ser capaz de formar un gradiente electroquímico en el espacio intermembrana. Esta membrana interna de la mitocondria muestra alta resistencia al paso de iones o solutos para facilitar una eficiente conversión de energía, ya que el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna es la fuerza impulsora de la síntesis de ATP que ocurre en la membrana interna de la mitocondria en la cara que enfrenta a la matriz de la mitocondria. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria se hace extremadamente elevada cuando en presencia de fosfato inorgánico se acumula cierta cantidad de iones calcio. Esta es una permeabilidad transitoria (PT), y se cree que se debe a la formación transitoria de poros proteicos (poros PT) en la membrana interna de la mitocondria, cuyas aperturas facilitan la permeación de solutos o iones de hasta 1500 Da.

En la mayoría de la mitocondrias la membrana interna presenta repliegues que penetran profundamente en la matriz mitocondrial denominados **crestas** y que aumentan la superficie de dicha membrana. La membrana interna posee una permeabilidad selectiva, es decir, presenta proteínas transportadoras para el paso de iones y otras moléculas.

Las dos membranas de la mitocondria crean 2 compartimientos: un **espacio intermembrana** que las separa, y una **matriz** que es el compartimiento incluido por la membrana interna y que tiene una consistencia muy viscosa. En espacio intermembrana acumula protones, creándose de esta manera el gradiente electroquímico que es la fuerza o energía potencial que permite la síntesis de ATP. En la matriz mitocondrial tiene lugar el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos. En trabajos recientes se han propuesto otros dos compartimientos en la mitocondria, se ha demostrado que las crestas están unidas con la membrana interna del lado opuesto de la mitocondria a través de contactos semejantes a poros, por lo tanto no sólo son invaginaciones. Estos dos nuevos compartimientos corresponden a la membrana de las crestas y al espacio intercresta.

A estos compartimientos los caracteriza la función que cada uno desarrolla y la característica composición de proteínas, lo que queda por definir es como estas proteínas se organizan en complejos, se pueden mencionar algunos ya definidos como los complejos de la cadena respiratoria, la ATP sintasa, el nucleoide mitocondrial, los ribosomas, los poros de traslocación de proteínas, los poros de permeabilidad transicional y aún posiblemente las enzimas del ciclo de Krebs.

En las crestas mitocondriales se ubican los complejos de la cadena respiratoria asociados a la membrana. Las partículas F que forman parte de la ATP sintasa que une la oxidación con la fosforilación del ATP, en una proteína de membrana con dos regiones, la región F_0 de cruza la membrana, consta de 4 cadenas polipeptídicas que forman un canal que conduce protones. La subunidad F_1 enfrenta la matriz y consta de 5 diferentes cadenas polipeptídicas. Esta subunidad lleva a cabo la fosforilación del ATP que es generada por el flujo de protones que cruza el canal desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial.

En general, la membrana interna contiene unas 60 proteínas, la mayoría de naturaleza hidrofóbica que participan en:

1. La cadena respiratoria o cadena transportadora de electrones. La fosforilación oxidativa ocurre en la mitocondria en un proceso que se desarrolla en conjunto entre la matriz mitocondrial, donde ocurre el ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa que ocurre en la membrana interna de la mitocondria. La cadena respiratoria consta de cuatro complejos, tres bombas de protones y una unión física al ácido cítrico. Los transportadores de electrones en el ensamble respiratorio de la membrana mitocondrial son quinonas, flavinas, complejos azufre-ferro, grupos heme de los citocromos y iones cobre.

Complejo I: es una ubiquinona oxidoreductasa dependiente de NADH con un grupo prostético FMN (flavín mononucleótido). Esta oxidoreductasa también contiene un centro Fe-S. El electrón proveniente del NADH reduce la ubiquinona.

Complejo II: es el complejo succinato Q reductasa que es la parte integrante del ciclo de Krebs que se ubica en la membrana interna de la mitocondria. Los electrones son transferidos desde FADH₂ a Q para formar QH₂ del complejo III. El complejo II tiene la característica de ser altamente hidrofóbico.

Complejo III: es una oxidoreductasa Q citocromo C que contiene los citocromos b y c₁ y un centro Fe-S. Este complejo reduce al citocromo C, una proteína periférica de membrana soluble en agua. El citocromo C como Q, es un transportador móvil de electrones, los cuales son transferidos a la citocromo C oxidasa (Complejo IV).

Complejo IV: este complejo contiene a los citocromos a y a₃ y tres iones cobre. Un ión Fe heme y un ión cobre en esta oxidasa transfiere los electrones al oxígeno, el último aceptor para formar agua.

2. La síntesis de ATP (ATP sintasa o ATP sintetasa), ubicada en la membrana interna de la mitocondria e impulsado por un gradiente de protones. El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV, ubicados en la membrana interna de la mitocondria, conduce la transferencia de protones desde el lado de la matriz a la cara del espacio intermembrana de la membrana interna. La fuerza impulsora

de protones generada se debe a un gradiente de pH, teniendo la matriz mitocondrial un pH básico vecino a la membrana interna, y en el espacio intermembrana un pH ácido. El flujo de protones de regreso a la matriz desde el espacio intermembrana a través de la ATP sintetasa impulsa la síntesis de ATP. El complejo enzimático es un motor molecular conformado por dos unidades operacionales: un componente rotatorio y uno estacionario. La rotación de la unidad F_1 induce cambios estructurales en la subunidad F_0 , anclada en la membrana que dan por resultado la síntesis y liberación de ATP en la matriz mitocondrial. La entrada del flujo de protones provee la fuerza para la rotación.

3. El transporte de solutos (piruvato, ácidos grasos, calcio, fosfato). La proteína responsable del transporte de piruvato a la mitocondria es el transportador de piruvatos mitocondrial (MPC) ha sido identificado en las levaduras es un miembro de la familia de transportadores mitocondriales que constan de seis hélices transmembrana de masa molecular de 41.9 kDa. El transporte de piruvato a la mitocondria es esencial para la oxidación de glucosa, lipogénesis y gluconeogénesis y también para el metabolismo de algunos aminoácidos. El transportador también juega un rol importante en el transporte de cuerpos cetónicos tales como acetoacetato y beta hidroxibutirato a través de la membrana interna de la mitocondria. El transportador de fosfatos mitocondrial PTP es una proteína integral de membrana que es responsable del transporte de fosfato inorgánico a través de la membrana interna de la mitocondria. El fosfato inorgánico es usado en la matriz mitocondrial en la fosforilación oxidativa del ADP. Este transportador funciona como homodímero y como un cotransportador electroneutro de protones. Recientemente se ha identificado una traslocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) es una proteína de transporte con alta afinidad por ácidos grasos de cadena larga (LCFA) en el músculo esquelético de rata y se ha encontrado que se requiere para la incorporación del palmitato y su oxidación en la mitocondria. Este transportador también está presente en mitocondrial del músculo esquelético humano.

4. El transporte de ADP hacia la matriz y de ATP hacia el citosol. La traslocasa nucleótido adenina (abreviada con la sigla ANT) juega un rol en el intercambio de ATP por ADP a través de la membrana interna de la mitocondria, suministrando así al citoplasma de ATP nuevamente sintetizado en la fosforilación oxidativa. ANT es una proteína integral de membrana que comprende seis segmentos transmembrana y que es codificada por un gen nuclear que tiene una masa de 32

kDa y se piensa que funciona como homodímero. Durante el transporte de ADP y ATP la proteína cambia de conformación a través del cual el sitio de unión al sustrato está orientado hacia el citoplasma y la matriz respectivamente. Aparte de su rol en el transporte o traslocación de nucleótidos, ANT es un componente core del poro de transición de la permeabilidad de la mitocondria (MPTP). Este es un complejo proteico encontrado en los sitios de contacto de la mitocondria que cuando están abiertos actúan como canal carente de especificidad, permitiendo el paso libre de moléculas bajo 1,5 kDa a través de la membrana interna. Como consecuencia, la mitocondria pierde su potencial de membrana y se hincha. En general la permeabilidad de transición es un proceso complejo con inductores, moduladores e inhibidores. El calcio tiene un rol regulador de MPTP ya que hay un requerimiento de acumulación de iones calcio en la matriz mitocondrial previo a la apertura del poro transitorio.

5. Los complejos de importación Tim formadas por al menos 3 proteínas distintas que se ubican en la membrana interna de la mitocondria y que participan en la transferencia o traslocación de proteínas sintetizadas en la vía citosólica y codificadas en el núcleo.

La membrana interna se caracteriza por tener una composición lipídica particular. Como componente especial está la cardiolipina (también denominado bisfosfatidilglicerol), este es un lípido característico de la mitocondria de una estructura inusual que es biosintetizado en la membrana interna de la mitocondria, este es un doble fosfolípido. Su concentración en la membrana interna alcanza al 20% de los lípidos. La cardiolipina interactúa con numerosas proteínas de la membrana interna, incluyendo varios sistemas transportadores aniónicos y algunos complejos de transporte de electrones, entre estos está la interacción de la cardiolipina con la citocromo oxidasa, el complejo enzimático terminal de la cadena transportadora de electrones. Se ha asociado en algunos estudios realizados con el proceso de envejecimiento, habría una disminución de la actividad de la citocromo oxidasa con el avance de la edad en mamíferos. Experimentalmente se ha demostrado usando la citocromo oxidasa en experimentos de reconstitución en liposomas que la remoción de cardiolipina decrece el transporte de electrones entre un 60 y 70% de la actividad original. Este efecto no se logra con otros fosfolípidos, por lo tanto la cardiolipina actúa modificando el ambiente lipídico asociado a la citocromo oxidasa, facilitando de esta forma su función enzimática.

La matriz mitocondrial contiene las enzimas que participan en:

- 1 Oxidación de piruvato producido en la glicólisis en el citoplasma.
- 2 β -oxidación de ácidos grasos.
- 3 Ciclo de Krebs (excepto la succinato deshidrogenasa).
- 4 Replicación, transcripción y traducción del ADMmit.

En los espacios intercrestas se ubica uno de los mayores complejos proteicos de la mitocondria, y es el complejo PDH que tiene una masa molecular de 8×10^6 Da. La organización del complejo PDH es un ejemplo de una vía metabólica integrada. Está conformado por tres enzimas:

- 1) Piruvato deshidrogenasa E1, representada por 30 copias.
- 2) Deshidrolipoamida acetiltransferasa E2, representada por 60 copias.
- 3) Deshidrolipoamida deshidrogenasa, representada por 12 copias.

Como parte del complejo también hay diferentes componentes regulatorios incluyendo una quinasa y una fosfatasa.

Todavía queda por definir la mayor parte de las unidades funcionales de la mitocondria para establecer un modelo de compartimentación metabólica.

Además en la matriz se encuentran: varias copias de ADN circular carente de histonas y representa entre el 1 y el 5% del ADN celular total, ARNm, ARNt, ribosomas mitocondriales o mitorribosomas (55S) y gránulos densos e irregulares de 50 nm de diámetro y compuestos principalmente por calcio.

Los nucleoides, asociación del ADN mitocondrial con proteínas, se ubican en lugares bien precisos de la matriz mitocondrial en las levaduras. En las células somáticas humanas hay de una a varios cientos de copias de ADNmt circular ubicado en la matriz mitocondrial y asociado a la cara interna de la membrana interna de la mitocondria a través de la región D-loop. Datos de microscopía electrónica han señalado que las moléculas de ADN circular mitocondrial forman una especie de roseta con un denso core central que es mantenido por proteínas asociadas. La carencia de histonas es una de las causas que el ADN mitocondrial

sea altamente susceptible a sufrir mutaciones debido a presencia de radicales libres en la mitocondria producidos durante el proceso de respiración celular. El ADN mitocondrial humano es una doble hebra circular de ADN de 16.5 kDa presente de una a varios cientos por célula. Todas las proteínas de mantención del ADN mitocondrial son codificadas por el genoma nuclear. Estas son las proteínas de la replicación y de la segregación del ADN y de reparación tales como la polimerasa mitocondrial POLG.

El genoma mitocondrial es diferente al nuclear. Así también, el código genético mitocondrial es ligeramente diferente al nuclear y puede codificar 2 ARNr (12S y 16S), 22 ARNt, 13 ARNm y 13 polipéptidos involucrados en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Estos genes son traducidos en ribosomas dentro de la matriz. Por esta razón la mitocondria es descrita como semiautónoma.

Las proteínas restantes (90-95%) son codificadas por ADN nuclear, y son traducidas en ribosomas citoplasmáticos e importadas a la mitocondria como cadenas polipeptídicas terminadas y traslocadas desde el citoplasma a la mitocondria. El transporte y la traslocación de las proteínas va acompañado de chaperonas. En total la mitocondria contiene alrededor de 600 a 1000 proteínas.

Los fosfolípidos de las membranas mitocondriales provienen de la membrana citosólica del REL desde son transferidas por proteínas de intercambio a la superficie citosólica de la membrana externa.

Las mutaciones del ADNmt pueden provocar enfermedades, y los tejidos más afectados son aquellos dependientes de la producción de ATP como son el nervioso y el muscular. Además, se ha sugerido que la progresiva acumulación de mutaciones en el ADNmt durante la vida de un individuo puede contribuir al proceso de envejecimiento.

Un hecho interesante es que en los mamíferos casi todo el ADNmt es heredado de la madre, pues virtualmente todas las mitocondrias son aportadas por el ovocito en el momento de la fecundación. Por tanto, las enfermedades mitocondriales son de herencia materna.

Además, la mitocondria de una célula puede contener una mezcla de ADNmt normal y ADNmt mutante, condición conocida como **heteroplasmia**. Las

investigaciones en este campo indican que estas enfermedades surgen sólo cuando hay una preponderancia de mitocondrias que poseen información genética defectuosa. Debido a lo anterior, los diferentes miembros de una familia que presentan mutaciones en el ADNmt pueden exhibir síntomas diferentes. Aquellos que tengan un mayor porcentaje de mitocondrias mutantes presentarán una forma más severa de la patología.

Cabe destacar una diferencia importante entre el ADN nuclear y el ADNmt; el primero está protegido del daño por una serie de sistemas de reparación de ADN, los cuales están generalmente ausentes en la mitocondria. Además, el ADNmt puede estar sometido a altos niveles de radicales libres mutagénicos. Así, la velocidad de mutación del ADNmt es mayor que la del ADN nuclear.

El ADN mitocondrial humano es una molécula circular, de ADN de doble cadena que consta de 16.569 pares de bases y contiene una región codificante y otra no codificante. La región codificante lleva la información genética para 13 proteínas, 22 ARN de transferencia y dos ARN ribosomales, todos implicados en el proceso de la fosforilación oxidativa que ocurre en la membrana interna de la mitocondria. Una multitud de enfermedades asociadas al ADN mitocondrial han sido correlacionadas con polimorfismos nucleotídicos tales como deleciones o inserciones de la región codificante. La mayoría de estas enfermedades son neuromusculares, sorderas, diabetes, epilepsia, disfunción renal y cegueras.

Si bien es cierto que la principal función de la mitocondria es la producción de ATP, realiza otras funciones como ser:

1. Remoción de calcio del citosol. Este transporte que realiza una ATPasa Ca^{2+} dependiente presente en la membrana interna de la mitocondria opera bombeando el calcio hacia la matriz cuando la concentración citosólica de este ión aumenta hasta niveles peligrosos para la célula.

2. Síntesis de esteroides. La síntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides (en la corteza adrenal), y la de los esteroides sexuales (en la corteza adrenal y gónadas) requiere la participación de citocromos P450 ubicados en la membrana interna de la mitocondria. La síntesis de las hormonas esteroidales se inicia con la transformación de colesterol que ha sido transportado a la mitocondria en

pregnenolona, la cual es posteriormente transportada al REL donde es convertida en progesterona, donde prosigue su metabolismo vía una serie de reacciones enzimáticas secuenciales.

3. Síntesis de aminoácidos. En las mitocondrias de hepatocitos 2 grupos de aminoácidos son sintetizados a partir de intermediarios del ciclo de Krebs, un grupo desde α -cetoglutarato y el otro desde oxalacetato.

4. Producción de radicales libres. Las especies químicas de oxígeno reactivas, denominadas con la sigla ROS, son generados continuamente en el interior de la mitocondria a través de reducción de electrones del oxígeno, el oxígeno queda con una carga negativa adicional, esto sucede en los pasos intermedios de la cadena de transporte de electrones y ha sido implicado en el daño celular y enfermedades del envejecimiento. Los radicales libres causan daño a membranas, proteínas y ácidos nucleicos.

5. Homeostasis de iones metálicos, especialmente en el caso de iones de hierro. El hierro es almacenado principalmente en el citosol, y la mayoría del hierro metabólicamente activo es procesado en la mitocondria de la célula. El hierro es un elemento vital para todos los organismos desde bacterias hasta organismos superiores, dado que juega un rol esencial en numerosos procesos metabólicos incluyendo transporte de oxígeno, síntesis de ADN, transporte de electrones. En condiciones fisiológicas, la solubilidad del Fe^{3+} es muy baja (alrededor de 10^{-18}), por lo que la célula debe tener mecanismos de transporte y almacenamiento eficiente de hierro. El exceso de hierro ha sido implicado en enfermedades neurodegenerativas, apoptosis y también en la generación de los dañinos radicales libres ya mencionados. Esta función de detoxificar y secuestrar el hierro está a cargo de las ferritinas que se encuentran en la matriz de la mitocondria. Dado que la mitocondria está expuesta a intenso tráfico de hierro para la síntesis de grupos heme y grupos azufre-hierro, requiere de un eficiente mecanismo para evitar la toxicidad del hierro. Si el hierro estuviera libre en la mitocondria podría interactuar con los ROS mencionado arriba en el punto anterior para producir un radical hidróxilo tóxico. La ferritina mitocondrial es una proteína homopolimérica formada por 24 subunidades idénticas, que a diferencia de la ferritina citosólica es más lenta y de menor actividad en la unión del hierro; es codificada por un gen nuclear carente de intrones ubicado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q23.1). En general, las ferritinas son proteínas abundantes en la célula destinadas a evitar

la toxicidad del hierro, contribuir a su solubilidad y biomineralización y al almacenamiento de este metal. Otra proteína mitocondrial implicada en el secuestro de hierro es la frataxina, una proteína de membrana que une Fe^{2+} , evitando la participación de este ión metálico en la formación de los daños radicales libres.

¿Cómo las proteínas sintetizadas en el citosol son direccionadas hacia la matriz, membrana externa, membrana interna y espacio intermembrana?

El direccionamiento de estas preproteínas hacia la matriz mitocondrial, se debe a un péptido señal (**presecuencia**) que consiste de un segmento localizado en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica que presenta múltiples residuos de aminoácidos cargados positivamente (básicos). La translocación ocurre en lugares donde las membranas externa e interna mitocondriales están muy cercanas.

Las preproteínas son mantenidas en un estado parcialmente desplegado por asociación a una chaperona Hsp 70 citosólica y son reconocidas por un receptor de importación que pertenece al complejo **Tom** (compuesto por varias proteínas con secuencias ácidas) de la membrana externa, e interaccionan electrostáticamente con el complejo proteico. Las cadenas polipeptídicas desplegadas son entonces translocadas a través del complejo **Tom** en la membrana externa, y transferidas al complejo **Tim** en la membrana interna. La translocación del polipéptido a través de la membrana interna, requiere del gradiente electroquímico (generado por el transporte de protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana) a través de la membrana interna. La presecuencia es removida por una proteasa de la matriz, y una chaperona Hsp 70 mitocondrial asociada al complejo **Tim**, se une a la cadena polipeptídica a medida que atraviesa la membrana interna, impulsando la posterior translocación. Finalmente, el polipéptido es transferido a una chaperona Hsp 60 mitocondrial, en cuyo interior ocurre el plegamiento de la proteína y la liberación posterior en la matriz mitocondrial. En todo este proceso hay requerimiento de ATP.

Las proteínas destinadas a las membranas mitocondriales o al espacio intermembrana necesitan de mecanismos adicionales para ser dirigidas al compartimiento submitocondrial correcto. Estas proteínas además de la

presecuencia cargada positivamente que dirige la importación mitocondrial presentan una segunda señal a continuación de la primera. El direccionamiento de proteínas hacia las membranas mitocondriales parece estar mediado por **secuencias hidrofóbicas de terminación** que detienen la translocación de las cadenas polipeptídicas a través de los complejos **Tim** o **Tom**, provocando la inserción de ellas en las membranas interna o externa respectivamente.

Las proteínas cuyo destino es el espacio intermembrana pueden ser direccionadas por varios mecanismos. Algunas proteínas son transferidas a través de la membrana externa por el complejo **Tom** pero son liberadas en el espacio intermembrana en vez de ser transferidas al complejo **Tim**. Otras son transferidas a través del complejo **Tim** pero entonces son liberadas como resultado de la remoción de secuencias hidrofóbicas de término de transferencia. Incluso algunas proteínas pueden ser completamente importadas a la matriz y reexportadas a través de la membrana interna hacia el espacio intermembrana.

Apoptosis y mitocondria.

La mitocondria juega un rol fundamental en la regulación de la apoptosis, actúa como un centro de control de la apoptosis. En la mitocondria dañada se forma un poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mt PTP) que al parecer consiste en un traslocador de nucleótidos de adenina (VDAC) y de varias otras proteínas mitocondriales incluyendo a miembros de la familia Bcl2. Uno de los más potentes activadores de la apoptosis es el citocromo C derivado del espacio intermembrana de la mitocondria. Su presencia en el citosol activa una cascada de enzimas proteolíticas denominadas caspasas, en conjunto con otras proteínas. La activación de las caspasas lleva a la destrucción de proteínas claves en la mantención de la estructura celular, como ejemplo se puede citar la degradación de una proteína que inhibe la enzima que destruye el ADN (DNAasa activada por caspasas, CAD), liberando CAD para clivar el material genético.

Los miembros de la familia de proteínas Bcl2 están ubicados preferentemente en la membrana externa y se ha demostrado que la fracción citoplasmática enriquecida de mitocondrias es capaz de inducir la apoptosis nuclear. El estrés oxidativo que induce la apoptosis es frenado por las proteínas Bcl2, es por lo tanto un factor antiapoptótico.

En la mitocondria también se encuentran distribuidas las caspasas mitocondriales, cistín-proteasas que una vez activadas constituyen un punto de no retorno. Así, las caspasas 2 y 3 están ubicadas en el espacio intermembrana de la mitocondria, asociado con la membrana interna. La caspasa-9 está asociada con la membrana externa y está expuesta al compartimiento citosólico.

PEROXISOMAS

Peroxisomas organización para la destoxificación celular, metabolismo de lípidos y de hormonas esferoidales.

Los peroxisomas (microcuerpos) son organelos presentes en todos los tipos celulares, con la excepción de los glóbulos rojos. Son cuerpos de forma ovalada o esférica, limitados por una única membrana lisa. La matriz se aprecia granulosa y homogénea. Normalmente son esféricos, pero también hay de formas elongadas, tubulares o reticuladas tienen un diámetro varía de 0,1 a 1 μm , y su número varía entre 100 y 1000 por célula, siendo en las células hepáticas y renales normalmente muy numerosos. La membrana del peroxisoma es impermeable a la mayoría de las moléculas, incluyendo NAD^+ , NADP^+ , protones y acetil CoA, creando así un ambiente único dentro de la célula. La matriz del peroxisoma contiene enzimas involucradas en numerosos procesos metabólicos. Son responsables de la β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, de la síntesis de plasmalógenos. Los plasmalógenos son una importante clase de fosfolípidos del tejido cerebral en los cuales uno de los ácidos grasos está unido al glicerol por un enlace éter en vez de un enlace éster. Los peroxisomas intervienen en el metabolismo de los radicales oxigenados libres, en la síntesis de colesterol, en el metabolismo del estradiol, en la formación de ácidos biliares, en el catabolismo de las purinas, prostaglandinas y leucotrienos.

Biogénesis de los peroxisomas.

El modelo de ensamble del peroxisoma implica tres pasos:

1. Formación de la membrana del peroxisoma, probablemente desde el retículo endoplásmico.

2. Importación de las proteínas de membrana del peroxisoma. Estas proteínas de membrana son sintetizadas fuera del peroxisoma, en la vía citosólica, en polirribosomas libres, son plegadas y enseguida transportadas e insertadas en la membrana del organelo. Son codificadas por los genes *pmp*.

3. Importación de las proteínas de la matriz del peroxisoma a través de la membrana del peroxisoma.

Dado que los peroxisomas tienen una vida media de 5-6 días (son destruidos por autofagia), los nuevos peroxisomas se forman por el crecimiento y fisión (de un peroxisoma se originan dos) posterior de peroxisomas existentes. El peroxisoma no tiene un genoma propio ni ribosomas; por lo que todas las proteínas y lípidos de membrana son sintetizados fuera del peroxisoma, en la vía citosólica. Los fosfolípidos provienen de la membrana citosólica del REL y son transportados a la membrana del peroxisoma por proteínas intercambiadoras. Las proteínas destinadas a los peroxisomas, ya sea a sus membranas o matriz, provienen de ribosomas libres en el citosol (vía citosólica) y son selectivamente conducidas al peroxisoma.

Los fosfolípidos de la membrana del peroxisoma son principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, con una tendencia hacia los ácidos grasos de cadena más larga que otras membranas. Los fosfolípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico y transportados a la membrana del peroxisoma por un mecanismo aún desconocido. Este caso ocurre también en la mitocondria. Los fosfolípidos de la mitocondria se sintetizan en el retículo endoplásmico y tal vez se mueven desde el retículo endoplásmico a la mitocondria en sitios muy vecinos. Este mecanismo se puede aplicar a los peroxisomas, y esta sugerencia está apoyada por datos morfológicos de vecindad entre retículo endoplásmico y peroxisomas. Alternativamente, se ha especulado que vesículas especializadas pueden contener una o pocas proteínas que especifican su destino. Pequeñas vesículas diferentes de los peroxisomas maduros han sido identificados en la levadura *Pichia pastoris*, que llevan dos proteínas Pex1p y Pex6p. Estas peroxinas son miembros de la familia de las AAA ATPasas, algunos miembros de los cuales están implicados en los eventos de fusión de membrana. Se ha intentado especular que estas vesículas podrían transportar los fosfolípidos a los peroxisomas.

La biogénesis de los peroxisomas es controlada por proteínas codificadas por los genes *pex*, denominadas peroxinas, que se encuentran distribuidos en varios pares de cromosomas en el genoma humano. Las peroxinas pueden ser receptores solubles o unidos a la membrana del peroxisoma. Se han descrito al menos 14 peroxinas (Tabla 2) que cumplen distintas funciones en el transporte de las proteínas a la matriz o a la membrana, fusión de peroxisomas, proliferación de peroxisomas y reconocimiento de otras peroxinas.

Las proteínas destinadas a los peroxisomas contienen un péptido señal, denominado **PTS** (señal de transporte al peroxisoma). Esta señal puede ser en la mayoría de las proteínas importadas al peroxisoma (95 %) que consta de 3 aminoácidos (Ser-Lys-Leu) próximo a su extremo carboxilo, y se denomina PTS1. Un número limitado de proteínas de la matriz del peroxisoma contiene una señal en el extremo amino terminal, PTS2, que es un nonapéptido (Arg-Leu- X(5)-His-Leu, X(5) corresponde a 5 posiciones de aminoácidos en la secuencia de la proteína, puede ser cualquier aminoácido). Ejemplo de proteína que lleva la señal PTS2 es la mevalonato quinasa humana. Dichas señales son reconocidas por las peroxinas Pex5p que reconoce la señal PTS1 y Pex7p que reconoce la señal PTS2, ambas peroxinas se ubican en el citosol. A diferencia de la mitocondria cuyas proteínas son importadas en un estado desplegado, los peroxisomas son capaces de importar proteínas a su matriz en un estado plegado.

3. Transporte de las proteínas de la matriz del peroxisoma.

Las proteínas destinadas a la matriz del peroxisoma son sintetizadas en la vía citosólica de manera inducible, es decir los genes nucleares que sintetizan estas proteínas son activados cuando se necesitan estas proteínas. Una vez sintetizadas estas proteínas son transportadas a los peroxisomas por proteínas especiales.

Transporte de proteínas que llevan la señal PTS1.

El transporte de las proteínas sintetizadas en la vía citosólica que llevan la señal PTS1 con destino a la matriz del peroxisoma siguen los siguientes pasos:

1. Unión receptor-ligando. Las proteínas destinadas a la matriz del peroxisoma que llevan la señal PTS1 son reconocidas por la peroxina Pex5p citosólica, una proteína que contiene TPR en el extremo carboxilo. La señal PTS1 se une al extremo carboxilo terminal de la peroxina formando un complejo Proteína transportada (PTS1)- Pex5p.

2. Transporte y anclaje al peroxisoma de los complejos receptor-ligando en la membrana peroxisomal. Anclaje al receptor. El complejo luego se une a peroxinas ubicadas en la membrana del peroxisoma por el extremo amino terminal de Pex5p. Las peroxinas de la membrana del peroxisoma Pex13p, Pex14p, Pex17p sirven de sitio de anclaje para el complejo Proteína transportada (PTS1)-Pex5p. Pex5p se asocia a Pex14p inicialmente y luego con Pex13p y con Pex17p. El aparato de traslocación ubicado en la membrana del peroxisoma permite la liberación de las proteínas a la matriz del peroxisoma.

Tabla 2. Peroxinas y su función en el peroxisoma.

(Kurbatova EM, Dutova TA, Trotsenko, YA. 2005. Structural, functional, and genetic aspects of peroxisome biogenesis. Russ J Gen 41(2): 149-165.)

Peroxina	Ubicación o Función	Interacción con otras peroxinas	Locus
Pex1p	Implicada en la fusión de peroxisomas y transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex6p	7q21-q22
Pex2p	Proteína integral de membrana, contiene Zinc, implicada en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex12p	8q21.1
Pex3p	Proteína integral de membrana, implicada en el ensamble de la membrana del peroxisoma	Pex19p	6q23-q24
Pex5p	Receptor de la proteína de la matriz PTS1	Pex7p, Pex12p, Pex13p, Pex14p	12p13.3
Pex6p	Implicada en la fusión de peroxisomas y transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex1p	6p22-p11
Pex7p	Receptor PTS2	Pex5p, Pex13p, Pex14p	6q21-q22.2

Pex10p	Proteína integral de membrana, contiene Zinc, implicada en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex12p	1p36.32
Pex11p	Proteína integral de membrana, contiene Zinc, implicada en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex19p	
Pex12p	Proteína integral de membrana, implicada en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex5p, Pex10p, Pex19p	17q21.1
Pex13p	Proteína integral de membrana, contiene Zinc, implicada en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Pex5p, Pex7p, Pex14p	2q14-p16
Pex14p	Proteína periférica o integral, sitio primario de unión de receptores PTS1 y PTS2	Pex5p, Pex7p, Pex13p, Pex14p, Pex17p	
Pex16p	Proteína integral de membrana	Pex19p	11p11.2
Pex19p	Proteína citosólica, implicada en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma	Diferentes peroxinas de la membrana del peroxisoma	1q22
Pex26p	Proteína integral de membrana	Pex1p, Pex6p	22q11.21

3. Traspaso del ligando a la maquinaria de traslocación, a través de la membrana.

4. Reciclamiento del receptor de regreso al citosol. Pex5p es un receptor reciclable o recuperable. Este proceso es mediado por un conjunto de peroxinas: las AAA Atpasas: Pex1 y Pex6; Pex 4, una enzima conjugada con ubiquitina; y probablemente un sitio de anclaje de las peroxinas Pex4 y Pex22. Pex1 y Pex6 actúan luego de la traslocación, seguidas de Pex4 y Pex22.

Transporte de proteínas que llevan la señal PTS2.

También las Pex13p y Pex14p son sitios de anclaje para Pex7p, una proteína que contiene WD-40, el receptor de las proteínas con destina a la matriz del peroxisoma y que llevan la señal PTS2.

Transporte de proteínas de membrana y de lípidos del peroxisoma.

Además de las proteínas de la matriz, la proliferación de los peroxisomas requiere de proteínas de membrana y de fosfolípidos. Los fosfolípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico y transportados a los peroxisomas. La vía de transporte no está muy clara aún y se han sugerido dos hipótesis. La primera que habrían proteína de intercambio directo de fosfolípidos entre las membranas de los organelos (retículo endoplásmico y peroxisomas) y la segunda es que los fosfolípidos serían traslocados por vesículas especiales que contendrían proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico y que determinarían los sitios de liberación de los lípidos.

Las proteínas de membrana del peroxisoma son sintetizadas en forma constitutiva, es decir los genes que las codifican están siempre activos y las proteínas que son sintetizadas en la vía citosólica, con una sola posible excepción, son incorporadas directamente a la membrana en el citosol. El mecanismo de incorporación está poco claro aún, aunque se ha demostrado que existen señales de transporte en algunas proteínas. Hay tres peroxinas implicadas en el proceso de inserción de las proteínas de membrana del peroxisoma: Pex3p, Pex16p y Pex19p.

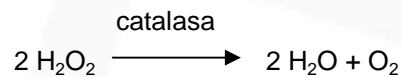
Las proteínas de membrana del peroxisoma tienen las siguientes funciones:

1. Interactuar con las proteínas del citoesqueleto. Debido a esta interacción, las membranas pueden afectar la morfología del peroxisoma, el movimiento y la distribución de los peroxisomas durante la mitosis.
2. Intervienen en la importación de sustratos, intermediarios metabólicos y cofactores de enzimas como FAD y NADH.
3. Son responsables de la degradación selectiva de peroxisomas.
4. Forman complejos para la importación de proteínas, específicamente anclaje y traslocación de las proteínas destinadas a la matriz del peroxisoma.

Además, los peroxisomas desempeñan un papel importante en la destoxificación celular, contienen enzimas oxidativas, las que en conjunto son

alrededor de 50. Las más comunes son: catalasa, urato oxidasa, D-aminoácido oxidasa y α -hidroxiácido oxidasa.

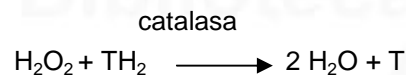
La catalasa degrada rápidamente al H_2O_2 producida en los peroxisomas por la oxidación de sustratos orgánicos ($\text{RH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2$), mediante la siguiente reacción:



El H_2O_2 (peróxido de hidrógeno o agua oxigenada) es un poderoso agente oxidante muy reactivo que puede formar radicales hidroxilos ($\text{HO}\bullet$) que atacan las macromoléculas celulares.

En las mitocondrias, RE y citoplasma ocurren reacciones en vías metabólicas normales que originan aniones superóxidos (radicales libres), muy reactivos y que pueden producir alteraciones de la bicapa lipídica de las membranas, daño en el ADN, modificaciones en las proteínas generando disfunción celular. La reacción de dismutación producida por la superóxido dismutasa transforma a los aniones superóxido en H_2O_2 y O_2 , siendo neutralizado el peróxido de hidrógeno por acción de la catalasa peroxisomal.

La catalasa en células hepáticas y renales usa H_2O_2 para oxidar otros sustratos que son tóxicos (TH_2), tales como fenoles, alcoholes, formaldehído y ácido fórmico, y así neutraliza su toxicidad. La reacción general es:



Desórdenes en peroxisomas: Peroxisomopatías

Se pueden clasificar en tres grupos:

1. Grupo I: asociados a la biogénesis de los peroxisomas.

Existe un desorden genético, el **síndrome cerebro heparorrenal de Zellweger**, en el que hay una falla en la proteína que incorpora las enzimas

oxidativas a la matriz del peroxisoma y que está caracterizado por la existencia de peroxisomas vacíos en las células de los afectados por esta enfermedad, los que mueren antes del primer año de vida.

2. Grupo II: asociados a la deficiencia de una enzima en particular.

3. Grupo III: asociados con deficiencias enzimáticas múltiples.

NÚCLEO

Núcleo, organización para el almacenamiento y procesamiento de la información genética

El núcleo es el organelo que contiene la información genética de la célula a la forma de secuencias de ADN que en los organismos eucariontes discretamente organizada en cromosomas. En esta parte del capítulo se hace referencia a la organización del núcleo en la interfase del ciclo celular, que es la etapa del ciclo celular en que se encuentra organizado para que tenga lugar el flujo de información genética hacia el citoplasma, a través de la transcripción en el núcleo hacia el citoplasma donde se realiza la traducción.

En el núcleo se sintetiza la molécula de ARN teniendo como molde la información contenida en el ADN de los cromosomas y ocurre también la maduración o procesamiento del ARN heteronuclear o transcrito primario para formar el ARN mensajero. La organización de los genes, la regulación de la expresión génica y la generación de traslocaciones cromosómicas (intercambio de segmentos de cromosomas no homólogos), tiene lugar durante la interfase en el núcleo. Durante la mitosis se interrumpe la organización del núcleo, los cromosomas se condensan y se congregan en la placa metafásica, desaparece la organización espacial tridimensional del núcleo. El núcleo es, por lo tanto, el organelo más dinámico de la célula. Almacena la mayor parte del material genético y es el sitio donde ocurre la mayor parte de los procesos regulatorios del genoma. El núcleo contiene además una variedad de estructuras dinámicas que lo hacen un organelo con varios subcompartimientos que han sido delimitados claramente aunque la interacción funcional entre ellos aún se desconoce.

El núcleo está conformado por una matriz, la cariolinfa o nucleoplasma y una envoltura continua con el retículo endoplásmico, denominada carioteca o envoltura nuclear. La envoltura nuclear que una estructura conformada por dos membranas, la membrana externa es contigua con el retículo endoplásmico rugoso y frecuentemente está cubierta de ribosomas. La membrana interna y la externa de la envoltura nuclear se fusionan en algunos trechos conformando los **poros nucleares** que sirven en el tránsito de materiales entre núcleo y citoplasma. El **complejo de poro nuclear** se ha demostrado que tiene una estructura de canastillo que se prolonga hacia el nucleoplasma. Está conformado por grandes complejos proteicos embebidos en ambas membranas de la envoltura nuclear. En las células de los mamíferos están compuestos por al menos 30 proteínas denominadas nucleoporinas. Sólo dos de las nucleoporinas Pom121 y gp210, son proteínas integrales y por lo tanto anclan al complejo de poro a las membranas de la envoltura nuclear, mientras todas las demás son sintetizadas como proteínas solubles en la vía citoplasmática. Estas proteínas solubles se agrupan en bloques como subcomplejos que posteriormente se ensamblan para conformar el poro nuclear. Las nucleoporinas cumplen un rol específico, se han clasificado 19 nucleoporinas basado en estudios de tiempo de residencia de las proteínas, en tres grupos: las nucleoporinas que cumplen función de andamiaje o de soporte físico, estas corresponden a alrededor de 10 nucleoporinas; las que cumplen una función de adaptador estructural, alrededor de 6 y otras 3 que cumplen una función regulatoria o transporte. Las moléculas más pequeñas que 40 kDa pueden difundir libremente a través de los poros pero las de mayor tamaño deben ser transportadas a través de los poros nucleares.

Transporte de sustancias a través de los poros nucleares: **Importinas** y **Exportinas**, intercambio núcleo citoplasma.

Una familia de proteínas conocidas como importinas o exportinas, también denominadas en conjunto **carioferinas**, median el movimiento de proteínas y ARN entre citoplasma y núcleo. Las proteínas o ARN que son transportados (cargamento o carga) contienen señales. Las proteínas o ARN contienen la secuencia señal de ubicación nuclear (**NLS**) o secuencia señal de exportación nuclear (**NES**) que son reconocidas por importinas o exportinas respectivamente. La interacción de la carga con su transportador es modulado por la pequeña GTPasa Ran. Para las importinas, la unión de la carga y Ran GTP es antagonista y para exportinas la unión del cargo y RanGTP es cooperativa. El estado de unión

al nucleótido de Ran, en efecto determina la identidad del compartimiento: RanGTP en el núcleo y RanGDP en el citoplasma; y permite que el transportador se una o libere la carga en el compartimiento apropiado. En este proceso del ciclo de la Ran GTPasa participan numerosos factores accesorios incluyendo el factor intercambiador de nucleótidos RCC1, la proteína activante citoplasmática Ran GTPasa RanBP1 y el factor de transporte nuclear 2 NTF2, todos ayudan en el transporte manteniendo a Ran en su apropiado estado de unión a GTP o GDP o modulando la interacción de Ran con los transportadores. La familia importina/exportina comparte varias características que incluyen un dominio amino terminal de unión a Ran y la capacidad de moverse entre citoplasma y núcleo.

Otra estructura importante es la **lámina periférica nuclear** fibrosa, compuesta por microfilamentos intermedios, que rodea el interior de la cavidad de núcleo adosada a la membrana interna de la envoltura nuclear. La lámina está compuesta de las proteínas denominadas lamina A/C y Beta 1 y Beta 2, y juega un rol de regulación en la estructura de la envoltura nuclear y anclaje de la cromatina interfásica en la periferia nuclear. Las proteínas de la lámina nuclear pueden interactuar entre ellas, con proteínas asociadas a la lámina, con proteínas del andamiaje nuclear y con la cromatina. Probablemente la mayoría de las proteínas asociadas a la lámina interactúan directamente con la cromatina. La lámina nuclear se requiere para la regulación apropiada del ciclo celular, organización de la cromatina, replicación del ADN, diferenciación celular y apoptosis. Las mutaciones en las proteínas de la lámina nuclear pueden interrumpir estas actividades y causar enfermedades genéticas, denominadas **laminopatías**.

La membrana nuclear interna y la lamina nuclear tienen una composición proteica única que incluye laminas nucleares, diferentes variantes polipeptídicas de splicing asociados a la lámina (LAP1 y LAP2), emerina, Man1, receptor de lámina B (LRB), otefina, nurima, "young arrest" y posiblemente UNC-84, quinasa del receptor de la lamina B, p34 y p18. Las láminas corresponden a filamentos intermedios del citoesqueleto del tipo V. La lamina A se expresa en células diferenciadas, y es soluble en el citoplasma durante la mitosis. La lámina B se expresa en todas las células y durante la mitosis tiende a permanecer unida a la membrana. Los genomas de vertebrados contienen dos tipos de genes de lamina B1 y B2 y un tipo de gen de lamina A. Estos tres genes codifican al menos 7 polipéptidos distintos: lámina A, una lámina variante de A, C1 y C2, que son variantes de splicing del gen lámina A y las láminas B1, B2 y B3. Lamina B3 es

una variante de splicing del gen B2. Las laminas B3 y C2 son específicas para células germinales, donde probablemente juegan un rol en la reorganización de la cromatina durante la meiosis. LAP1, LAP2, emerina, MAN1, LBR, nurima y UNC-84 son todas proteínas integrales de membrana. LAP2, emerina y Man1 comparten un dominio homólogo de 43 residuos de aminoácidos cerca del extremo N-terminal denominado dominio LEM. LBR es una proteína de unión a la lámina B que es homóloga de la reductasa esterol C14 ubicada en el retículo endoplásmico SR1 y SR2. Nurima tiene cinco dominios transmembrana que median su marcaje a la membrana interna, donde interactúa con el andamiaje nuclear. La proteína arresto joven (YA o young arrest) es una proteína codificada por genes maternos en la mosca de la fruta, *Drosophila* y se requiere para la transición desde meiosis a mitosis. YA o proteína de arresto joven es una proteína periférica de membrana asociada a la lamina y la cromatina.

Diversas actividades nucleares requieren de la lámina nuclear, así por ejemplo, durante la mitosis, el adecuado ensamble y desensamble de la lamina nuclear se requieren para el progreso del ciclo celular. La lámina nuclear juega un rol esencial en la organización nuclear por anclaje de la cromatina a la envoltura nuclear. Se ha demostrado interacción específica entre histonas y laminas, entre proteínas con dominios LEM y BAF (BAF: barreras a factores de autointegración) y también entre LBR y HP1 (HP: proteína asociada a heterocromatina). Así las interacciones entre estas proteínas y sus respectivas proteínas de interacción en la lamina están probablemente implicadas en la organización del silenciamiento de la cromatina en la periferia del núcleo, que da origen a la heterocromatina. Cabe señalar que las histonas y las proteínas HP-1 y BAF se distribuyen ampliamente en el núcleo y no son específicas de la lámina. La proteína UNC-84 facilita la interacción núcleo-centrosoma requerida para migración y anclaje de núcleos durante procesos del desarrollo de algunos invertebrados.

Tanto la envoltura nuclear, los complejos de poro nuclear y la lamina nuclear son desensamblados de manera coordinada. El complejo COP I, que juega un rol preponderante en el remodelamiento del Golgi, con la formación de vesículas, ha sido implicado en el proceso de la desorganización de la envoltura nuclear y requiere de la interacción del complejo de poro nuclear para ser reclutado. Nup153 y Nup358/RanBP1, proteínas residentes en el canastillo del poro nuclear son las encargadas de reclutar COP I, la primera en el lado nuclear

del poro y la segunda (Nup358/RanBP1) en la cara citoplasmática del poro, a través de la interacción de los dedos de Zinc de estas proteínas con el complejo coatómero COP I. Se ha comprobado mediante el uso de anticuerpos contra estas proteínas impide la desorganización de la envoltura plasmática en la mitosis.

El nucleoplasma está organizado en compartimientos que cumplen funciones específicas, y se les ha definido como compartimientos porque:

1. Contienen subconjuntos de proteínas residentes.
2. Pueden ser identificados morfológicamente a través del microscopio y han sido experimentalmente visualizados en células vivas.
3. Algunos de estos compartimientos pueden ser aislados y ser caracterizados bioquímicamente.

La eficiencia de la multitud de procesos que tienen lugar en el núcleo es explicable sólo si en ese espacio hay una organización de la matriz nuclear.

Los compartimientos descritos hasta ahora son el **nucleólo**, el compartimiento de los factores de maduración del ARN o de splicing (SFC), los cuerpos de Cajal o cuerpos enrollados, los cuerpos de oncoproteína de leucemia promielocítica o cuerpos PML, los dominios PTF, los dominios o territorios cromosómicos, los canales intercromosómicos, los cuerpos PcG o polycomb, las manchas nucleares IGC, Cuerpos Gemin, Cuerpos de Clivaje, entre otros.

El Nucleólo.

El nucleólo es la única estructura subnuclear que es visible a la microscopía óptica, como se puede apreciar claramente en las neuronas, en hepatocitos, en oocitos de anfibios, etc. El nucleólo está conformado por una región fibrilar y una región granular, el compartimiento perinucleolar, componente fibrilar denso. Los nucleólos se forman en las regiones organizadoras del nucleólo (NOR) ubicados en cromosomas específicos, en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. Las NOR contienen genes codificantes que transcriben activamente el ARN ribosómico (ARNr).

El nucleólo está organizado en tres compartimientos:

1. El centro fibrilar, región pálida a la microscopía electrónica de transmisión que está compuesta por fibrillas de 50 Angstrom de diámetro. Los centros fibrilares contienen los genes de ARN ribosómico, en los cuales se realiza la transcripción. Cada gen activo contiene alrededor de 100 a 120 moléculas de la enzima ARN polimerasa que sintetizan cada transcrito primario en la periferia del centro fibrilar, es decir en la interfase con el componente fibrilar denso.

2. El componente fibrilar denso región que rodea al centro fibrilar está formado de un material fibrilar denso que forma capas compactas.

3. El componente granular región que contiene al centro fibrilar y al componente fibrilar denso es una región con abundante granulación.

Esta arquitectura nucleolar refleja la maduración vectorial de las partículas pre-ribosómicas que se inicia en el centro fibrilar, pasan al centro fibrilar denso y migran progresivamente al componente granular. A medida que ocurre el procesamiento del ARNr (maduración del ARN ribosomal) ocurren las modificaciones del transcrito primario y el ensamble del ribosoma.

El nucleólo humano se encuentra rodeado por un casquete de cromatina condensada que ocasionalmente penetra profundamente en el organelo alcanzando el centro fibrilar, la cromatina perinuclear condensada y los centros fibrilares son contiguos, y se ven como intersticios nucleolares.

Territorios o dominios cromosómicos.

Los cromosomas son las mayores subunidades físicas del genoma. Su naturaleza discreta es más aparente durante la mitosis cuando se condensa la cromatina. Sin embargo, entre el período G_1 y G_2 de la interfase también es posible evidenciar la existencia de estas unidades discretas, dentro del nucleoplasma se organizan los **territorios de los cromosomas**, de manera no al azar. En las células de mamíferos los territorios cromosómicos ocupan de preferencia posiciones radiales en relación al centro del núcleo de acuerdo a su densidad de genes y posiblemente también a su tamaño. Cada territorio corresponde a la región del núcleo ocupado por un cromosoma, es un lugar que

ocupa un cromosoma en el espacio del núcleo, que no se traslapa con el territorio de otro cromosoma. Así cada cromosoma ocupa una región dentro del núcleo. Se piensa que los genes activos de cada cromosoma se encuentran en territorios libremente empaquetados en la superficie del nucleoplasma, hacia el centro del núcleo; esta corresponde a la cromatina que replica tempranamente en la fase S (eucromatina). La cromatina que replica tardíamente en la fase S del ciclo celular (Ver Capítulo IV), que corresponde a la heterocromatina, ocupa la periferia nuclear, cerca de la envoltura nuclear y la región perinuclear. Algunos tipos celulares muestran una banda de heterocromatina (cromatina inactiva) asociada a la lámina nuclear. En adición, cantidades variables de heterocromatina se observan en las regiones más internas del núcleo.

Así, la cromatina que replica tempranamente (eucromatina) está separada de la cromatina que replica tardíamente (heterocromatina). Una característica de esta fase del ciclo celular es que los cromosomas homólogos no están apareados en la interfase. Sin embargo, los detalles estructurales de los territorios cromosómicos no se ha establecido claramente aún, pero la fibra de cromatina está probablemente plegada en una compleja estructura de orden superior que es permeada por canales de diferentes tamaños. Esto crea un cuerpo poroso de cromatina con una gran superficie y permite el acceso de factores regulatorios a las secuencias tanto en la superficie externa de un territorio cromosómico como dentro del territorio cromosómico.

Se define también los **dominios intercromosómicos** que son las regiones del núcleo no ocupados por cromosomas, tienen la forma de canales, por lo que se les denomina también **canales intercromosómicos**. Los canales intercromosómicos contienen la cola de poliA que se agrega a los ARN en el paso final de la maduración del mensajero, antes de ser transportado desde la periferia del núcleo al citoplasma para ser traducido en los ribosomas. La traducción ocurre luego que el mensajero ha abandonado el núcleo al pasar por el poro nuclear. También es posible encontrar allí, factores de transcripción, de maduración del ARN (splicing), de replicación y reparación del ADN, etc.

Esta organización de la arquitectura del núcleo permite el ordenamiento de las funciones de la información genética en la cromatina del núcleo, como también la regulación génica como un modelo territorio cromosómico- dominio intercromosómico.

Una clasificación de los territorios nucleares o subcompartimientos nucleares hasta ahora no mencionados que se da a continuación:

Los **cuerpos policomb** (del inglés comb= peineta) contienen grupos de proteínas asociadas con la heterocromatina pericentromérica, que es la cromatina que no transcribe en ARN y que se ubica alrededor del centrómero del cromosoma. Estos dominios varían en número, tamaño y composición proteica. No está claro si estos dominios son compartimientos de almacenamiento o están implicados en el silenciamiento de genes, como en el caso del silenciamiento prolongado de genes homeóticos Hox en *Drosophila*. Se han descrito grupos policomb en humanos y ratones.

Los factores de maduración del ARN transcrito primario a mensajero se encuentran reunidos en pequeños grupos de 25 a 50 distribuidos en todo el nucleoplasma, se denominan **manchas nucleares**. Las manchas nucleares son un tipo de gránulos de intercromatina. Corresponden a estructuras que almacenan y pueden llegar a ensamblar los componentes de la maquinaria de maduración del ARN (splicing).

Un **cuerpo de Cajal** (o cuerpo enrollado) es una estructura subnuclear definida por la presencia de la proteína coilina, contiene proteínas adicionales y moléculas de ARN, en particular, snRNA7 se encuentra en altas concentraciones; y podría ser el sitio de ensamble de ARN pequeños: snRNA y snoRNA que ensamblan proteínas en el procesamiento del ARN. El ARN snRNA7, participa en el procesamiento del transcrito primario de las histonas. Coilina y snRNA7 participarían en la nucleación de los Cuerpos de Cajal.

Los cuerpos de Cajal se consideran organelos nucleares que juegan un rol fundamental en la transcripción y procesamiento del ARN. En el núcleo de *Xenopus* se han descrito de 50 a 100 Cuerpos de Cajal de 10 micrómetros de diámetro. Al someter a un estrés térmico a los oocitos de *Xenopus*, se originan los Mini Cuerpos de Cajal, de 2 micrómetros de diámetro. Se ha planteado que los mini cuerpos de Cajal se originan desde la superficie de B-snrposomas. Los B-snrposomas son cuerpos esféricos de 2 a 4 micrómetros de diámetro dispersos por el nucleoplasma del núcleo o vesícula germinal del oocito de *Xenopus*. Corresponden a las manchas nucleares de los núcleos interfásicos. Cabe señalar que el oocito es un gameto producto de la meiosis.

Los cuerpos de Cajal y los nucleólos comparten varias características biológicas que incluyen una estrecha proximidad física, similar composición de proteínas, desensamble durante la mitosis y asociación con loci polimórficos específicos. Los Cuerpos de Cajal están asociados preferencialmente con sitios cromosómicos específicos en cromosomas (locus) que codifican para histonas y para varios tipos de ARN nuclear pequeños (del inglés: small nuclear RNA). Sin embargo, la mayor parte de los Cuerpos de Cajal están en forma libre en el nucleoplasma.

Un **cuerpo Gem** es una estructura subnuclear, similar a los cuerpos de Cajal y frecuentemente adyacentes a estos; también contiene proteínas específicas y pequeños ARN. Tienen estrecha asociación con las proteínas SMN y gemin2. Se encuentran frecuentemente yuxtapuestos a los cuerpos de Cajal y aunque alguna vez se consideraron dos estructuras separadas pero relacionadas, los cuerpos gem y de Cajal son considerados ahora dos manifestaciones de la misma estructura. La comunicación entre los cuerpos de Cajal y los cuerpos gem es mediante coilina. La coilina contiene residuos de arginina dimetilada dentro de una caja que modula la afinidad con SMN (proteínas motoras neuronales). La inhibición de la metilación o mutación de la caja RG decrece la interacción de coilina con SMN, dando por resultado los cuerpos Gem separados de los cuerpos de Cajal. Cuando la coilina está metilada, los cuerpos de Cajal y los cuerpos Gem son coincidentes.

La función de los cuerpos de Cajal y los Gem es estar involucrados en la biogénesis y el tráfico de snoRNP y snRNP, que se mueven a través de los cuerpos de Cajal en ruta a los nucleólos o manchas de splicing o de maduración del ARN. Evidencias recientes indican que los Cuerpos de Cajal podrían ser el sitio de la biogénesis de ARN de la telomerasa. También contienen fibrillarina, una posible ARN metiltransferasa.

Los **cuerpos de clivaje** aparecen con frecuencia como 1 a 4 focos de 0,3 a 1 micrómetro y contiene varios factores que están implicados específicamente en los pasos de clivaje y poliadenilación del procesamiento del transcrito primario. Estos factores incluyen el factor de estimulación de clivaje (CstF) y el factor de especificidad de la poliadenilación (CPSF), ambos necesarios para el procesamiento de terminación 3' de la poliadenilación de los mensajeros. Los factores de clivaje generalmente se traslapan o se localizan adyacentes a los

cuerpos de Cajal, con un subconjunto no asociado a los cuerpos de Cajal que contienen el ARN transcrito primario. También se ha demostrado que la proteína DEAD reside en los cuerpos de clivaje donde no hay ARN transcrito primario, sugiriendo que podrían existir diferentes subclases de cuerpos de clivaje. La asociación de los cuerpos de clivaje y los cuerpos de Cajal es dinámica y dependiente del ciclo celular. Los cuerpos de clivaje aparecen coincidentes con los Cuerpos de Cajal en G_1 , luego adyacentes a estas estructuras en la fase S y finalmente aparecen menos definidos o ausentes ambos en G_2 .

Heterocromatina. El ADN en las células eucarióticas se encuentra organizado asociado a proteínas denominadas histonas formando la cromatina. La cromatina es un complejo de nucleoproteínas que cumple la función de facilitar la regulación génica, la replicación del ADN, la cohesión de las cromátidas entre otros aspectos de organización celular. Se pueden distinguir mediante tinciones en el núcleo dos regiones de cromatina que se tiñen con distinta intensidad, la región teñida con mayor intensidad corresponde a heterocromatina y aquella menos intensa a eucromatina. La heterocromatina se encuentra distribuida en centrómeros (banda C-positiva), en el brazo largo del cromosoma Y de humanos y de ratones.

La heterocromatina tiene una estructura más compacta que el resto de la cromatina. Los factores responsables de esta característica no han sido completamente caracterizados, uno de estos factores corresponde a la proteína de la heterocromatina HP1 que se une a la fibra de cromatina mediante un residuo metilado en lisina 9 de la cola de la histona H3. De acuerdo a estudios recientes el término heterocromatina es usado en forma incorrecta al describir como cromatina transcripcionalmente silenciada. Los genes reprimidos tienen factores proteicos similares asociados a ellos como heterocromatina pero en muchos casos sólo una corta región de la fibra de cromatina está cerrada. Por lo tanto estas regiones no constituyen dominios de heterocromatina cuando es posible reabrir estas secuencias y expresar los genes de estos loci. La verdadera heterocromatina cubre grandes regiones de la cromatina que es capaz de formar un dominio represivo dentro del núcleo. El silenciamiento de otros genes puede ser facilitado trasladándolos al interior de estos dominios silenciados, generalmente en la región central de los dominios cromosómicos, mientras que los genes transcripcionalmente activos y los genes que pueden ser reactivados se encuentran hacia el exterior de estas regiones silenciadas, frecuentemente en la

superficie de estos territorios. Existiría un complejo de remodelamiento de la cromatina HuCHRAC localizado en la heterocromatina que facilitaría el posicionamiento regular de los nucleosomas dentro de la heterocromatina permitiendo por lo tanto la formación estable de la estructura de cromatina o bien la heterocromatina funcionaría como un estanque de complejos proteícos que son requeridos para reprimir la transcripción de genes tales como histona desacetilasa y complejos de remodelación de nucleosomas.

Los **dominios OPT** (Oct/PTF/Transcripción) son dominios transcripcionalmente activos ricos en PTF, Oct1, TBP, SP1 y ARN polimerasa II. Estos dominios tienen 1 a 1,5 micrómetros de diámetro y además de los factores de transcripción, contienen también transcritos primarios en formación. Cada núcleo de células de mamífero contiene de uno a tres dominios OPT que aparecen en G₁, en estrecha proximidad al nucléolo, y desaparecen en fase S. Los dominios OPT aparecen asociados con una banda del brazo corto del cromosoma 6 (banda 6p10) y al cromosoma 7, por lo tanto estaría asociado a genes específicos en estos cromosomas donde se concentran factores de procesamiento y transcripción que facilitan la expresión de estos genes. La función precisa de estas estructuras nucleares es desconocida. Con el nucléolo además comparten otro rasgo similar aparte de la asociación con genes específicos, y es la de contener ARN polimerasas. El nucléolo contiene ARN polimerasa I que transcribe genes ribosomales. Los dominios OPT contienen ARN polimerasa II y III. Los dominios OPT y los nucléolos pueden aparecer próximos entre sí en el núcleo, pero no se traslapan.

Nucleoplasma propiamente tal contiene proteínas nucleares difusas que no se encuentran presentes en los nucleolos como por ejemplo muchos factores de transcripción con motivo dedos de zinc.

Miopatías mitocondriales.

Las miopatías mitocondriales muestran a la microscopía electrónica mitocondrias de morfología anormal como por ejemplo escasez de crestas dando a la mitocondria un aspecto vacuolar o bien apareciendo como remolinos formado panales al interior de la mitocondria. Estos cambios estructurales tienen repercusión en trastornos en el transporte de electrones o en la ATP sintasa.

Peroxisomopatías.

Los peroxisomas que presentan un malfuncionamiento son la causa de numerosas enfermedades genéticas humanas causadas ya sea por la deficiencia en la actividad de alguna enzima, que por tanto bloquea una vía metabólica o bien por defectos en el transporte hacia la matriz del peroxisoma de los componentes de este compartimento. Las vías metabólicas principales que ocurren en la matriz del peroxisoma son:

- a) beta oxidación de ácidos grasos
- b) alfa oxidación de ácidos grasos
- c) síntesis de colesterol y varios isoprenoides
- d) síntesis de éter fosfolípidos
- e) biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados

Algunas de las enfermedades mejor descritas son las denominadas de acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga como la Adenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (X-ALD), que implica alteraciones en la vía de la beta oxidación de los ácidos grasos, acumulándose en este caso ácidos grasos saturados de 24 y 26 carbonos. Se han descrito seis fenotipos distintos. Algunos de los cuales se caracterizan por una progresiva pérdida de mielina cerebral, iniciándose en la infancia, alrededor de los 3 a 10 años, es una enfermedad muy severa, muriendo los niños que la padecen en dos o tres años del inicio de los primeros síntomas. Todos los enfermos corresponden a niños que han heredado el gen defectuoso de su madre portadora sana. Hay otro fenotipo correspondiente a la enfermedad iniciada en la adolescencia entre los 10 y 21 años de edad. Un tercer fenotipo corresponde a enfermas heterocigotas que desarrollan la enfermedad en la etapa adulta, muchas de ellas mal diagnosticadas confundiendo los síntomas con psicosis o esquizofrenia.

El gen *ald* codifica una proteína sintetizada en la vía citosólica, ALD, semejante a una proteína que forma el canal de cloruros cuyo defecto causa la fibrosis quística, perteneciente a las denominados proteínas ABC. La proteína ALD es un semitransportador con seis dominios transmembrana que funciona como homodímero o heterodímero con otros transportadores ABC. Este transportador ALD está involucrado en el transporte de ésteres Coenzima A-C26:0 a través de la

membrana del peroxisoma, por lo que su defecto es causa de acumulación de estos ácidos grasos en la célula.

Las personas que presentan la enfermedad XALD, tienen un gen alterado por mutaciones de distinta naturaleza tales como deleciones, inserciones y mutaciones de punto, lo que a nivel molecular puede manifestarse como ausencia total de la proteína en la membrana del peroxisoma.

Laminopatías, como ejemplos de disfunción patológica del núcleo.

Las laminopatías son enfermedades causadas por mutaciones en las láminas tipo A en diferentes procesos celulares, afectan principalmente los tejidos de origen mesodémico. Las láminas, están directamente implicadas en procesos de división celular y apoptosis, principalmente porque la lámina debe desintegrarse a fin de permitir que transcurran estos procesos.

Los niveles celulares, vale decir la concentración de las láminas A/C están directamente relacionadas con la actividad proliferativa de la célula. La expresión de las láminas es incrementada en células altamente diferenciadas, con el fin de mantener la estructura del núcleo, mientras que su expresión es disminuida en células con alta capacidad proliferativa.

El gen que codifica para las láminas de tipo A (LMNA) produce por splicing alternativo cuatro proteínas distintas que son lamina A, lamina A_{del10}, lamina C, lamina C₂. Se ha demostrado en al menos nueve patologías, las mutaciones en este gen es responsable de la manifestación de estas enfermedades. Entre ellas hay algunas de envejecimiento temprano como un caso atípico de Síndrome de Werner y la progeria de Hutchinson-Gilford. Hay algunas distrofías musculares, que se heredan en forma autosómica dominante como la distrofia muscular Emery-Dreifuss y la distrofia muscular cintura-piernas que presenta problemas de conducción atrioventricular. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2, una enfermedad autosómica recesiva que se manifiesta como una neuropatía axonal.

Referencias.

Becker W.M., Kleinsmith I.J. & Hardin J. 2000. The World of the Cell (San Francisco, Ca. B Cummings). p. 753.

Coulombe PA, Ma L, Yamada S, Wawersik M. 2001. Intermediate filaments at a glance. *Journal of Cell Science* 114, 4345-4347.

Kurbatova EM, Dutova TA, Trotsenko, YA. 2005. Structural, functional, and genetic aspects of peroxisome biogenesis. *Russ J Gen* 41(2):149-165.

Smith CA & EJ Wood 1997. *Biología Celular*. Addison-Wesley Iberoamericana. Wilmington. Delaware. USA. 367 pp.

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la UdeC

CAPITULO IV

CICLO CELULAR, APOPTOSIS Y ENVEJECIMIENTO

Fidelina González, Gabriela Sconzo, Giussepina Turturici, Fabiana Geraci, Giovanni Giudice
Depto Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo. Università di Palermo. Palermo. Italia.

1. Ciclo celular.
 1. Mitosis.
 2. Meiosis.
 3. Genes y control del ciclo celular.
 4. Genes supresores y protooncogenes.

2. Ciclo celular y apoptosis.
 1. Apoptosis versus necrosis.
 2. Cambios morfológicos.
 3. Mitocondria y apoptosis.
 4. Formación del apoptosoma. Estructura del apoptosoma humano.
 5. Caspasas.

3. Tipos de apoptosis.
 1. Apoptosis mediada por el ligando Fas.
 2. Apoptosis inducida por TNF (factor necrótico tumoral).
 3. Apoptosis estimulada por linfocitos T citotóxicos.
 4. Apoptosis por disminución de factores de crecimiento.
 5. Lesión del ADN mediada por apoptosis.

4. Envejecimiento.

DESARROLLO DE LOS TEMAS

Ciclo celular.

Una de las propiedades de la materia viviente es la capacidad de autoreplicarse. La célula se reproduce duplicando su contenido y dividiéndose en dos. En los organismos multicelulares los ciclos de división celular se requieren para reemplazar las células que se pierden en forma natural, en los organismos unicelulares es la forma de aumentar el número de individuos de la población, esto incluye a eucariontes y procariontes.

Se puede definir el ciclo celular como una serie ordenada de eventos que culmina en la duplicación celular.

El rol del ciclo celular en eucariontes se puede resumir en los siguientes puntos:

- a) Aumento del número de células en un organismo.
- b) Reparación de células que se han perdido en forma natural, incluyendo a aquellas que se pierden por apoptosis.
- c) Participación en la diferenciación y el desarrollo de los organismos.
- d) Forma de reproducción de unicelulares.

Fases o etapas del ciclo celular.

El ciclo celular está dividido en cuatro fases principales: G_1 , S, G_2 y M. Las fases G_1 , S, G_2 son parte de la interfase y M corresponde a la mitosis.

Fase G_1 . En esta etapa, la célula aumenta de tamaño, incluyendo aumento de organelos, estructuras proteicas y enzimas. Es una etapa caracterizada por una intensa actividad metabólica. La célula aumenta el número de ribosomas y algunas estructuras como los elementos de citoesqueleto son sintetizados. Las estructuras membranosas (organelos) como los componentes de la vía secretora: Complejo de Golgi, vacuolas y vesículas se forman a partir del retículo endoplásmico que aumenta de tamaño por síntesis de proteínas y lípidos

generándose así nuevas membranas que migran como vesículas asociadas al citoesqueleto para formar las nuevas estructuras. Las mitocondrias también se duplican. Se inicia la duplicación de los centríolos que culmina en la fase G_2 , donde se inicia la separación de estas estructuras. La duración de esta etapa es variable, y puede abarcar desde algunas horas a meses o años. Las células que no se dividen como las células nerviosas o del músculo esquelético entran en esta etapa a una etapa en la que permanecen debido a su diferenciación celular que corresponde a G_0 . Los linfocitos, células que cumplen funciones de defensa celular se dividen en respuesta a ciertos estímulos, por lo tanto se dividen relativamente poco en comparación a otras células, estos se encuentran en G . Al final de esta etapa se inicia la síntesis de las proteínas necesarias para que ocurra la replicación del ADN en la fase S.

Fase **S**. En esta etapa se duplica el ADN y proteínas asociadas. A medida que avanza el ciclo el ADN celular aumenta en cantidad hasta un máximo que corresponde al ADN nuclear completamente duplicado. En este momento hay dos cromátidas por cromosoma, y corresponden a las cromátidas hermanas.

En la fase S hay una replicación diferencial de la cromatina del núcleo. En primer lugar se duplica la **eucromatina** y en la fase final lo hace la **heterocromatina**.

La duración de la fase S se ha establecido en 7 a 8 horas en células de mamífero en cultivo.

Fase G_2 . Durante esta fase continua el crecimiento celular y se sintetizan las proteínas que participarán en la mitosis. Se terminan de formar los centríolos y al final empieza la separación de estos, evento que culmina en la metafase donde conforma el eje de anclaje del huso mitótico necesario para el movimiento de los cromosomas.

Fase **M**. La mitosis se divide al menos en cuatro etapas que son: Profase, Metafase, Anafase y Telofase.

Profase: se inicia con la condensación (enrollamiento de la cromatina) para conformar los cromosomas. Cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas que se duplicaron en la fase S de la interfase. Las cromátidas

permanecen unidas a través del centrómero, que es requerido en la profase para una adecuada segregación o separación de las cromátidas hermanas. Al final de la profase cada centríolo se mueve a los polos de la célula para conformar el huso mitótico. El huso mitótico es una estructura conformada por dímeros de tubulinas que conforman microtúbulos como se vió en un capítulo anterior. El huso se ensambla inicialmente por fuera del núcleo. A nivel celular los cambios observados en la célula en mitosis son un aumento de la viscosidad del citoplasma en general, desorganización de los organelos de la vía secretoria, y al final de la profase vesiculación de la envoltura nuclear. Estas vesículas permanecen visibles alrededor del huso mitótico. El huso mitótico empieza a crecer hacia el espacio nuclear. Alrededor del centrómero se organizan complejos proteicos especializados denominados cinetocoros a los cuales se anclan las fibras del huso. Denominándose a estas fibras como fibras cromáticas o cinetocóricas a diferencia de aquellas que unen los polos de la célula como acromáticas o polares. Las fibras cinetocóricas ejercen tracción sobre los cromosomas.

Metafase: Los microtúbulos cinetocóricos alinean los cromosomas en el plano ecuatorial de la célula. Cada cromosoma es sometido a tensión en la placa metafásica manteniendo a los cromosomas en el centro de la célula, conformando la placa metafásica, y conectado a través del cinetocoro con el polo mediante las fibras del huso.

Anafase: La anafase se inicia con la separación de los centrómeros de los cromosomas a través de la tracción que hacen las fibras del huso hacia los polos de la célula, lográndose la separación de las cromátidas hermanas. Cada cromátida en los polos de la célula constituye un cromosoma que formara parte del nuevo núcleo y a partir del cual se replicará la información en la fase S del ciclo celular. La anafase es una de las etapas más cortas de la mitosis.

Telofase: La telofase implica el fin de la mitosis, las cromátidas hermanas separadas llegan a los polos y los cinetocoros desaparecen. Los microtúbulos cinetocóricos se elongan aún más y se reorganiza la envoltura nuclear alrededor de los cromosomas hijos. La cromatina se expande y reaparecen los nucleólos. La división del citoplasma denominada citocinesis o citoquinesis se inicia por un proceso denominado clivaje o formación del surco de clivaje, iniciándose durante la anafase. En las células animales la membrana celular de la mitad de la célula se invagina para formar una depresión de clivaje que se profundiza gradualmente

entre los dos núcleos hijos. En el lugar del surco de clivaje, se forma un anillo de actina contráctil perpendicular a las fibras del huso mitótico.

Meiosis.

La meiosis es una división celular especializada que ocurre en las células germinales dando origen a los gametos. En la meiosis hay dos divisiones celulares sucesivas sin duplicación del ADN, esta ocurre sólo antes de entrar a la meiosis. La obtención del número haploide ocurre al final de la primera división meiótica, cuando se separan los cromosomas homólogos apareados durante la **Profase I**. La importancia genética de la meiosis en la variabilidad de la especie se puede resumir en lo siguiente:

En el Paquinema de Profase I ocurre entrecruzamiento o crossing-over, que es el intercambio de segmentos de ADN entre cromátidas homólogas catalizado por nódulos de recombinación que conforman el complejo sinaptonémico. En este proceso es cortado un fragmento de ADN de una cromátida homóloga por la actividad nucleasa del nódulo y fusionado a su homóloga por una ligasa procediendo luego a la corrección de posibles eventos de mal apareamiento de bases mediante polimerasas.

El **complejo sinaptonémico** está conformado por dos elementos proteícos laterales al que se sujeta cada cromátida homóloga duplicada y uno central que sirve de nexo entre los elementos laterales.

En **Metafase I** ocurre el evento de máxima recombinación existente, y es la permutación cromosómica, en este caso se ordenan al azar los cromosomas heredados de ambos padres, respecto a los polos de la célula. Las posibles combinaciones de los genomas haploides paternos y maternos alcanzan a ser en la especie humana de 2^{23} , es decir entre 8 y 9 millones de combinaciones posibles.

Tanto en Anafase I como en Anafase II ocurre la **segregación**, de los cromosomas homólogos y de las cromátidas hermanas que han recombinado respectivamente.

Los eventos que suceden en la **Profase I** se han dividido en 5 etapas:

Leptonema: Los cromosomas homólogos en estado no condensado, unidos a la lámina periférica nuclear a través de los elementos proteícos unidos a los telómeros (extremos del cromosoma) comienzan a migrar hasta encontrarse con su homólogo.

Cigonema: Se inicia el apareamiento o sinapsis de homólogos con la aparición de los elementos laterales unido a cada cromosoma homólogo unidos por el elemento central que hace de cierre del complejo sinaptonémico. Todo esto va a conformar finalmente una tétrada o bivalente.

Paquinema: Las 23 tétradas o bivalentes en las células germinales humanas conforman las unidades en las cuales se llevará a cabo el entrecruzamiento o crossing-over entre cromátidas homólogas.

Diplonema: Desorganización de las tétradas o bivalentes. En algunas especies en este período ocurre una profusa transcripción de mensajeros y genes ribosomales, especialmente se ha comprobado en oocitos en formación de insectos, donde se han descrito los llamados cromosomas plumulados, que transcriben genes ribosomales.

Diacinesis: Terminalización de los quiasmas. Los quiasmas son los puntos del cromosoma donde ocurrió entrecruzamiento, los cromosomas homólogos permanecen unidos por estos puntos durante algún tiempo hasta que estos se desplazan hacia los telómeros lo que permite finalmente su separación. Luego de esto se inicia la condensación o enrollamiento de la cromatina.

Control del ciclo celular. El ciclo celular. Puntos de control del ciclo celular.

Los puntos de control del ciclo celular constituyen una forma de asegurar que una célula en división traspare copias exactas de sus genomas a la próxima generación. Estas vías de vigilancia tienen como función detectar estructuras anormales o dañadas del ADN, coordinar la reparación del ADN y facilitar la progresión del ciclo celular, dando el tiempo suficiente para permitir los procesos de reparación. Así estos procesos retardan o detienen la progresión del ciclo celular momentáneamente. Si no ocurre la reparación la célula sufre apoptosis.

Mecanismos de los puntos de control del ciclo celular.

Estos mecanismos responden a señales que indican un mal funcionamiento, y el ciclo celular se detiene. Hay tres puntos de vigilancia del ciclo:

- a) **Punto de control de la fase S.** En este punto hay control sobre el crecimiento celular. Una señal de no replicación del ADN impide que se inicie la mitosis y el ciclo celular se arresta o detiene en S.
- b) **Control G₂/M.** En este punto de control se verifica que el ADN se encuentre duplicado por lo tanto hay control sobre el aparato de replicación del ADN, que el crecimiento celular sea el apropiado, hay control sobre el crecimiento celular.
- c) **Punto de control de la metafase.** Aquí hay control sobre el alineamiento de los cromosomas en el ecuador de la célula. Una señal que indique que el huso mitótico no está correctamente ensamblado a los cromosomas, y que por lo tanto los cromosomas no se encuentran bien alineados en el ecuador de la célula, entonces se impide la anafase, y hay arresto en M.

Proteínas de los puntos de control.

Las vías de puntos de control implican tres grupos principales de proteínas que actúan en conjunto para traducir la señal de ADN dañado en respuesta a la detención o arresto del ciclo celular y reparación del daño. Estos grupos incluyen:

1. **Proteínas sensoras** que reconocen el daño del ADN directa o indirectamente y funcionan señalando anomalías, e inician una cascada bioquímica de activación.

Estas proteínas pueden ser clasificadas como:

- Parecidas o semejantes a RFC1: Rad17.
- Parecidas a PCNA: Rad9, Rad1, Hus1.
- Que contienen BRCT: BRCA1, TopBP1.
- Que reconocen o reparan DSB: Mre11, Rad50, Nbs1.
- Proteínas de replicación que reclutan polimerasas TopBP1.

- Polimerasas necesarias para la replicación: Pol2.
- ADN helicasa: BLM, WRN.
- Topoisomerasa: Top3.
- Cargador de horquilla: Rfc2-5.
- Que se une al ADN hebra simple: Rpa2.

2. **Proteínas transductoras de las señales**, típicamente proteínas quinasas, que reciben la señal de daño y la amplifican, fosforilando otras quinasas o proteínas blanco.

- PI3-quinasas (PIKK): ATR, ATM.
- Par de unión de PIKK: ATRIP.
- Quinasas efectoras: Chk1, Chk2.
- Estabilizadores de la horquilla de replicación: Claspin.

3. **Proteínas efectoras** que incluyen la mayoría de los blancos de las proteínas transductoras y así son reguladas, usualmente por fosforilación, evitando la progresión del ciclo.

El ciclo celular está regulado por dos vías distintas desde el punto de vista de la regulación génica:

- a) una vía controlada por genes que actúan normalmente frenando la división celular, correspondientes a los **genes supresores de tumores** y
- b) por genes que promueven la división celular que se denominan **protooncogenes**, que funcionan normalmente promoviendo la división celular.

Genes Supresores de tumores.

Las mutaciones que afectan a los genes supresores de tumores y que produce inactividad de sus productos proteicos o ausencia de ellos, las células proliferan de forma descontrolada.

Se ha demostrado que variados casos de cáncer que afectan a familias están asociados a pérdida de la función de tumores supresores causando síndromes. Un síndrome se define como el conjunto de signos o síntomas que se manifiestan en conjunto y que pueden asociarse a un origen o causa común.

Algunos de estos incluyen a los genes que producen los síndromes de susceptibilidad de retinoblastoma (RB), tumores de Wilms, neurofibromatosis tipo I, adenomatosis de pólipos de colon, von-Hippel-Lindau, y aquellos identificados por la pérdida de heterocigosidad tales como carcinoma colorectal (DCC, delección del carcinoma de colon) y p53.

p53.

La pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 17 ha sido asociada con tumores de pulmón, colon y mama. Esta región incluye al gen p53. El gen p53 fue descubierto originalmente porque formaba complejos con algunos antígenos. Se pensó en un comienzo que se trataba de un oncogén ya que clones de ADN copia (ADNc) aislados desde líneas tumorales eran capaces de cooperar con el oncogén Ras en ensayos de transformación. En las líneas celulares normales, p53 es incapaz de cotransformar en presencia de ras. Las proteínas mutantes p53 se demostró que tenían alterada su estabilidad y conformación así como su capacidad de unión a la chaperona hsp70. Análisis posterior de varias líneas celulares de leucemia demostraron que el locus p53 se pierde por inserción o delección de ambos alelos, lo que sugiere que el tipo silvestre es un supresor de tumores y no un protooncogén dominante. Se ha demostrado que la mutación en el locus p53 es frecuente en varios tipos de neoplasias más que cualquier otro gen supresor o protooncogén.

La proteína codificada por p53 es una fosfoproteína nuclear. Tiene un dominio ácido en el extremo N-terminal, similar a muchos factores de transcripción, que la define como un factor de transcripción. La proteína P53 es un tetrámero que se puede unir al ADN para promover la síntesis de otras proteínas implicadas en la supresión del crecimiento celular. Una de las principales proteínas blanco es la proteína del gen p21, que es una proteína inhibitoria del ciclo celular (denominada p21CIP) que da por resultado la detención o arresto en las fases G₁ y G₂ del ciclo celular. También se ha demostrado una función

adicional de bloquear la unión de la ADN polimerasa del virus SV40, bloqueando la replicación del ADN viral. Se sugiere que podría regular la iniciación de la síntesis de ADN debido a su rol implicado tanto en la transcripción como en la replicación. Varias mutaciones en este gen dan por resultado células mutantes que tienen afectadas de distinta manera su ciclo celular.

La fosforilación regula la actividad de la proteína p53. El nivel de p53 es bajo después de la mitosis pero aumenta durante G_1 . Durante la fase S la proteína es fosforilada por el complejo MPF y también por la caseína quinasa II (CKII).

Retinoblastoma (RB).

El locus del gen RB se ubica en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14). Este gen ha sido identificado mediante la clonación de un transcrito de 4,7 kb. El gen RB comprende 27 exones que promedian 180 kb en el cromosoma. Este gen tiene dos intrones de gran tamaño, aproximadamente de 35 y 70 kb. El producto del gen es una proteína de 110 kDa conformada por 928 aminoácidos. Corresponde a una proteína localizada en el núcleo.

Existen muchas mutaciones que producen la pérdida de la función del gen. La mayor parte corresponden a deleciones. Otro tipo de mutaciones corresponden a mutaciones de punto o errores de maduración del transcrito primario.

La principal función de pRB es la regulación de la progresión del ciclo. Su capacidad de regular el ciclo celular está correlacionada con el estado de fosforilación de pRB. La pRB es fosforilada por el complejo SPF, inactivando la función de la proteína. La fosforilación es máxima al inicio de la fase S menor después de la mitosis y al inicio de la fase G_1 . La proteína pRB fosforilada se encuentra presente en las fases S y G_2/M , y no fosforilada en estado G y G_1 del ciclo. La estimulación de células quiescentes con sustancias que estimulan la mitosis (mitógenos) induce la fosforilación de pRB, sin embargo, la diferenciación celular es inducida por pRB no fosforilada. Por lo tanto la forma no fosforilada de RB suprime la proliferación celular.

Por lo tanto, la pRB puede ser parte del punto de control en G_1 . En células en reposo G_0 o G_1 la pRB no está fosforilada y corresponde a la proteína activa y detiene el paso a través del ciclo celular. Sólo antes que la célula entre a la fase S, pRB es modificada por fosforilación correspondiente a la forma inactiva de la proteína, permitiendo que la célula pueda hacer mitosis.

La proteína pRB está presente en todos los tipos de células y tejidos examinados hasta ahora y se encuentran en todos tipos de células tanto las que se encuentran en proliferación como aquellas que están en reposo y en todas las fases del ciclo celular, lo que cambia solamente es su estado de fosforilación.

A nivel molecular, pRB en el núcleo interactúa con la proteína EF2, un factor de transcripción. Cuando la célula pasa de G_1 a S el complejo SPF fosforila la pRB induciendo un cambio conformacional en la proteína que induce la liberación del factor EF2 de la pRB. Así EF2 queda libre para transcribir genes que se necesitan para que el ciclo celular prosiga, participando incluso en su propia transcripción.

Por lo tanto, en células donde pRB no funciona a causa de mutación, o está ausente, el factor EF2 no está regulado y permanece activo. Esto permite una expresión permanente de los genes necesarios para pasar a través del ciclo celular, ocurriendo proliferación descontrolada. En conclusión pRB es un gen supresor que es un punto de control importante entre ciclo celular y transcripción de genes.

En las formas de cáncer familiar hereditario causado por pRB, los individuos que heredan una forma mutada del gen heredada de uno de sus padres, pueden sufrir una segunda mutación somático (en la línea celular) que inactiva el alelo normal, dando por resultado el desarrollo del retinoblastoma.

Protooncogenes y Oncogenes.

Los protooncogenes corresponden a genes que codifican proteínas que estimulan la proliferación celular, los oncogenes corresponden a mutaciones de los protooncogenes que pueden ser más activos que los genes normales o ser activos en tiempo o de una forma no apropiada.

Los protooncogenes juegan un rol importante en la regulación del ciclo celular y la diferenciación celular. Los protooncogenes se clasifican en varios tipos, estos pueden ser:

- Factores de crecimiento.
- Receptores de tirosin quinasa y serin-treonino quinasa.
- Receptores sin actividad quinasa.
- Proteína G asociada a la membrana activada por receptores de superficie.
- Reguladores citoplasmáticos.
- Factores de transcripción nuclear.

Ciclo celular y apoptosis.

Apoptosis. Apoptosis versus necrosis (Tabla 1).

La apoptosis es una muerte celular controlada que mantiene los contenidos celulares de la célula muerta reciclándolos. Está definida por una serie de cambios celulares:

- Primero la célula se contrae, pierde contacto con las células vecinas o la matriz extracelular y comienza a mostrar proteínas intracelulares en su superficie.
- La cromatina del núcleo se condensa y el ADN se rompe en fragmentos de 180 pares de bases, lo que lleva a la característica escalera de ADN cuando se somete a un gel de electroforesis.
- La membrana plasmática comienza a mostrar apariencia de burbujeo y pequeños cuerpos vesiculares se desprenden conteniendo el material intracelular que incluye material nuclear y organelos citoplasmáticos, los que están usualmente inalterados.
- Los fragmentos reciben el nombre de cuerpos apoptóticos o cuerpos apoptóticos y son removidos rápidamente por fagocitos o por células vecinas.
- Si lo anterior no ocurriese rápidamente, la membrana plasmática y los organelos intracelulares pueden romperse dando origen a la lisis de fragmentos, lo que se conoce como lisis secundaria.

Necrosis es una muerte celular no controlada caracterizada por:

- la célula se hincha y se induce el daño mitocondrial que lleva a una rápida disminución de los niveles de energía.
- una pérdida del control homeostático celular.
- lisis de la membrana celular y liberación de los contenidos intracelulares, que lleva a una respuesta inflamatoria, con edemas y daño de las células circundantes.

Los diferentes resultados de estas dos formas de muerte celular (apoptosis vs necrosis) sugieren que los dos procesos son necesariamente independientes uno de otro, pero no es así. Hay evidencias que demuestran que son procesos complementarios como los siguientes:

- En las neuronas cerebrocorticales se ha observado que breves exposiciones o bajas concentraciones de agonistas (agonista es una molécula que se une selectivamente a un receptor específico y gatilla una respuesta en la célula) del receptor de glutamato causa que la célula entre en la vía apoptótica. Sin embargo, altas concentraciones del mismo agonista produce necrosis en la neurona.
- En la muerte celular por necrosis hay una declinación rápida de los niveles de energía no vistas en la apoptosis y se ha demostrado de forma experimental que el ATP es esencial para que se desencadene la apoptosis. Las células pueden sufrir necrosis en respuesta a estímulos apoptóticos debido a que los niveles de ATP se encuentran agotados.
- Por lo tanto, el tipo de muerte celular experimentada por la célula depende de la intensidad del daño, la duración de la exposición y la posición espacial de la célula, como se verá más adelante.

La apoptosis, es un tipo de muerte celular programada, un proceso donde las células son eliminadas porque ya no se necesitan, como en el proceso de desarrollo, o porque su permanencia en el organismo es negativa, como en el caso que en la célula se originen mutaciones que afecten la homeostasis del organismo. La eliminación de la célula se hace en forma ordenada, evitando la respuesta inflamatoria, que está asociada a la muerte necrótica.

Así, la apoptosis es un proceso celular altamente regulado e implica la activación de una serie de eventos moleculares, que llevan a la muerte celular que

se caracterizan por cambios bioquímicos y morfológicos. El componente central de este proceso es un sistema proteolítico que implica a una familia de proteasas denominadas **caspasas**. Las caspasas son proteasas específicas de la familia de las cisteína aspartato que activan y amplifican la señal en una cascada de caspasas. El efecto clivador de las caspasas culmina en la muerte celular.

Tabla 1. Comparación entre apoptosis y necrosis. (Información obtenida del sitio www.qub.ac.uk/cm/pat/undergraduate/Basiccancer/necrosis_v_apoptosis.htm)

Apoptosis	Necrosis
Fisiológica o patológica	Siempre patológica
Células únicas	Conjunto de células
Dependiente de energía (ATP)	Independiente de energía
Contracción celular	Hinchamiento de las células
Se mantiene la integridad de la membrana	Se pierde la integridad de la membrana
Rol de la mitocondria y del citocromo C	No participa la mitocondria
No se rompen los lisosomas	Se rompen los lisosomas y escapan las enzimas lisosómicas
Cambios nucleares característicos	Pérdida del núcleo
Se forman cuerpos apoptóticos	No se forman cuerpos apoptóticos
Clivaje del ADN	No se produce clivaje del ADN
Activación de proteasas (caspasas) específicas	No hay activación de proteasas específicas
Proceso regulado	No es un proceso regulado
Proceso conservado evolutivamente	No es un proceso conservado
Células muertas digeridas por células vecinas	Células muertas ingeridas por neutrófilos y macrófagos

Caspasas.

Las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad de sustrato. Son expresadas como proenzimas o zimógenos (30-50 kDa), que contienen tres dominios, uno N-terminal, seguido por una subunidad de 20 kDa y otra de 10 kDa. La forma inactiva inicial da paso a una forma activa capaz de clivar a otra caspasa para hacerla activa. Pueden ser

divididas en dos grupos, las **caspasas iniciadoras** (caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10) y las **caspasas efectoras** (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7). Ambos grupos se distinguen estructuralmente, las iniciadoras contienen un gran motivo estructural de interacción proteína-proteína en el extremo amino terminal, mientras que las efectoras tienen un motivo estructural muy pequeño o está ausente. La **caspasa iniciadora** una vez activada, activa a las **caspasas efectoras** en un patrón de **cascada de señales**. Las caspasas efectoras rompen las proteínas de la célula dando por resultado las alteraciones bioquímicas y morfológicas características de la apoptosis.

Las funciones de las caspasas son las siguientes:

1. Arresto del ciclo celular e inactivación de los sistemas de reparación del ADN.
2. Inactivación del inhibidor de la apoptosis (XIAP).
3. Desmantelamiento del citoesqueleto.

Vías de activación de las caspasas.

Hay cuatro vías en la activación de las caspasas:

1. Vía mediada por la mitocondria.
2. Vía mediada por receptor apoptótico.
3. Vía mediada por Granzyma B.
4. Vía mediada por el retículo endoplásmico.

Vía mediada por la mitocondria.

La mitocondria sufre dos cambios durante la apoptosis inducida por agentes neoplásicos, radiación UV, agotamiento de factores de crecimiento y daño del genoma. Uno de estos cambios es el cambio de permeabilidad de la membrana externa, haciéndose ésta permeable a proteínas, dando por resultado la liberación de las proteínas desde el espacio intermembrana, el citocromo C, el factor inductor de la apoptosis y otros. El otro cambio es la reducción del potencial de transmembrana de la membrana interna.

La mitocondria contiene un canal en su membrana interna denominado **poro de permeabilidad transicional (PTP)** que tiene dos estados de conductancia, bajo y alto. El PTP se abre en estado de baja conductancia cuando en la matriz mitocondrial disminuye el pH. Mediante el **proceso de oscilación del poro** se reestablece el control homeostático del calcio intracelular. Con el aumento de la concentración del ión calcio, la entrada de calcio a la mitocondria ocurre de forma lenta y prolongada. Esto no causa un aumento del pH, porque no es modulado por el sistema tampón en el interior de la matriz mitocondrial. La acumulación del ión calcio en la matriz lleva a la unión del calcio a los sitios orientados del PTP hacia la matriz. Cuando se unen dos iones de calcio, el poro se abre irreversiblemente por un estado de alta conductancia, permitiendo que moléculas de tamaños menores a 1500 Da atraviesen el espacio intermembrana. Así, la mitocondria tiene un rol fundamental en la muerte celular de la célula.

Poros de permeabilidad transicional (PTP).

El poro de permeabilidad transicional se ubica en la membrana interna de la mitocondria, que se abre en estado de alta conductancia por aumento desmesurado de los niveles de calcio en la matriz mitocondrial. Esto da por resultado un equilibrio no selectivo de solutos de alta masa molecular. Debido a que la mayoría de las proteínas quedan atrapadas en la matriz hay un **desbalance oncótico** (fracción de la presión osmótica debido a la presencia de grandes moléculas de proteínas) que conduce a un notable hinchamiento del organelo *in vivo*. Como resultado las crestas mitocondriales se despliegan causando la ruptura de la membrana externa de la mitocondria. Esto último lleva a la liberación de solutos contenidos en forma normal en el espacio intermembrana, incluyendo al **citocromo C** y al factor que induce a la apoptosis (**AIF**). El citocromo C, es una pequeña proteína que participa en la cadena de electrones en la respiración celular. En el citosol, el citocromo C activa a la caspasa 3. Mientras AIF activa directamente a la caspasa 3 y a endonucleasas. La inhibición de la liberación del citocromo C y la apertura de PTP es realizada por la proteína antiapoptótica Bcl2, que está localizada en la membrana externa de la mitocondria.

Oscilación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.

La mitocondria tiene un complejo proceso de almacenamiento de Ca^{2+} y liberación de calcio inducida por calcio (CICR). La secuencia de eventos que ocurren en la mitocondria se puede resumir como sigue:

- La cadena transportadora de electrones es conducida por la mantención del gradiente de protones. Esto causa la polarización de la membrana tal que la matriz es negativa respecto al citosol.
- Por lo tanto, el Ca^{2+} entra a la mitocondria a través de uniportadores transmembrana selectivos.
- La cadena respiratoria da cuenta de esta entrada de carga positiva sacando más protones, dando por resultado la elevación del pH que da por resultado la elevación del pH que gatilla la apertura de otro canal, denominado poro de permeabilidad transitoria (PTP).
- Este poro permite la entrada de protones en la matriz que lleva al colapso de la diferencia de potencial y a la salida de Ca^{2+} a través de los uniportadores y de PTP.
- La combinación de la salida de Ca^{2+} y entrada de protones vuelve a acidificar la matriz y el cierre de PTP. La entrada de protones es por lo tanto detenida y la cadena respiratoria restablece el potencial de membrana, llevando a la acumulación de calcio.
- La apertura y cierre de PTP se denomina oscilación del poro. La apertura del canal no es directamente dependiente de los niveles de calcio, sino del pH de la matriz.
- La matriz tiene un sistema tamponado debido a la concentración de ácidos débiles que sustenta al ciclo de Krebs. Es una acción relativamente lenta y por lo tanto no puede tamponar exitosamente un gran volumen de cationes que entra a la mitocondria.
- Esta característica permite que el almacenamiento de calcio tenga lugar cuando la liberación es lenta, y el CICR (del inglés, significa liberación de calcio inducido por calcio) ocurre cuando la liberación es rápida.
- El pH umbral *in vivo* de la apertura de PTP sólo es alcanzada en una neurona en estrecha asociación con los canales que liberan calcio en el retículo endoplásmico y por lo tanto actúa para estimular la señalización intracelular en estos sitios y acoplar el aumento de la actividad neuronal con el aumento de la respiración.

- Otro efecto de la apertura de PTP es la pérdida de polaridad, lo que desacopla la fosforilación oxidativa y la disminución de los niveles de ATP. Por lo tanto, la glicólisis debe suplir los requerimientos energéticos de la célula, que incluye las bombas iónicas de la membrana plasmática. La ATP sintetasa mitocondrial revierte su acción en un intento de restablecer el gradiente de protones y así reponer los niveles de energía celular. Una de las consecuencias extremas de disminución severa del ATP en la célula, ocurre en la muerte necrótica de neuronas.
- Ejemplos de respuesta gradual de los niveles intracelulares de calcio se dan en lo siguiente: Si el ión calcio se encuentra levemente elevado en una célula, la glicólisis puede aportar energía para mantener la célula hasta que se recupere la mitocondria y la célula podría llegar a sufrir apoptosis.
- Sin embargo, si los niveles de ión calcio son demasiado elevados, la depleción del ATP no es suficiente para sustentar la apoptosis y la célula se necrosa.

La liberación del citocromo C lleva a la formación de un complejo heptamérico semejante a una rueda de carreta denominado **apoptosoma** (Figura 1). Este es un complejo de alto peso molecular compuesto por citocromo C, Apaf-1, desoxiadenosina trifosfato y procaspasa-9, que forma una plataforma para un eficiente procesamiento y activación de la caspasa-9. La caspasa-9 tiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa (CARD) en el N-terminal, que se une a citocromo C y APAF-1. La activación de la caspasa-9 cliva las caspasas efectoras caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7. La desregulación de esta vía lleva a condiciones patológicas que incluyen cáncer, autoinmunidad y neurodegeneración.

Vía del receptor apoptótico.

La vía del receptor apoptótico implica a receptores de membrana miembros de la superfamilia del receptor del factor de la necrosis tumoral (TNFR), de los cuales Fas y TNFR son los mejores caracterizados y comparten un dominio característico denominado dominio apoptótico (DD). Luego de la asociación de los receptores con los ligandos se produce un cambio conformacional en el receptor, luego se recluta una molécula adaptadora, Fas asociado al dominio apoptótico

(FADD) o TNF asociado al dominio apoptótico (TNFADD), junto a procaspasa-8 (y probablemente caspasa-10) forman el complejo de señalización inductor de la apoptosis (DISC), desencadenando así el proceso apoptótico. La caspasa 8, la forma activa, actúa como una proteasa que actúa sobre la procaspasa 3, que en su forma activa, la caspasa 3, es el principal efector caspasa de la apoptosis.

Tanto la vía mitocondrial como la vía del receptor desembocan en la caspasa-3 activa. La caspasa-3 entonces puede clivar una serie de proteínas tales como PARP, una enzima reparadora de ADN, las láminas nucleares, proteínas componentes del citoesqueleto (gelsolina y fodrina). Las dos vías apoptóticas pueden estar vinculadas a través de Bid, un miembro de la familia Bcl-2, que se encuentra en el citosol y es clivado por la caspasa 8 para formar una proteína truncada, tBid, que se traslocaría a la mitocondria. En la mitocondria, tBid activa a Bax, iniciando la liberación del citocromo C y la disfunción mitocondrial. Esta alternativa es una conexión entre la vía apoptótica del receptor y de la mitocondria que puede amplificar la activación de la caspasas.

La vía del retículo endoplásmico.

Como ya se vió en el capítulo III, el retículo endoplásmico es el sitio de ensamble de los polipéptidos destinados a la vía secretora. Cuando la célula es expuesta a estrés por agentes tales como la tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación en el retículo endoplásmico y la brefeldina A, un inhibidor del transporte retículo endoplásmico- Golgi, las proteínas no plegadas o mal plegadas se acumulan en el retículo endoplásmico. En esta vía, la caspasa 12, localizada en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico es la caspasa iniciadora que para ser activada debe ser clivada por la proteína cisteína proteínasa m-calpain, pasando de la forma procaspasa-12 a caspasa-12 en condiciones de estrés. La caspasa 12 también tiene un dominio de reclutamiento, como la caspasa-9 que sirve para formar el complejo apoptosoma. Así la caspasa-12 puede ser activada por su asociación con una proteína semejante a Apaf-1. En la vía del retículo endoplásmico, JNK es traslocado en la membrana mitocondrial y estimula la fosforilación de Bim, una proteína Bcl-2, que a la vez es crítica para la liberación del citocromo C dependiente de Bax. Una proteína Bcl-2 marcada al retículo endoplásmico, Bcl-2/cb5, inhibe la liberación del citocromo C mediado por estrés del retículo endoplásmico.

Vía mediada por granzyma.

Los linfocitos citotóxicos, como las células asesinas y los linfocitos T citotóxicos juegan un rol esencial en la disminución de las células infectadas por virus y las células tumorales. Hay dos mecanismos de citotoxicidad usados por estas células que incluye la vía apoptótica mediada por Fas y la exocitosis granular o vesicular. En este último proceso se requieren dos proteínas, la perforina, una proteína que forma poros y facilita la liberación de los componentes granulares en las células blanco, y la otra proteína es la granzyma B, una serina proteasa con especificidad de sustrato similar a la familia de las caspasas. La granzyma B puede inducir la muerte celular en células blanco por medio de dos vías complementarias: una vía citosólica que implica la activación de caspasas proapoptóticas y una vía nuclear que implica a una proteína reguladora del ciclo y/o activación de la quinasa Cdc2. Una vez que los linfocitos T citotóxicos liberan la granzyma B, esta se une a su receptor en la célula blanco y es endocitada, pero permanece arrestada en las vesículas endocíticas hasta que es liberada por la perforina. Una vez en el citosol de la célula blanco la granzyma actúa sobre la caspasa-3, a través de la mitocondria, iniciando la cascada de las caspasas hasta la fragmentación del ADN y la apoptosis. Aquí la granzyma necesita de la ayuda de otras moléculas para procesar la procaspasa-3 a caspasa-3, como el citocromo C, Smac/Diablo y Htra2/omi que son liberados de la mitocondria.

Formación del apoptosoma: Estructura del apoptosoma humano (Yu et al 2005) (Figura 1).

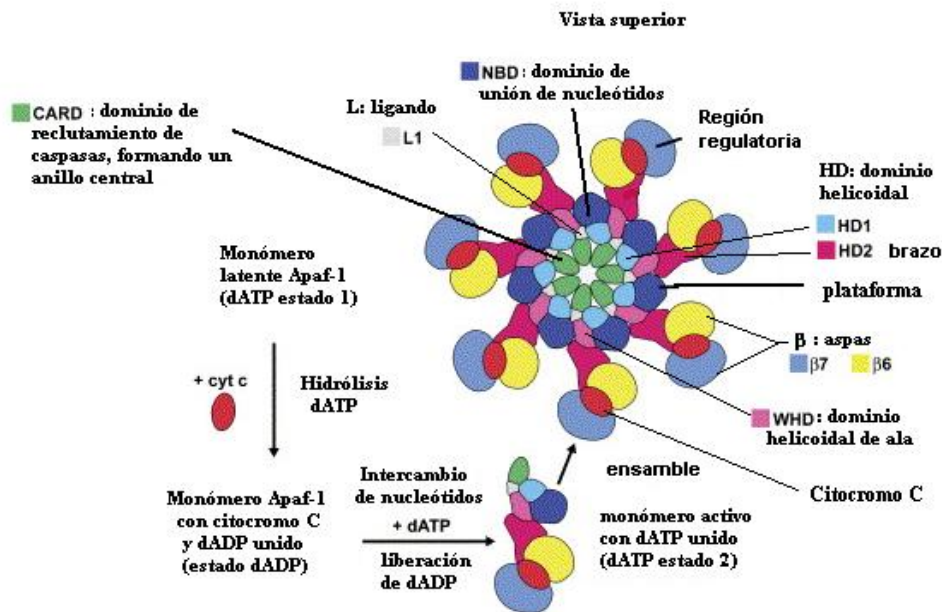
El apoptosoma es un conjunto de proteínas que participan en la apoptosis formando una estructura supramolecular. El coensamble de Apaf-1 y citocromo C en presencia de dATP conforman el apoptosoma que se ha determinado mediante criomicroscopía electrónica. En el apoptosoma hay un dominio de reclutamiento de siete caspasas que forman un dominio de un anillo central denominado con la sigla CARDs. En un radio mayor se observan siete copias de un dominio de unión de nucleótidos y oligomerización denominado con la sigla NOD, asociado lateralmente al centro rodeando el anillo CARD, finalmente un dominio helicoidal semejante a brazos une a cada NOD a un par de aspas que unen un citocromo C. La plataforma central crea un ambiente para la activación de la procaspasa-9.

Vías apoptóticas.

Se pueden distinguir dos vías apoptóticas, dependiendo de donde emerge la señal de apoptosis, externa a la célula, la vía extrínica o desde el interior de la célula la **vía intrínica**.

La **vía extrínica** se inicia en el exterior de la célula, cuando las condiciones del ambiente extracelular determinan que una célula debe morir. Es mediada por receptores que se ubican en la membrana plasmática. Estos receptores son proteínas integrales de membrana de la familia de los receptores apoptóticos como el receptor Fas (CD95), el receptor TNF (factor de necrosis tumoral), etc.

Figura 1. Modelo del apoptosoma humano (Yu *et al* 2005). (Con permiso de la editorial)*



La **vía intrínica** se desencadena cuando el daño ocurre en el interior de la célula. Un daño en la mitocondria puede producir el inicio de la vía intrínica. El daño puede producir necrosis y con esto llevar consigo una respuesta inflamatoria,

pero en su lugar la maquinaria apoptótica asegura que las células sean eliminadas limpiamente, a fin de evitar la inflamación. El daño mitocondrial puede iniciar la vía intrínseca regulando el efecto de la proteína Bcl-2. En esta vía participa el citocromo C de la mitocondria, que tiene como función ser lanzadera de electrones en la cadena respiratoria. El citocromo C liberado de la mitocondria dañada une a Apaf1, que entonces activa a las caspasas iniciadoras en este caso caspasa 9 que luego activa a las caspasas efectoras, caspasa 3. Otras proteínas liberadas de la mitocondria dañada son Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 que contrarrestan el efecto de proteínas inhibitoras de la apoptosis (denominadas con la sigla IAPs) que normalmente se unen y evitan la activación de la caspasa 3. La interacción entre miembros de la familia Bcl, IAPs, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, es el centro de la vía intrínseca de la apoptosis.

Envejecimiento.

El proceso de envejecimiento implica un proceso de post- maduración que conduce a una reducida homeostasis y aumento de la vulnerabilidad del organismo, el término más adecuado es senescencia. El envejecimiento se refiere a cualquier proceso que es dependiente del tiempo. Este proceso implica cambios fisiológicos a nivel orgánico, e implica a factores intrínsecos que son de naturaleza genética y del desarrollo y a factores estocásticos de naturaleza extrínseca.

El proceso de envejecimiento en mamíferos implica al menos 5 características:

- a) Aumento de la mortalidad con la edad posterior a la maduración.
- b) Cambio en la composición bioquímica de los tejidos con la edad. A nivel celular aumentan los niveles de lipofucsina (pigmento) y aumento del entramado de colágeno en la matriz extracelular. Aumenta la tasa de transcripción de genes específicos y la tasa de síntesis proteica y numerosas alteraciones en relación con la edad como la adición de glicanos y oxidación de las proteínas como modificación post-traducciona.
- c) Progresiva disminución de la capacidad fisiológica con la edad. A nivel de riñón por ejemplo, disminuye la filtración del glomérulo.
- d) Capacidad reducida de responder adaptativamente a los estímulos ambientales

con la edad. Una característica fundamental de la senescencia es la disminución de la capacidad de homeostasis.

e) Aumento de la susceptibilidad y vulnerabilidad a enfermedades.

Teorías del envejecimiento.

Estas teorías se pueden agrupar en dos categorías: Estocásticas y Genético-desarrollo.

Las **teorías estocásticas** proponen que el envejecimiento es causado por daño producido al azar en las moléculas que son importantes para la vida. El daño se acumula a un nivel que da por resultado la declinación fisiológica del organismo. Las teorías estocásticas pueden ser resumidas en cuatro categorías:

a) Mutaciones somáticas y reparación del ADN. La teoría de la mutación somática del envejecimiento establece que el daño genético producido por radiaciones produce mutaciones que se acumulan con el tiempo causan daño funcional al organismo llevándolo a la muerte. La exposición a radiaciones ionizantes conducen al acortamiento del promedio de vida por aumento del cáncer más que por envejecimiento *per se*.

La teoría de reparación de ADN es un ejemplo más específico de la teoría de mutación somática. Corresponde a la capacidad de reparación de daño al ADN inducido por radiación ultravioleta. La capacidad de reparar el ADN no cambia con la edad.

b) Error- catástrofe. La teoría error catástrofe propone que errores al azar en la síntesis de proteínas que participan en la síntesis de ADN pueden ocurrir. El proceso de recambio de proteínas elimina estas proteínas reemplazándolas por otras sin errores. Sin embargo, errores en las proteínas implicadas en la síntesis proteica introducirían errores en las moléculas que producen, lo que daría por resultado la amplificación y posterior acumulación de moléculas defectuosas dando por resultado una catástrofe incompatible con la vida.

c) Modificación de proteínas. El envejecimiento es acompañado por disminución de la actividad específica de muchas enzimas, estabilidad alterada a la

temperatura y aumento del contenido de carbonilos en las proteínas. Estos cambios pueden ser causados por oxidación directa de residuos de aminoácidos, oxidación catalizada por metales, modificación por los productos de la oxidación de lípidos y glicosilación. Esta glicosilación no es mediada por enzimas dando origen a una avanzada glicosilación de productos finales, denominados AGEs que aumentan con la edad y que están implicados en la diabetes, desórdenes visuales y acumulación de amiloides. El aumento del entramado del colágeno en la matriz extracelular impide la adecuada comunicación intercelular debido a un entorpecimiento en la difusión de moléculas esenciales.

e) Radicales libres (estrés oxidativo)/ ADN mitocondrial. Se ha propuesto que la mayor parte de los cambios producidos en el envejecimiento se debe a daño molecular producido por radicales libres. Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado, lo que hace que la molécula sea altamente reactiva. El metabolismo aeróbico genera radicales superóxidos que son metabolizados por superóxido dismutasas para transformar el agua oxigenada en agua y oxígeno. El agua oxigenada puede dar origen a un radical extremadamente activo como es el hidroxilo.

El peligro de los radicales libres es que originan reacciones en cadena que atacan macromoléculas y a la vez generan nuevos radicales libres, amplificando su efecto nocivo. Los radicales libres derivados de oxígeno juegan un rol en la regulación de la expresión diferencial de genes, replicación celular, diferenciación y muerte celular por apoptosis debido a que en parte actúan como mensajeros secundarios en las vías de transducción de señales. La sobreexpresión de superóxido dismutasas y catalasas, enzimas detoxificantes de radicales libres en la célula en organismos transgénicos lleva a un aumento del promedio de vida en estos.

La hipótesis ADN mitocondrial / estrés oxidativo representa una síntesis de varias teorías: se propone que las especies de oxígeno reactivas contribuyen significativamente la acumulación somática de mutaciones en el ADN mitocondrial llevando a la pérdida gradual de la capacidad bioenergética dando origen a la muerte celular y envejecimiento. Se ha observado el aumento exponencial de mutaciones de punto y deleciones en el ADN mitocondrial en las mitocondrias del músculo esquelético y en las células somáticas con la edad. Esto aparejado con el hecho que la mitocondria carece de mecanismos de reparación del ADN.

En comparación con el ADN nuclear, el ADN mitocondrial está sujeto a una mayor tasa de mutación que el nuclear porque su tasa de replicación es mayor tanto en células en división como en aquellas que no se dividen y además porque es en la mitocondria donde se genera la mayor cantidad de radicales libres por efecto de la respiración celular. Defectos en la respiración mitocondrial asociada con la edad se ha encontrado en tejidos normales y especialmente en aquellas personas que sufren enfermedades de Parkinson, Alzheimer, corea de Huntington.

Las teorías Genético-Desarrollo consideran que los procesos de envejecimiento son parte de un continuo controlado del desarrollo y la maduración. Es un programa genético que forma parte del desarrollo. Pueden ser resumidas en seis puntos:

a) Genes de longevidad.

Hay una amplia evidencia que el envejecimiento es hereditario. Las mutaciones genéticas pueden modificar la senescencia. Los productos de estos genes que modifican la senescencia actúan en diversas formas:

- modulando la respuesta al estrés.
- sensando en estatus nutricional.
- aumentando la capacidad metabólica.
- silenciando genes que promueven el envejecimiento.

En *Caenorhabditis elegans* se han descrito algunos genes que modifican la respuesta al estrés, intervienen en el desarrollo, en la transducción de señales y la actividad metabólica estos son:

age-1 modifica la tasa de envejecimiento.

daf-2 y *daf-3* retrasa el envejecimiento.

spe-26 reduce la fertilidad.

clk-1 altera el reloj biológico.

Otros genes que afectan el envejecimiento, ejemplo, el gen *daf-16*, un regulador transcripcional, expresado en hepatocitos. La proteína de este gen da resistencia a la luz UV y aumenta la longevidad. Actúa sobre el gen *daf-2* que codifica un miembro de la familia de los receptores de insulina.

La longevidad en mamíferos depende del sistema inmune. El gen *p66* (*shc*) mutado incrementa la resistencia a estrés oxidativo y aumenta la longevidad en 30%.

b) Síndromes que aceleran el envejecimiento.

Algunos síndromes de envejecimiento acelerado en humanos como el síndrome de Werner, síndrome de Down, síndrome de Hutchinson-Gilford. El síndrome de Werner es de tipo recesivo autosómico, ubicado en el cromosoma 8 que codifica helicasa, una enzima que desestabiliza la doble hélice antes que se inicie la duplicación del ADN. Algunos de los síntomas observados en estas personas son intolerancia a la glucosa, osteoporosis, pérdida del pelo, menopausia precoz, tumores sarcomatosos, cataratas, atrofia de la laringe, aterosclerosis, atrofia de la piel.

c) Neuroendocrina.

La teoría neuroendocrina propone que los decrementos funcionales en las neuronas y las hormonas asociadas son parte central del envejecimiento. Una importante versión de esta teoría sostiene que el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal es el regulador maestro del envejecimiento de un organismo. Esto es debido a que el sistema neuroendocrino regula el desarrollo temprano, el crecimiento, la pubertad, el control de los sistemas reproductores, el metabolismo y otros aspectos de la fisiología normal, los cambios funcionales de este sistema ejercen efectos en todo el organismo.

d) Inmunológica.

La teoría inmunológica del envejecimiento se basa en dos puntos:

- La capacidad funcional del sistema inmune declina con la edad, lo que es evidente en la disminución de la respuesta de los linfocitos T a mitógenos y menor resistencia a enfermedades infecciosas.
- La autoinmunidad aumenta con la edad con el aumento de autoanticuerpos en el plasma sanguíneo. Hay un aumento de la proporción de las células T de memoria.

e) Senescencia celular.

Algunas de las características mostradas por las células senescentes son las siguientes:

- menor respuesta a mitógenos.
- respuesta distinta en células jóvenes en cultivo a factores de crecimiento.
- telómeros más cortos e inestabilidad cromosómica.

Se debe señalar que la función de los telómeros en la célula es muy importante. Los telómeros son estructuras de nucleoproteínas localizadas en los extremos de los cromosomas que son necesarios para mantener la estabilidad del cromosoma. En la mayor parte de los organismos el ADN telomérico consta de secuencias repetitivas ricas en G que termina en un corto trecho de secuencias de ADN repetitivas ricas en guanina formando un asa. En los mamíferos el asa puede invadir una región más proximal de los telómeros para formar una región D-loop conocido como T-loop.

Las proteínas funcionalmente importantes asociadas a los telómeros son incorporadas a los telómeros a través de interacciones ADN-proteína y proteína-proteína. Tanto el ADN como las proteínas componentes del telómero son esenciales para mantener la estabilidad del cromosoma.

En cada ronda de división celular se produce acortamiento de los cromosomas debido al problema de replicación de los extremos del cromosoma. El telómero actúa como reloj biológico que detiene la división celular y causa el envejecimiento.

Hasta ahora se han identificado dos mecanismos compensatorios que contrarrestan la pérdida del telómero:

1) Adición de nucleótidos a la hebra rica en G de los telómeros por la acción de una transcriptasa inversa denominada telomerasa.

La telomerasa es una ribonucleoproteína que consta de una unidad catalítica proteica denominada TERT y un molde de ARN. En algunas células cancerosas y las células reproductivas tienen telomerasa activa que evita el acortamiento del telómero y es uno de los factores que las células cancerosas aumenten en número sin control.

En las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, el complejo que conforma la telomerasa está constituido por dos subunidades Est1p y Est3p, ambas necesarias para la extensión del telómero. Est1p tiene la función de reclutamiento del complejo de la telomerasa en los extremos de los telómeros interactuando con la proteína Cdc13p, que tiene función activante.

2) Por recombinación.

En aquellas células con deficiencia de telomerasa, la pérdida de la telomerasa es acompañada por acortamiento progresivo del telómero y senescencia (envejecimiento). Las pocas células que sobreviven es porque son capaces de activar un mecanismo basado en la recombinación que les permite alargar el telómero.

La proteína p53 se une con mayor frecuencia al ADN en células envejecidas que en células más jóvenes. Las proteínas p16 y p21 están sobreexpresadas en células envejecidas, ambas proteínas impiden la progresión del ciclo celular, manteniendo la célula en la etapa G₁ de la interfase, los ciclos celulares se detienen. La interrupción del aumento de concentración de p21, evita el envejecimiento de fibroblastos en cultivo.

f) Muerte celular.

Mutaciones que afectan la estabilidad del genoma: Proteína p53 es esencial para el punto de control que detiene el ciclo celular en la etapa G₁ de la interfase, en células que tienen dañado el ADN. Si hubiera replicación celular se perpetuaría la mutación.

La proteína p53 es un factor de transcripción que induce la expresión del gen p21, una proteína que es un inhibidor del complejo cdkc- G₁. 50% de casos de cáncer humanos se deben a daño en la proteína p53. Esta proteína es un tetrámero. Existe otra proteína expresada en tumores, la proteína MDM2 (en inglés, murino doble diminuto), que inhibe la capacidad de la p53 de controlar la proliferación de tumores. La proteína MDM2 se fija al extremo N-terminal de p53, por lo tanto se impide la transcripción del gen p21.

Existe en pacientes que sufren el síndrome de Li-Fraumeni que son heterocigotos para el gen *p53*, los fibroblastos en cultivo pierden el alelo normal para el gen *p53*, resultando homocigotos para el defecto, por lo tanto no expresa el gen *p21* y envejecen de igual forma que los pacientes normales, por lo tanto, el envejecimiento no depende de p53. Sin embargo, el producto del oncogen *ras* induce la senescencia que es acompañada por acumulación de las proteínas de los genes *p53* y *p16*.

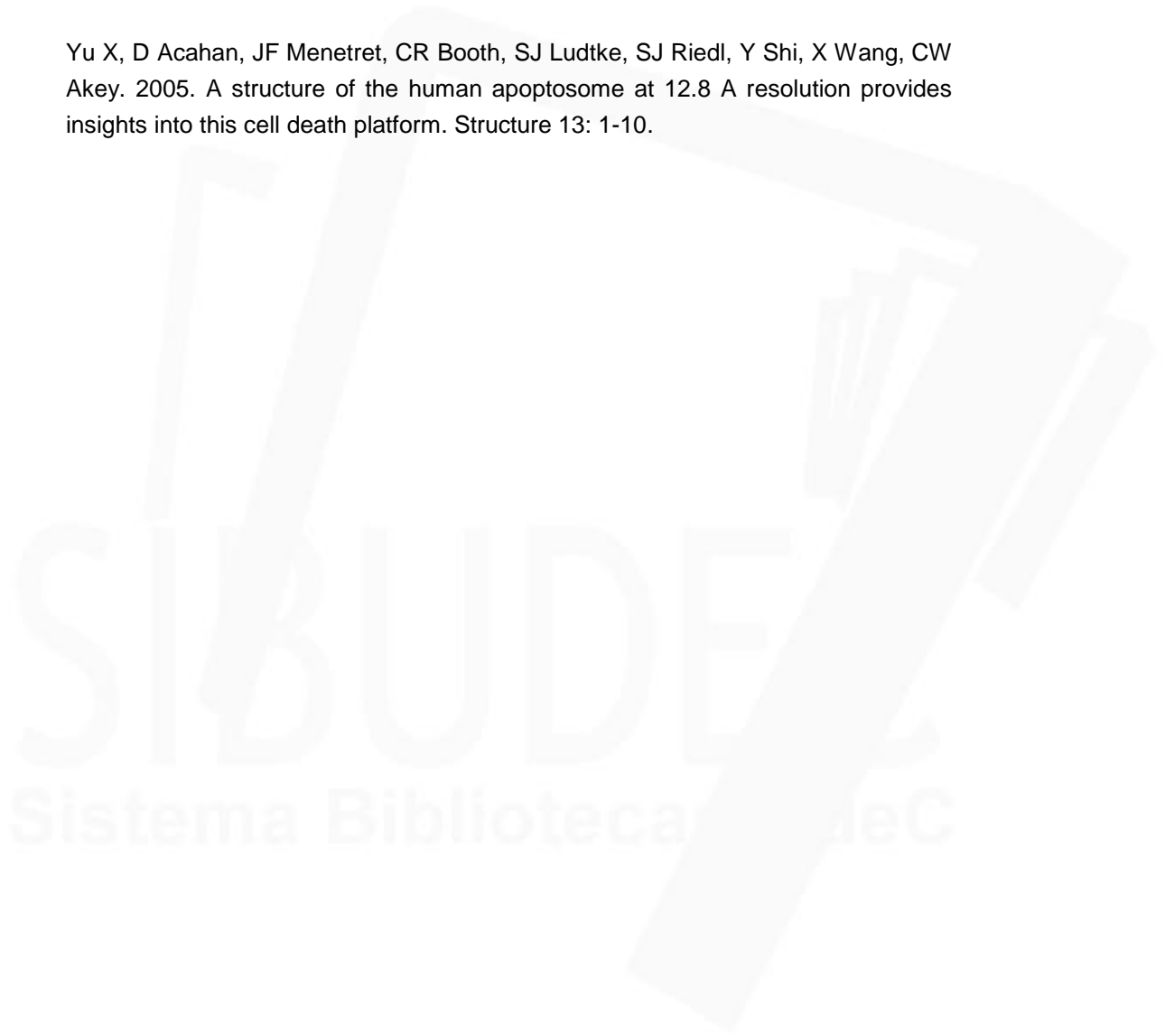
* Agradecimientos: Agradecemos al autor y a la editorial la facilitación de la figura 1 para la publicación en este capítulo.

Sistema Biblioteca de C

Referencias.

Troen BR. 2003. The biology of aging. The Mount Sinai Journal of Medicine 70 (1): 3- 22.

Yu X, D Achan, JF Menetret, CR Booth, SJ Ludtke, SJ Riedl, Y Shi, X Wang, CW Akey. 2005. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. Structure 13: 1-10.



CAPITULO V

MATERIAL CROMOSÓMICO Y FORMAS DE ESTUDIO

Fidelina González. Depto Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción. Concepción. Chile.

Como se ha visto en un capítulo anterior en el núcleo reside la información genética diploide proveniente de los padres (de la madre y el padre) y en la mitocondria la información genética haploide heredada maternalmente. Esta información es expresada en diferentes etapas de la vida del organismo y de esta información depende que un ser humano sea completamente sano.

Hay varios niveles en los cuales se puede detectar alteraciones en la organización de la información genética. Estas alteraciones pueden ser a nivel de número o forma de los cromosomas metafásicos u ordenación de los genes en los cromosomas. También podemos tener defectos en la secuencia de nucleótidos en un gen lo que da por resultado un producto alterado, que puede ser una proteína que ha perdido total o parcialmente su función.

En la actualidad hay varias formas de detectar estas variaciones en el genoma. A nivel de cromosomas, se puede confeccionar cariotipos. A nivel de genes existen marcadores asociados a los genes de interés.

Confección de cariotipos.

Cariotipo: ordenamiento de los cromosomas de una placa metafásica fotografiada luego de ser teñidos con Giemsa u orceína acética. Ambas tinciones tiñen uniforme a los cromosomas.

Este ordenamiento se hace emparejando los cromosomas homólogos de acuerdo al tamaño y posición del centrómero. Se denomina al brazo por sobre el centrómero, brazo corto y se le asigna la letra p (del francés *p*êtit) y brazo largo por debajo del centrómero, asignándose la letra q. Es un ordenamiento decreciente de acuerdo al tamaño. A cada par de cromosomas que ha sido puesto en orden de acuerdo a los criterios señalados se les asigna un número con el cual se identifica. Se emparejan los autosomas y luego los cromosomas del par sexual.

Un ordenamiento más preciso de los cromosomas implica el uso de técnicas de bandeado cromosómico, los cromosomas homólogos muestran el mismo patrón de bandeado. Se definen las bandas como regiones del cromosoma que se tiñen más intensamente que otras. Estas sirven de referencia para ubicar los genes en los cromosomas, lo que ha sido empleado en el Proyecto Genoma Humano.

Patrones de bandeado cromosómico.

Bandas G. Son aquellas bandas que se visualizan al ser tratados con calor o con enzimas proteolíticas para digerir parcialmente las proteínas cromosómicas y posteriormente teñir con el colorante Giemsa. Las bandas G están conformadas por secuencias ricas en desoxiAdenosina y desoxiTimidina. El cariotipo humano tiene alrededor de 300 bandas G, es decir en los cromosomas metafásicos existe este número de bandas G. Cabe señalar que en los cromosomas profásicos se han identificado alrededor de 2000. Ayudan a diferenciar constricciones primarias (centrómero) o secundarias (regiones organizadoras del nucleólo, NOR).

Bandas Q. Son regiones que se tiñen con quinacrina, colorante que se une preferentemente a regiones ricas en AT, son visualizadas con microscopía de fluorescencia.

Bandas R. Corresponden a bandas reversas, y dan el bandeado inverso a bandas G o Q. se obtienen a través del tratamiento de los cromosomas con álcali a 80-90°C y posterior tinción con Giemsa o fluorescencia.

Bandas C. Permite reconocer la ubicación de la heterocromatina centromérica, la región organizadora del nucleólo y la porción distal del cromosoma Y. La técnica implica un tratamiento con hidróxido de sodio y posterior tinción con Giemsa.

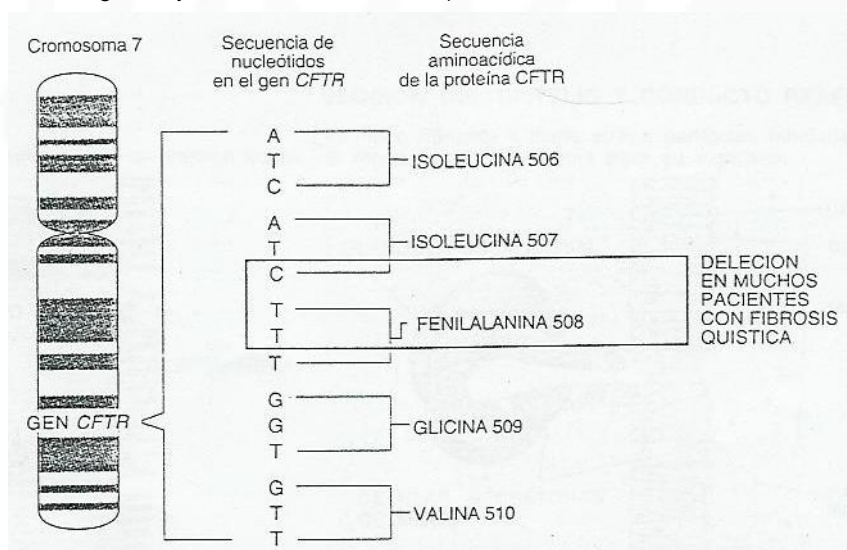
Polimorfismo cromosómico humano.

Un cariotipo humano se caracteriza por presentar 23 pares de cromosomas, de los cuales 22 pares corresponden a autosomas y un par sexual. Por ser diploide, la especie humana tiene dos cromosomas en un par de

homólogos, siendo en número haploide de 23 y el diploide de 46 cromosomas. El cariotipo de un hombre normal tiene 22 pares de autosomas y un par sexual conformado por un cromosoma X, que hereda de la madre y un cromosoma Y que hereda del padre. Una mujer normal por su parte tiene también 22 pares de autosomas y dos cromosomas X en el par sexual, uno heredado del padre y el otro de la madre. En las diferentes líneas celulares somáticas de la mujer en el transcurso del desarrollo se inactiva al azar uno de los cromosomas X, dando origen a un cuerpo que es posible ser visualizado al microscopio óptico al ser teñido adecuadamente y que corresponde al cromosoma X inactivado que se encuentra profusamente condensado al que se le denomina cuerpo o corpúsculo de Barr. Las células somáticas del varón no presentan este corpúsculo.

Alteraciones en el número de cromosomas en el cariotipo se denominan aberraciones cromosómicas y corresponden a mutaciones. Ejemplo de esto podemos mencionar a alteraciones en autosomas como el síndrome de Down. En este caso se presentan 3 cromosomas 21 en lugar de 2, dando origen a una trisomía 21.

Figura 1. Cromosoma 7 de un cariotipo humano mostrando el bandeo del cromosoma 7 y la ubicación del gen que codifica para la fibrosis quística. A la derecha se muestra la delección que es la mutación responsable de un tipo de fibrosis quística. Esta delección de 3 desoxinucleótidos produce una lectura en la proteína carente de la fenilalanina en la posición 508 del canal de cloruros. (Tomado de Welsh J & Smith AE. 1996. Fibrosis quística. Investigación y Ciencia, Febrero: 16-24).



Aberraciones que implican a los cromosomas sexuales como ejemplo mencionaremos a continuación: síndrome de Turner que afecta a mujeres que tienen un solo cromosoma X, siendo su fórmula cromosómica de 22 autosomas + X0 y el síndrome de Klinefelter que afecta a hombres que tienen cromosomas X supernumerarios, su fórmula cromosómica puede ser 22 autosomas + XXY; 22 autosomas +XXX Y; 22 autosomas + XXXXY. En estos casos las células somáticas de estos hombres tienen uno o más corpúsculos de Barr, dependiendo del número de cromosomas X presentes en las células, en el caso del síndrome de Turner, no hay corpúsculo de Barr.

Ubicación de un gen en un cromosoma.

La ubicación de un gen en un cromosoma se denota con la siguiente nomenclatura. Ejemplo el gen de la fibrosis quística se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 7, entre las bandas o subregiones 2 y 3 de la región 31 del cromosoma 7, entonces se denota como 7q31.2-q31.3

De manera experimental se puede localizar una región específica de un cromosoma mediante la técnica de hibridación ADN-ADN que consiste en realizar una hibridación *in situ* sobre una placa metafásica obtenida desde un cultivo de linfocitos con una sonda de ADN marcado ya sea con marca fluorescente. Esta técnica tiene el acrónimo FISH (hibridación fluorescente *in situ*).

Secuenciación del ADN.

El Proyecto Genoma Humano iniciado a mediados de los años 90 tuvo como objetivo conocer la secuencia de los genes humanos, con el fin de conocer de forma exacta el origen a nivel de información genética los defectos que promueven la aparición de enfermedades.

Con el uso de la reacción de la ADN polimerasa de origen procarionte en cadena (PCR) y la construcción de secuenciadores automáticos se ha dado gran impulso a este conocimiento. La secuenciación tiene como objetivo conocer el ordenamiento de la secuencia de nucleótidos de un gen, y por lo tanto proporciona información sobre la organización de los genes y los sucesos mutacionales que

alteran los genes y sus productos génicos. La secuencia alterada de un gen puede producir una proteína defectuosa porque su estructura está alterada, y por lo tanto no puede cumplir con la función que normalmente desarrolla en el organismo. Además, estos estudios han llevado a la dilucidación de la secuencia de regiones reguladoras no codificantes necesarias para conservar la homeostasis de la célula.

Análisis de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa ha permitido además disponer de cantidades mayores de un fragmento específico de ADN. Esta técnica tiene tres pasos de un ciclo fundamentales en un tubo de reacción:

1. Apertura de la doble hebra de ADN molde por acción de calor.
2. Hibridación con cebadores o partidores, por descenso de la temperatura. Los partidores son secuencias de 15 a 25 desoxinucleótidos que complementan con las secuencias expuestas de ADN molde.
3. Extensión de la cadena complementaria del partidor por ADN polimerasa.

La técnica de PCR es ampliamente utilizado en laboratorios de investigación y tiene muchas aplicaciones en genética humana, terapia del cáncer, diagnóstico prenatal, identificación de agentes infecciosos como bacilo de la tuberculosis, virus del SIDA. La limitación es que es fácil contaminar las muestras de pacientes con ADN proveniente de personal del laboratorio u hospital por lo que se requiere de adecuados controles.

Una técnica válida para el estudio de la variabilidad genética es RFLP que significa polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. Esta técnica consiste en cortar la secuencia de ADN con enzimas de restricción. Estas enzimas provienen de procariontes y cortan en forma específica la secuencia de ADN ya que reconocen secuencias de 4 a 6 pares de bases de forma específica. Esto produce fragmentos de ADN de distinta longitud que pueden ser resueltos en un gel de agarosa o poliacrilamida. La ubicación de estos marcadores asociados a cromosomas humanos ha ayudado a la localización de genes en los cromosomas.

En la actualidad el análisis de RFLP hace posible obtener mapas de ligamiento de alta resolución de cada uno de los cromosomas humanos, y se dispone de mapas de marcadores RFLP de los 23 pares de cromosomas humanos. Cabe señalar que se entiende por genes ligados como aquellos que se encuentran en la misma cromátida. **Mapas de ligamiento** son aquellos mapas que ubican los genes en los cromosomas sobre la base del resultado de cruzamientos dirigidos en forma experimental. Esto no se puede hacer en la especie humana.

Cartografía de un gen en un cromosoma.

La forma de identificar en qué cromosoma específico se encuentra un gen ha sido posible con el advenimiento de las técnicas moleculares. Genes como aquellos que producen la fibromatosis tipo I (NF1) se logró cartografiar mediante mapas de exclusión que indicaban en que cromosoma o en que región cromosómica no estaba ubicado el gen sobre la base de la herencia de NF1 y usando marcadores de RFLP.

Tabla 1. Características de los cromosomas humanos. La longitud relativa del cromosoma es de la longitud del cromosoma en relación al total haploide del genoma. El índice centromérico es la relación del brazo corto (p) en relación a la longitud total del cromosoma. De acuerdo a esas características es posible agrupar los cromosomas en 7 grupos denominados con las letras A, B, C, D, E, F, G.

Número del Par cromosómico	Longitud relativa	Índice centromérico	Forma	Grupo
1	9,08	48,0	Metacéntrico	A
2	8,45	38,1	Metacéntrico	A
3	7,06	45,9	Metacéntrico	A
4	6,55	27,6	Submetacéntrico	B
5	6,13	27,4	Submetacéntrico	B
6	5,84	37,7	Submetacéntrico	C
7	5,28	37,3	Submetacéntrico	C
X	5,8	36,9	Submetacéntrico	C
8	4,96	35,9	Submetacéntrico	C
9	4,83	33,3	Submetacéntrico	C
10	4,68	31,2	Submetacéntrico	C
11	4,63	35,6	Submetacéntrico	C
12	4,46	30,9	Submetacéntrico	C
13	3,64	14,8	Acrocéntrico	D
14	3,55	15,5	Acrocéntrico	D
15	3,36	14,9	Acrocéntrico	D
16	3,23	40,6	Submetacéntrico	E
17	3,15	31,4	Submetacéntrico	E
18	2,76	26,1	Submetacéntrico	E
19	2,52	42,9	Metacéntrico	F
20	2,33	44,6	Metacéntrico	F
21	1,83	25,7	Acrocéntrico	G
22	1,68	25,0	Acrocéntrico	G
Y	1,96	16,3	Acrocéntrico	G

Resumen del Cariotipo Humano.

Grupo	Par de Cromosomas	Características
A	1 2 3	Cromosomas metacéntricos de gran tamaño
B	4 5	Cromosomas submetacéntricos de tamaño mediano
C	6 7 8 9 10 11 12 X	Cromosomas submetacéntricos de tamaño mediano
D	13 14 15	Cromosomas acrocéntricos. Los cromosomas 13 y 14 tienen satélites en el brazo corto
E	16 17 18	Cromosomas de pequeño tamaño metacéntricos o submetacéntricos
F	19 20	Cromosomas pequeños metacéntricos
G	21 22 Y	Cromosomas acrocéntricos de tamaño pequeño

Referencias.

Welsh J & Smith AE. 1996. Fibrosis quística. Investigación y Ciencia, Febrero: 16-24.





CAPITULO VI

HERENCIA Y GENOMA HUMANO. ENFERMEDADES GENÉTICAS Y CONSEJO GENÉTICO. ÁRBOL GENEALÓGICO O PEDIGRÍ

Fidelina González. Depto Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción. Concepción. Chile.

Consejo Genético.

El Consejo Genético es proceso de comunicación que trata de problemas humanos asociados con la ocurrencia y riesgo de ocurrencia de un desorden genético en una familia (Mahowald et al. 1998). El consejo genético es un proceso de consentimiento mutuo. Los consejeros genéticos conforman un equipo de profesionales de la salud que tiene la facultad de dar a un individuo o familia la información actualizada y el apoyo (consejo o guía) considerando los problemas de crecimiento, desarrollo y salud que podría tener una base genética. Esto puede ayudar a las familias y a los individuos a entender y adaptarse a la diagnosis de un desorden genético.

Los consejos genéticos están conformados por una o más personas que conocen el fundamento médico, tienen el diagnóstico, conocen la evolución de la enfermedad y el posible tratamiento. Conocen como contribuye la herencia a la recurrencia de una anormalidad entre parientes. Pueden discriminar entre alternativas al riesgo de ocurrencia. Al visualizar el riesgo eligen acciones apropiadas desde la perspectiva familiar, religiosa y ética. Realizan un programa de adaptación del individuo afectado a la vida familiar o como evitar el riesgo de ocurrencia de la anomalía.

Una diagnosis de un desorden genético se puede hacer o confirmar en un embarazo, después del nacimiento, en la infancia o más tarde en la vida. La diagnosis podría ser realizada sobre la base de las características clínicas, test bioquímicos o test genéticos. Esta diagnosis podría significar que otros miembros de las familias estén en riesgo. Por otro lado, un miembro de una familia podría reasegurar encontrar que ella o el no tiene o probablemente es improbable que desarrolle, el desorden en particular. La susceptibilidad o predisposición a una enfermedad puede requerir el análisis de genes múltiples y de factores ambientales.

La orientación supone la conformación del grupo consejero, el uso de folletos para información, acceso a medios informativos y el respeto de los principios éticos sobre la base de autonomía, privacidad, confidencialidad y equidad.

Análisis de un rasgo genético.

El análisis de un rasgo genético puede implicar a uno o todos los siguientes pasos.

I. Mecanismo de transmisión y expresión de los genes.

1. Transmisión y posición del gen.

- Tipo de herencia nuclear o citoplasmática.
- Se trata de herencia autosómica o ligado a cromosomas sexuales.
- Posición del gen o genes en el cromosoma (ligamiento, factorial, citogenética).

2. Expresión del gen.

a) Tipos de interacción alélica.

- Dominancia.
- Recesividad.
- Herencia intermedia.
- Codominancia.

b) Interacción no alélica del gen.

- Interacción factorial.
- Epístasis.

c) Efectos del ambiente externo e interno sobre el carácter estudiado.

- Variación.
- fenocopias (modificación fenotípica no hereditaria).

II. Sobre la fisiología del gen.

1. Acción genética.

2. Genética del desarrollo.

III. Sobre la dinámica del gen.

1. Distribución poblacional.
2. Mutaciones.
3. Valor adaptativo.
4. Flujo genético.

Las Leyes o Principios de la Herencia postulados por Mendel redescubiertos en el inicio del siglo XX ha constituido el inicio de los estudios de la herencia en todos los campos de la biología. El progreso científico se divide en cuatro fases:

- a) Establecer las bases de la herencia: Los genes se ubican en los cromosomas.
- b) Definición de la base molecular de la herencia: la doble hélice.
- c) La base de la información genética de la herencia con el descubrimiento de los mecanismos biológicos por los cuales las células leen la información contenida en los genes.
- d) La invención de las tecnologías de ADN recombinante de clonación y secuenciación de la información genética por lo cual se puede comprobar la función de los genes.

Algunas características del Genoma Humano de acuerdo al Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano (2001) son:

- a) Alrededor de 30.000 genes que codifican proteínas componen el genoma humano.
- b) Los genes humanos muestran los mismos mecanismos de maduración en los procesos transcripcionales que los de otros organismos eucariontes.
- c) El conjunto de proteínas (proteoma) codificadas por el genoma humano es más complejo al compararlo con organismos invertebrados, ya que en los vertebrados hay dominios arquitectónicos de las proteínas son más ricos que en invertebrados.
- d) Cientos de genes han resultado de transferencia horizontal de genes desde bacterias y docenas de genes parecen haber derivado de elementos transposables. Estos elementos transposables han sido más numerosos pero han derivado en elementos inactivos.
- e) Las regiones teloméricas y centroméricas han derivado de duplicación reciente.

- f) La tasa de mutación del genoma nuclear es dos veces más alta en los hombres que en las mujeres.
- g) El análisis citogenético de los clones secuenciado confirma la sugerencia que grandes regiones pobres en CG están correlacionadas con las bandas G de los cariotipos.
- h) Las tasas de recombinación tienden a ser más altas en las regiones distales de los cromosomas (alrededor de 20 megabases) y en los brazos de los cromosomas más cortos en general, en un patrón que promueve la ocurrencia de al menos un retrocruzamiento por brazo cromosómico en cada meiosis.

El Proyecto Genoma Humano ha contribuido a la identificación de los genes que contribuyen a las enfermedades. Jiménez-Sánchez et al. 2001 propusieron una clasificación funcional de los genes que producen enfermedades y sus productos que definen algunos principios de la manifestación de las enfermedades consideradas. Han agrupado genes que causan enfermedades y demostraron correlación entre la función del producto de un gen determinado y algunos de los rasgos de la enfermedad como la edad de aparición de la enfermedad y la forma de herencia.

Los resultados de esta clasificación funcional de genes comprenden genes que codifican enzimas, es de alrededor del 31 % del total, aquellos que modulan las funciones de proteínas son de alrededor de un 13 % que incluyen la estabilización, la activación, el plegamiento de las proteínas. Otras doce categorías contabilizan menos del 10% de la muestra.

Las funciones de productos proteicos de genes que producen enfermedades son las siguientes:

- Enzimas.
- Moduladores de proteínas.
- Receptores.
- Factores de transcripción.
- Proteínas de la matriz intercelular y extracelular.
- Transportadores transmembrana.
- Canales.
- Señales celulares.

- Hormonas.
- Transportadores transcelulares.
- Inmunoglobulinas.

La forma de herencia de las enfermedades relacionadas a:

- codificación de enzimas.
- modificadores de la función proteica.
- receptores defectuosos.
- genes que codifican factores de transcripción.

Corresponden a un casi 80% en el caso de 278 enfermedades relacionadas a genes que codifican enzimas como autosómicas recesivas. De 124 enfermedades de genes que modifican la función de la proteína son alrededor del 45% autosómicas dominantes o recesivas. De forma parecida es la distribución de los genes que codifican las 82 enfermedades analizadas y debidas a malfuncionamiento de receptores. Por otro lado, de las 83 enfermedades debidas a genes que codifican factores de transcripción cerca del 70 % son autosómicas dominantes, y un poco más del 20% son autosómicas recesivas. Enfermedades ligadas al cromosoma X en la mayor parte de los casos es de alrededor o menos del 10%.

Edad de aparición de las enfermedades relacionadas a genes.

Enfermedades relacionadas a:

- codificación de enzimas
- modificadores de la función proteica
- receptores defectuosos
- genes que codifican factores de transcripción

La edad de aparición de las enfermedades se inicia en la etapa uterina en el caso de las enfermedades debidas a factores de transcripción, para las enzimas defectuosas es al año de vida, para los receptores es entre un año y la pubertad y para los modificadores de proteínas es en la adultez. Los desordenes en los receptores es en la infancia debido al rápido crecimiento y durante la pubertad por el intenso flujo de señales en células y tejidos del organismo. Los desordenes que

implican a modificadores de proteínas pueden aparecer más tarde ya que implican que no perturban completamente la homeostasis del sistema en una edad temprana agravándose paulatinamente en el tiempo.

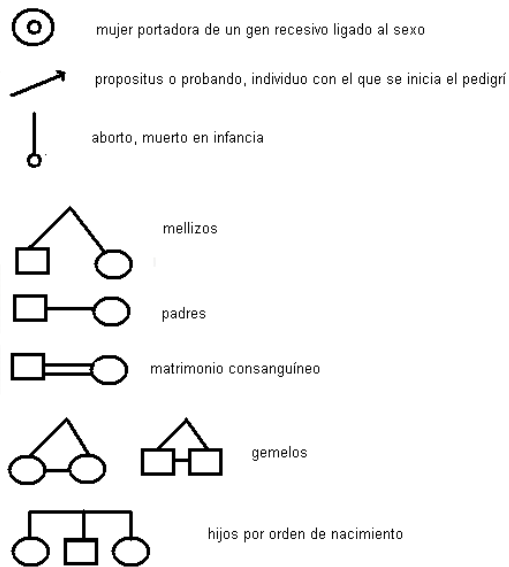
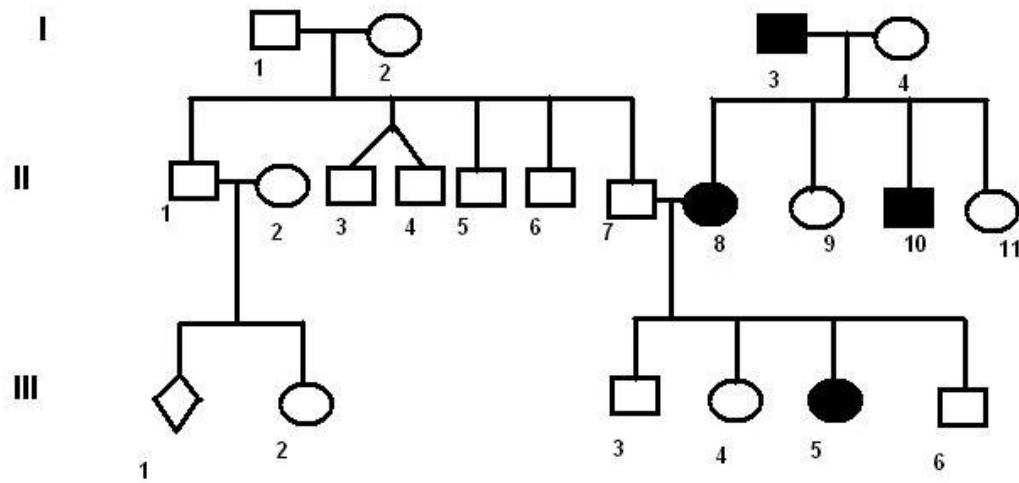
Construcción de pedigrís.

A fin de establecer la base genética de un rasgo familiar, su transmisión de acuerdo a los principios mendelianos debe ser demostrado. Sin embargo, obtener patrones de herencia es muy difícil debido a los prolongados tiempos generacionales a nivel de vida humana, pequeños grupos familiares y la imposibilidad que los científicos puedan realizar experimentos de cruzamiento. Una metodología ampliamente utilizada es la confección de pedigrí de familias, sobre la base de la información multigeneracional. Generalmente se obtiene la forma de herencia de un rasgo ligado al sexo versus autonómica, autonómica versus dominante.

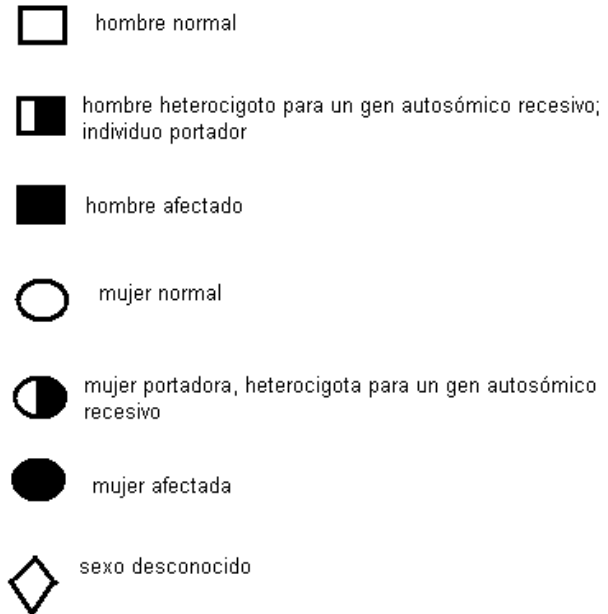
En el análisis de la transmisión genética humana se comienza por la identificación de un individuo afectado, denominado **propósitus**, seguido por la construcción histórica genética o **pedigrí** de los individuos de la familia.

En una representación gráfica los hombres se representan con cuadrados en tanto que las mujeres con círculos. Las áreas blancas representan a los individuos no afectados en tanto las ennegrecidas a los afectados. Las áreas mitad ennegrecidas son los individuos heterocigotos en general y representan los individuos sanos portadores de un gen recesivo que al estado homocigoto es afectado, es decir su fenotipo corresponde a la manifestación de su genotipo afectado en el estado homocigoto. También los heterocigotos (diferentes alelos en un locus) u homocigotos (el mismo alelo en un locus) de un rasgo dominante que dé fenotipos afectados se representan con áreas ennegrecidas. Las generaciones de un pedigrí son numeradas con números romanos. Los diferentes individuos que componen una generación se numeran de derecha a izquierda con numeración arábica, como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Representación gráfica de un árbol genealógico, indicando la simbología usada.



Números romanos I, II, III.... indican generaciones
Números arábigos 1, 2, 3 indican distintos individuos dentro de una generación



Los miembros de una pareja se unen con una línea horizontal y las generaciones con líneas verticales. El propósitus o probando que es el individuo con el que se inicia el pedigrí, se indica con una flecha.

En el análisis de un rasgo genético a nivel humano usando la construcción de pedigrís para determinar la transmisión y expresión de genes, se pueden plantear dos problemas:

- a) Transmisión y posición del gen: en este caso hay que distinguir entre herencia nuclear y herencia citoplásmica, lo otro es si se encuentra asociado a autosomas o a cromosomas ligados al sexo y finalmente la posición o lugar que ocupa un gen en un cromosoma, definido como **locus** (plural **loci**).
- b) Expresión del gen: en este caso hay que discriminar entre las interacciones alélicas: dominancia, recesividad, co-dominancia, herencia intermedia; las interacciones no alélicas como epístasis, interacción factorial; y finalmente los efectos del ambiente externo e interno sobre el carácter estudiado que afecta la variación de la expresión del carácter, las fenocopias.

Tipos de herencia que es posible distinguir.

Autosómico dominante: un gen autosómico con expresión regular tiene un modelo que es fácil identificar. El carácter se manifiesta en todas las generaciones y los hijos de una pareja formada por un individuo afectado y uno normal (que casi siempre es heterocigoto, si la enfermedad no es muy frecuente) da una proporción de 1:1 entre hijos normales y afectados. Ambos sexos están afectados en la misma proporción.

Autosómico recesivo: se establece una herencia de un carácter determinado por un gen recesivo cuando hay consanguinidad de los padres de los individuos afectados. La mayor parte de los individuos afectados tienen padres normales. De padres heterocigotos la proporción entre hijos normales y afectados es 3:1. Todos los hijos de padres afectados son afectados. Los hijos de un heterocigoto normal con una pareja normal no son afectados.

Recesivo ligado al sexo: afecta principalmente a varones que provienen de padres normales. La madre es normal pero es portadora del gen ligado al

cromosoma X que produce el defecto. En la familia hay hermanos, primos o tíos afectados.

Ligado al cromosoma Y: presente exclusivamente en varones, todos los hijos varones de un hombre afectado estarán afectados (herencia holándrica).

Dominante ligado al sexo: los varones afectados con esposas normales transmiten el defecto sólo a las hijas.

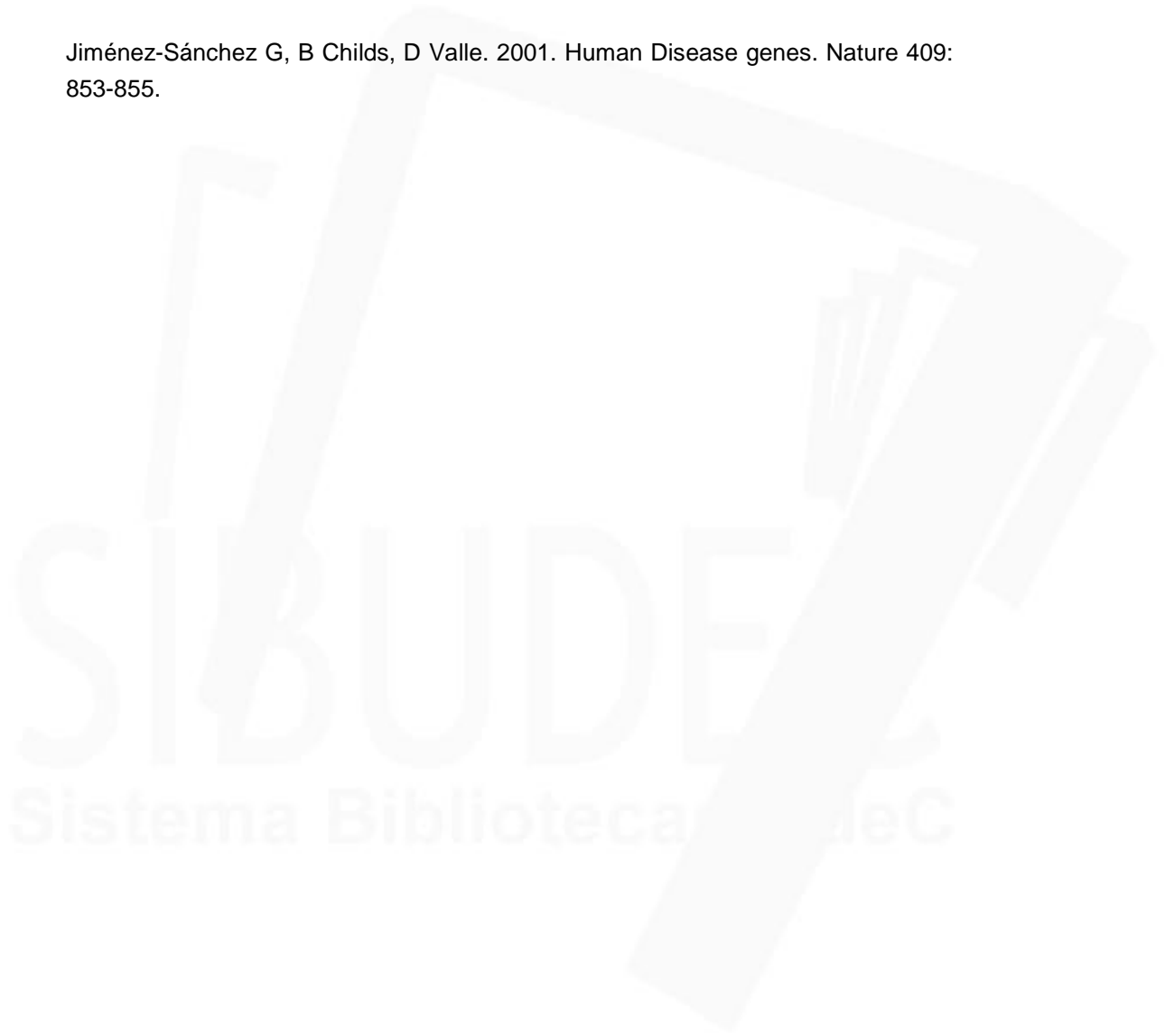
Herencia mitocondrial: en este caso las mutaciones que producen enfermedades están relacionadas con el genoma haploide mitocondrial que se hereda maternalmente. Ejemplo de esto se ha visto en países asiáticos donde el uso indiscriminado de antibióticos ha causado mutaciones en el genoma mitocondrial de una abuela cuyos nietos y bisnietos hijos de sus hijas y nietas son sordos. Cabe señalar que el genoma mitocondrial codifica para genes que determinan audición.

Al determinar un tipo de herencia determinado en la especie humana con mayor precisión se debe recurrir a estudios históricos. Las complicaciones que puedan surgir se deben a penetración incompleta del carácter, fenocopias (fenotipo inducido ambientalmente, en este caso no hereditario que es muy parecido al fenotipo producido por un gen conocido), factores raciales, edad.

Referencias.

International Human Genoma Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921.

Jiménez-Sánchez G, B Childs, D Valle. 2001. Human Disease genes. Nature 409: 853-855.



ANEXO: CUESTIONARIOS

ANEXO 1: CUESTIONARIOS DE CLASES

CUESTIONARIO 1

1. ¿Qué es una célula? ¿Qué distingue a las células procarióticas de las células eucarióticas?
2. ¿Cómo se hace el estudio de la célula?
3. Haga un paralelo entre célula procariótica y eucariótica desde el punto de vista de la estructura.
4. ¿Cómo relaciona Ud el concepto estructura- función a nivel celular? Dé ejemplos.
5. Mencione las principales macromoléculas que componen la célula.
6. Mencione los principales procesos metabólicos que cumple la célula.
7. Mencione los principales procesos fisiológicos que cumple una célula.
8. Mencione los principales roles biológicos que cumple una célula.
9. ¿Cuáles son las moléculas que dan las características físicas a una membrana celular?
10. Ilustre la forma en que una proteína transmembrana está ubicada, refiérase específicamente a canales iónicos y fuerzas hidrofóbicas.
11. ¿Qué es la difusión simple, difusión facilitada y transporte activo? Dé ejemplos.
12. ¿Cuáles son las funciones de la membrana plasmática?

Cuestionario 2

1. ¿Qué rol juega el estado físico de la bicapa lipídica en las propiedades biológicas de la membrana?
2. Discuta el efecto de: a) longitud de cadena del ácido graso, b) grado de insaturación de los ácidos grasos y c) colesterol, en la bicapa lipídica.
3. ¿A qué se refiere el movimiento de flip-flop (difusión transversal) de los fosfolípidos de membrana y *cuál es su función en las células?*
4. Comente papel que cumple el colesterol en las membranas de células animales.
5. Señale el tipo de proteínas presente en las membranas biológicas. Mencione las diversas funciones que desempeñan las proteínas de membrana.
6. Indique y comente las características principales del modelo de mosaico fluido de la membrana biológica.
7. ¿Qué tipo de interacciones mantienen la estructura de las membranas? ¿Se requieren uniones covalentes?
8. ¿Qué se entiende por permeabilidad selectiva de una membrana biológica?
9. ¿Qué es un canal iónico dependiente de voltaje? ¿Qué tipo de transporte realiza? *¿Cómo selecciona los iones que lo atraviesan?* Dé dos ejemplos de este tipo de canal.
10. ¿Qué es un canal iónico ligado dependiente? ¿Cómo funciona? Señale un ejemplo de esta clase de canal.
11. Hay enfermedades producto de canales iónicos defectuosos de tejidos excitable y epitelial. Al respecto señale qué tipo de canal está afectado en: a) fibrosis cística o fibrosis quística, b) parálisis periódica hipercalémica, c) síndrome del QT prolongado.
12. ¿Cómo ocurre el paso de sustancias liposolubles a través de la membrana plasmática? ¿Cuál es la fuerza impulsora para este tipo de transporte?
13. Mencione las características del proceso de difusión facilitada. Dé un ejemplo de este tipo de proceso.
14. ¿Qué tiene de particular el transportador de glucosa denominado GluT 4? ¿Cómo opera? ¿Qué podría suceder eventualmente si el GluT4 es defectuoso o completamente ausente?
15. Indique las características de un proceso de transporte activo primario. Dé un ejemplo.
16. ¿Cuál es el rol de la fosforilación en el mecanismo de acción de ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (“bomba de sodio”)?

17. ¿Cómo afecta la ouabaína la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$? Señale qué aplicación tienen los digitálicos como la ouabaína.
18. ¿Qué son las acuaporinas y dónde se encuentran? ¿Qué sucedería si la AQP-2 faltara o fuera defectuosa?
19. ¿De dónde proviene la energía para los procesos de transporte activo secundario: cotransporte y de intercambio?
20. ¿Cómo se efectúa la absorción de azúcares en el epitelio intestinal? Comente el proceso de absorción de fructosa.
21. Muchos tipos diferentes de células poseen receptores que unen hormonas esteroidales. ¿En qué sitio de la célula piensa Ud. que podrían residir esos receptores? ¿Y el receptor de insulina? ¿Por qué?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Cuestionario 3

1. ¿Qué funciones desempeña el retículo endoplásmico?
2. ¿Cuáles son los organelos que participan de la síntesis de los componentes de las membranas?
3. ¿Cuáles son las funciones del retículo endoplásmico liso?
4. ¿Cómo ocurre la síntesis de lípidos en el REL?
5. ¿Cómo se realiza la detoxificación en el REL?
6. ¿Cuál es la participación del REL en la síntesis de hormonas esteroideas?
7. ¿Cómo ocurre el transporte de Calcio en el REL y qué diferencias hay entre el REL de la fibra muscular y otras células?
8. ¿Qué tipos de Transportadores funcionan en el REL en relación con el calcio?
9. ¿Dónde ocurre la formación de las lipoproteínas?
10. ¿Qué importancia tiene la desfosforilación de la glucosa en los hepatocitos del hígado y en qué organelo ocurre?
11. ¿Qué son los polirribosomas, donde se pueden encontrar, y cuál es su función?
12. ¿Cuáles son las estructuras de una proteína? Explique.
13. ¿Hacia qué lugares son direccionadas las proteínas que son sintetizadas en el citosol, cuál es el mecanismo de direccionamiento de proteínas?
14. ¿Mencione los pasos de la síntesis de una proteína multipaso?
15. ¿Qué es el PRS y cuál es su función?
16. ¿Cuáles son los aminoácidos hidrofóbicos y qué características tiene una secuencia proteica que es rica en este tipo de aminoácidos?
17. ¿Cuáles son los pasos que llevan a la síntesis de proteína, una vez que está unido el ribosoma al mensajero?
18. ¿Qué es un traslocón y qué función desempeña?
19. ¿Qué función tiene la riboforina?
20. ¿Qué significa que el código genético sea redundante?
21. ¿Qué es un anticodón?

Cuestionario 4

1. ¿Qué es la glicosilación de proteínas, en qué organelos ocurre y cómo se realiza?
2. ¿Cuáles son las funciones del Golgi y por qué se le puede relacionar con el servicio postal?
3. ¿Por qué algunas proteínas se fosforilan en el Golgi?
4. ¿Cómo explica el procesamiento de la insulina, explique? ¿Por qué se le denomina procesamiento post- traduccional?
5. Mencione las enzimas que participan en las modificaciones a los azúcares en el Golgi y en el RE.
6. ¿Cuáles son los componentes del Golgi?
7. ¿Cómo se originan los lisosomas?
8. ¿Cuáles son las vías de las proteínas que pasan desde RE a Golgi? Explique cuales son las diferencias de cada uno de los destinos.
9. ¿Qué es KDEL, en que proceso participa y para qué sirve?
10. ¿Cuál es la diferencia de los destinos de una proteína que sigue la vía citosólica?
11. ¿Si una proteína que va al núcleo es superior a 20 kDa, cómo entra al núcleo? ¿y si una proteína tiene un peso menor a 20 kDa?
12. ¿Qué es la clatrina y cuál es la diferencia con un coatómero? ¿En qué proceso participa? ¿Cuál es su función?
13. ¿Cuáles son las funciones del RE liso?
14. ¿En qué proceso es posible recuperar los receptores en el Golgi?
15. ¿Qué es la transcitosis, endocitosis y exocitosis?
16. ¿Cuántos péptidos señales o secuencias señales tiene una proteína integral de la membrana plasmática que forma parte de un canal multipaso? ¿Cuáles son y con qué elementos interactúan?
17. ¿Dónde ocurre la sulfatación de proteínas en la porción de los oligosacáridos? ¿Para qué sirve la sulfatación?
18. ¿Qué son las adaptinas y en qué proceso participan?

Cuestionario 5

1. ¿Qué determina que una proteína sintetizada en el RER sea soluble (sea liberada a la cavidad del RER) o sea insertada en la membrana?
2. ¿Qué se entiende por preproinsulina, proinsulina e insulina? ¿a qué proceso celular se atribuye esta secuencia de eventos y dónde ocurre?
3. ¿Dónde ocurre la glicosilación inicial de las glicoproteínas y en qué consiste este proceso?
4. ¿Qué son las vesículas transportadoras y cuál es su función?
5. ¿Cómo ocurre la secreción regulada de proteínas, y la secreción constitutiva? Haga un paralelo.
6. ¿Qué son los endosomas y cuál es su función?
7. ¿Qué es la traslocación cotraduccional de proteínas y dónde se produce?
8. ¿Cómo las proteínas que son sintetizadas en el RER, modificadas y diferenciadas dentro del Golgi son dirigidas a los lisosomas?
9. ¿Cómo ocurre el proceso de fusión de membranas entre una vesícula y el organelo de destino?
10. ¿Porqué las enzimas contenidas en los lisosomas no destruyen las membranas de los lisosomas?
11. Indique y comente las 4 vías por las cuales llega material a los lisosomas para su degradación.
12. ¿Qué son los peroxisomas y qué funciones cumple en la célula?
13. ¿Qué rol cumple la dinamina y la adaptina?
14. ¿Cuál es la función del péptido señal KDEL y del péptido señal KFERQ en las proteínas que los llevan?
15. ¿Qué rol tiene el REL en el proceso de autofagia?
16. ¿Qué es la Transcitosis? Dé un ejemplo.
17. ¿Cuál es la importancia de la glicosilación en la célula?
18. ¿Dónde ocurre la síntesis de lípidos en la célula?
19. Haga una lista con los aminoácidos hidrofóbicos.
20. Haga una lista con los aminoácidos hidrofílicos. Cuáles son los aminoácidos básicos y cuáles los ácidos. Cuales son los aminoácidos que participan en la formación de puentes o enlaces disulfuro.
21. ¿Qué es la traslocación cotraduccional?
22. Nombre cuáles son las proteínas transmembrana que participan en la traslocación cotraduccional que ocurre en el retículo endoplásmico rugoso y que rol cumple cada una de ellas.

23. ¿Qué rol cumplen los oligosacáridos en la glicosilación primaria que ocurre en el retículo endoplásmico?
24. ¿Cómo ocurre la glicosilación primaria en el retículo endoplásmico?



Cuestionario 5 (continuación)

1. ¿A qué estructuras corresponden las uniones intercelulares?
2. ¿Qué función tienen las uniones intercelulares?
3. ¿Cuántos grupos de uniones intercelulares pueden distinguirse y cuáles son?
4. ¿Cómo está formada una unión oclusiva y qué proteínas la componen?
5. ¿Cuántos tipos de uniones anclantes pueden distinguirse y qué función cumplen?
6. ¿Cuáles son las proteínas que forman las uniones anclantes?
7. ¿Qué función cumplen las uniones comunicantes o nexos?
8. ¿Cuántos tipos de proteínas cumplen la función de adhesión celular y dónde?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Cuestionario 6

1. ¿A qué tipo de especialización de la membrana plasmática corresponde la unión oclusiva y qué rol desempeña en la célula? ¿En qué tejido está presente?
2. ¿En qué estructuras celulares es posible encontrar actina, una proteína citosólica que forma parte de diversas estructuras?
3. ¿Dónde se encuentran presentes las cadherinas y las cateninas y qué función cumplen?
4. ¿Cómo funcionan los nexos y cómo están conformados?
5. ¿Qué es la enfermedad de Glanzmann y el “pénfigo vulgar”?
6. Describa cómo está conformada una unión oclusiva.
7. ¿Qué función desempeñan las proteínas conocidas como chaperonas?
8. ¿Qué son las integrinas y qué función cumplen?
9. ¿Qué función desempeñan las proteínas en la formación de peroxisomas? ¿Qué características presentan estas proteínas?
10. ¿Cuántas vías tiene una proteína codificada en el núcleo y sintetizada en los polirribosomas libres de llegar al espacio intermembrana de la mitocondria?
11. ¿En qué se diferencia la composición lipídica de la membrana interna de la mitocondria de la membrana externa y de otras membranas presentes en la célula?
12. ¿Dónde están situadas las porinas, qué son y qué función cumplen?
13. ¿Qué función se desarrolla en cada uno de los compartimentos de la mitocondria: a) membrana externa, b) membrana interna, c) espacio intermembrana, d) matriz mitocondrial? ¿En cuáles de estos compartimentos es posible encontrar proteínas integrales y en cuáles proteínas solubles?
14. ¿Con qué función es posible asociar las proteínas TIM y las proteínas TOM? ¿Desde el punto de vista de secuencia de la proteína será posible encontrar dominios de la proteína que sean fuertemente hidrofóbicos? ¿Por qué?
15. ¿A qué se le denomina enfermedades lisosómicas de almacenamiento o acumulación? ¿Cuál es la causa? ¿Qué efectos tiene sobre la célula?
16. ¿Cuáles son los destinos que tienen las proteínas en la vía citosólica? ¿Qué mecanismos permiten que las proteínas no se “equivoken” y lleguen al destino para cumplir sus funciones?
17. ¿Qué funciones desempeñan las proteínas que se quedan en el citosol y no se incorporan a algún organelo?
18. ¿Qué proteínas componen la lámina nuclear?

19. ¿Qué es la estructura de poro?
20. ¿Qué dimensiones deben tener las sustancias que atraviesan la envoltura nuclear y por donde lo hacen y las sustancias que atraviesan la membrana externa de la mitocondria?
21. ¿Qué es el citoesqueleto? ¿Qué funciones celulares desempeña? ¿Cuáles son sus componentes?
22. ¿Qué es el nucleólo y qué función desempeña? ¿Cómo está conformado?
23. ¿Qué es la cromatina, eucromatina y heterocromatina?
24. ¿Qué son las histonas y cuál es su rol en la formación de la cromatina?
25. ¿Qué se entiende por transporte activo secundario y qué diferencias hay con el transporte activo primario?
26. ¿Qué son los transportadores GLUT y cuantos tipos existen?
27. ¿Cómo se forman los glicolípidos o glicoesfingolípidos y dónde ocurre el proceso? ¿Cuántos tipos de estas moléculas existen, dónde se encuentran y en que se diferencian?
28. ¿Qué función cumple el dolicol en la síntesis de glicoproteínas? ¿dónde se encuentra?
29. ¿Qué son los cuerpos residuales?
30. ¿Qué componentes macromoleculares es posible encontrar en la matriz de la mitocondria?
31. ¿Qué rol cumple el ADN mitocondrial?
32. ¿Qué funciones anexas se realizan en la mitocondria, además de la respiración celular?
33. Mencione al menos seis proteínas integrales de membrana que cumplan una función preponderante en las mitocondrias, peroxisomas, nucleo, lisosomas, golgi, retículo endoplásmico.
34. Mencione organelos donde es posible encontrar proteínas traslocadoras.
35. ¿Qué se entiende por traslocación del ribosoma? Explique.

Cuestionario 7

1. ¿Cuáles son las características genéticas de las enfermedades atribuidas a defectos en los genes?
2. ¿Qué importancia tiene la información para los sistemas biológicos?
3. ¿Cómo se define genoma?
4. ¿Qué son las ciclinas y cómo regulan el ciclo celular?
5. ¿Cuáles son los tipos de proliferación celular y cuál es la importancia de estos?
6. ¿Cómo actúa la proteína p53 en el ciclo celular?
7. ¿Qué eventos promueve el factor promotor de la síntesis de ADN?
8. ¿Qué eventos regulan los factores promotores de la mitosis?
9. ¿Cuál es el producto de un ciclo celular?
10. ¿Cómo se define G_1 ?
11. ¿Qué es un nucleosoma?
12. ¿Qué es la cromatina y qué diferencia hay con un cromosoma metafásico?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Cuestionario 7 (continuación)

1. Nombre las etapas de la profase I y describa cómo ocurre cada una de ellas.
2. ¿A qué corresponde el complejo sinaptonémico? ¿Cómo está formado? ¿Qué función cumple?
3. ¿Qué importancia biológica tiene la meiosis desde el punto de vista de la variabilidad genética? ¿En qué etapas se genera esta variabilidad?
4. ¿Dónde ocurre la reducción del número diploide en la meiosis ($2n$ a n)?
5. ¿Qué estructura del cromosoma une a los cromosomas a la lámina periférica de la envoltura nuclear en el leptonema?
6. ¿Qué es un cariotipo?
7. ¿Qué es la heterocromatina? ¿Cuántos tipos de heterocromatina existen?
8. ¿Cuál es la estructura de un cromosoma metafásico? ¿Cuántos tipos de cromosoma existen de acuerdo a la posición del centrómero?
9. ¿Qué son los nódulos de recombinación? ¿Qué función cumplen?
10. ¿Qué es el corpúsculo de Barr?
11. ¿Cuántos compartimientos nucleares existen? ¿Cómo se define un compartimiento en el núcleo y en la célula?
12. ¿Qué es el nucleólo? ¿Qué función cumple? ¿Cuál es su estructura? ¿A qué cromosomas se encuentra asociado?
13. ¿Qué son los cuerpos de Cajal?
14. ¿Qué son los territorios cromosómicos y cómo se distribuye la cromatina en los territorios?
15. ¿Qué es el complejo del factor de splicing?
16. ¿Cómo está formado el poro nuclear y cuál es su función?
17. ¿Qué son las importinas y las exportinas? ¿Qué función cumplen?
18. ¿Cómo está conformada la lámina nuclear? ¿Cuál es la función de la lámina?
19. ¿Cómo define la matriz nuclear y cómo está conformada?

Cuestionario 8

1. Describa la vía apoptósica en un tejido nervioso.
2. Indique en forma precisa cuales son las formas de regulación de la proteína p53 a nivel celular.
3. ¿Qué es un oncogén?
4. ¿Qué es un gen supresor de tumores?
5. ¿En qué consiste la metástasis?
6. ¿Cuál es el mecanismo general a nivel molecular que se regula la apoptosis y qué genes participan en *Caenorhabditis elegans* y en vertebrados?
7. Indique las posibles funciones normales que en una célula puede cumplir un protooncogén.
8. ¿Qué es APC y qué regula y cómo regula?
9. ¿Qué importancia tiene la poliubiquitinación de una ciclina cuando está formando parte de un complejo regulador del ciclo celular?
10. En la fibrosis quística las mutaciones que se producen a nivel de ADN corresponden en la mayoría de los casos a la falta de un nucleótido en la secuencia del ADN, ¿Cómo explica que este pequeño cambio lleve a una catástrofe en el funcionamiento de las células donde se expresa el gen?.

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Cuestionario 9

1. ¿Qué aspectos se consideran importantes en la teoría del envejecimiento?
2. ¿Cuál es el aspecto genético del envejecimiento?, refiérase a genes y su acción.
3. ¿Qué es el síndrome de Werner?
4. ¿Qué es un locus?
5. ¿Qué es un alelo?
6. ¿Qué es una serie alélica?
7. ¿Qué es dominancia, codominancia y recesividad? Refiérase a sistema AB0
8. ¿Qué es ligamiento y cómo se relaciona con la distancia entre los genes en un cromosoma?
9. ¿Qué es haplotipo? Ejemplifique con el sistema Rh de acuerdo a Fisher y Race.
10. ¿Cómo influye el sistema H en la expresión del sistema AB0?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Questionario 10

1. ¿Cuáles son los principios mendelianos y en qué casos se aplican a la herencia humana?
2. ¿Qué se entiende por segregación independiente de los caracteres?
3. ¿Qué diferencia existe entre 2 caracteres codificados por dos loci que se encuentran en el mismo cromosoma y caracteres codificados en dos loci ubicados en cromosomas distintos?
4. ¿En qué consiste la herencia ligada al sexo? Explique.
5. ¿Cómo se define mutación y cuántos tipos de mutación se reconocen de acuerdo a las distintas clasificaciones que existen?
6. ¿Qué son las traslocaciones cromosómicas?
7. ¿Qué son las aneuploidías?
8. ¿Qué son las poliploidías?
9. ¿A qué se debe el síndrome de Down?
10. ¿Qué es un corpúsculo de Barr?

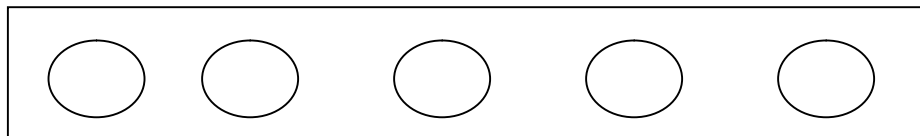
SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C

Questionario 11

1. Indique el significado del primer y segundo principio mendeliano de la herencia.
2. ¿Cuál es la consecuencia principal del ligamiento en términos de proporción gamética en la generación F_1 ? Haga un paralelo con lo que sucede en un dihibridismo.
3. ¿Cómo explica la herencia de la hemofilia en el que gran parte de los varones de una familia son hemofílicos?
4. ¿Cómo explica que en una mutación de punto, donde hay ausencia de un par de nucleótidos en la secuencia de ADN que codifica el gen se produzca un defecto tan importante como es la falla de un canal de cloruro en la fibrosis quística?
5. ¿Cómo explica la diversidad de combinaciones que forman los haplotipos del sistema HLA?
6. ¿Cómo explica la incompatibilidad entre hermanos en términos de trasplantes?
7. ¿Cómo explica la diversidad de anticuerpos que es capaz de producir el sistema inmunológico de un individuo en respuesta al medio externo?
8. ¿Qué se entiende por individualidad genética?
9. ¿Qué es aglutinación?

Questionario 12

1. ¿Qué es el Sistema HLA? ¿Qué significa etimológicamente? ¿Cuál es su función en el organismo?
2. ¿Cómo se hereda el sistema HLA? ¿En qué cromosoma se encuentra?
3. ¿Cuántos genes participan en la formación de los anticuerpos? ¿En qué cromosomas se encuentran?
4. ¿Qué son las inmunoglobulinas?
5. ¿Cómo están formadas las inmunoglobulinas?
6. ¿Cuántos tipos de cadenas polipeptídicas forman las inmunoglobulinas?
7. Explique brevemente cómo se genera el gran número de anticuerpos en el organismo.
8. ¿Qué se entiende por recombinación somática y qué diferencia tiene con la meiótica?
9. ¿Qué es un pedigrí? ¿cómo se representan o visualizan las distintas formas de herencia en un pedigrí?
10. ¿Qué es consejo genético? ¿Cómo puede integrarse un enfermero o enfermera a los equipos de trabajo de consejeros genéticos?
11. Una familia cuyo padre tiene grupo A, Rh positivo y la madre tiene grupo 0 y Rh negativo tienen tres hijos con grupo 0 y Rh negativo. Explique. Construya el pedigrí. Asigne los genotipos correspondientes a cada miembro de la familia. Defina genotipo. ¿A qué tipo de herencia corresponde?
12. Usando un tablero de Punnett resuelva la siguiente situación de compatibilidad en una familia, usando los loci A y B. Asigne alelos arbitrarios. Recuerde que los alelos son numerosos y prácticamente no hay situaciones de homocigosidad. Defina además en este contexto qué entiende por haplotipo. ¿A qué tipo de herencia corresponde?.
13. Haga los esquemas de aglutinación para los siguientes genotipos en el sistema Rh. A qué tipo de herencia corresponde.
 - a) CcDDEe
 - b) CC Dd ee
 - c) CcDd EE
 - d) ccddEe



14. Dibuje y rotule una molécula de Inmunoglobulina, indicando los posibles pasos que la originaron desde el punto de vista genético y molecular.
15. Explique cómo funcionan los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos en la producción de anticuerpos. Relacione con lo que ocurre en el SIDA y el resfrío común. Relacione con la producción celular de anticuerpos y receptores de membrana ¿cómo funciona? Intente una hipótesis. ¿Por qué los linfocitos detienen su ciclo celular y en qué etapa?
16. Relacione la información relacionada con las mutaciones, el cáncer, factores de crecimiento, transducción de señales intracelulares, proliferación celular, apoptosis, cariotipo. Dé ejemplos.
17. Relacione regulación del ciclo celular con apoptosis, envejecimiento y cromosomas. Refiérase a las teorías de envejecimiento.
18. Relacione consejo genético, proyecto genoma humano, construcción de pedigrís y hemofilia.
19. Haga un paralelo entre profase meiótica de espermatogénesis y ovogénesis y mitótica a nivel molecular y celular. Describa cómo los factores de proliferación controlan la mitosis y relacionelo con cáncer. Refiérase también al rol que cumplen las células foliculares y de Sertoli, compárelas.

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

ANEXO 2: CUESTIONARIOS DE LABORATORIOS

CUESTIONARIO LABORATORIO 1

1. ¿Qué pasa con el tamaño del campo visual a medida que pasamos desde el aumento menor al mayor?
2. ¿Con qué componentes del microscopio se realiza el examen topográfico?
3. ¿Cuáles son los dispositivos del microscopio que permiten variar la intensidad de luz que incide en la muestra?
4. ¿Cuál es el límite de resolución del ojo humano? ¿y del microscopio óptico?
5. ¿En qué consiste el sistema parafocal?
6. Enumere los componentes del sistema estático.
7. ¿Cuáles son los pasos necesarios a seguir para ubicar una preparación en el microscopio y enfocar con objetivo mayor?
8. ¿Cuáles son las propiedades del microscopio óptico compuesto?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C

Cuestionario Laboratorio 2

1. ¿Qué es un frotis? ¿en qué casos se utiliza? Dé ejemplos.
2. ¿Qué tipos de células se pueden distinguir en la sangre? Enumere y dé las características de cada uno.
3. ¿Qué es la osmosis? ¿Qué es la presión osmótica? ¿De qué depende?
4. ¿Qué es la plasmólisis? ¿Qué es la crenación? Explique cómo se realizaron los experimentos en el laboratorio.
5. ¿Por qué el cloruro de sodio no puede atravesar la membrana plasmática, y de qué manera es posible que entren los iones a la célula?
6. ¿Por qué en el experimento de las levaduras algunas estaban teñidas y otras no? ¿Cuál es el rol de la membrana plasmática?
7. ¿Cómo explica que la síntesis de proteínas sea vital para que nuestras neuronas permanezcan funcionales a lo largo de nuestra vida? Argumente desde el punto de vista de la estructura celular.
8. ¿Qué técnica se usa para teñir el lobulillo de hígado de cerdo? ¿Qué elementos celulares puede distinguir?
9. Las células renales que conforman el epitelio de túbulo renal tienen la función de absorber contra gradiente ¿Cómo se apoya esta observación desde el punto de vista de la estructura celular?
10. Enumere las funciones de las siguientes estructuras y organelos celulares:
 - a) Membrana plasmática.
 - b) Núcleo.
 - c) Mitocondria.
 - d) Complejo de Golgi.
 - e) Peroxisomas o microcuerpos.
 - f) Lisosomas.
 - g) Retículo endoplásmico liso.
 - h) Retículo endoplásmico rugoso.
 - i) Ribosomas.

ANEXO 3: CUESTIONARIOS DE LAS PELÍCULAS

CUESTIONARIO PELÍCULAS 1

1. ¿Qué función desempeñan las proteínas en la célula?
2. ¿Cuáles son los tipos de proteínas mencionadas en la película y cuál es su función?
3. ¿Cuáles son los pasos generales que llevan a la síntesis de proteínas?
¿Cuáles son las principales enzimas que participan en este proceso?
4. ¿Cuáles son las diferencias entre ARN y ADN? ¿Cuántos tipos de ARN existen?
5. ¿Cuándo una proteína adquiere su forma tridimensional?
6. ¿Cómo se puede explicar que un organismo procarionte tenga proteínas similares en estructura y función a las de un eucarionte?
7. ¿Qué se entiende por porcentaje de similitud en una proteína?
8. ¿Qué problema de salud tiene Christopher Nance? ¿Cómo se relaciona con la estructura de la hemoglobina que tiene en sus glóbulos rojos? ¿De qué forma se relaciona con la hemoglobina normal?
9. ¿Cómo se relaciona el estudio de las proteínas con el estudio del cáncer?
10. ¿Qué significa expresión diferencial del desarrollo?
11. ¿Qué rol cumple la proteína NM 26?
12. ¿Qué es un operón y en que clase de organismos está presente?
13. ¿Qué diferencia hay entre las proteínas de la piel y las proteínas de las uñas?

Questionario Películas 2

1. De acuerdo a la película ¿cuál es la definición de vida?
2. ¿Cómo están organizados los seres vivos?
3. ¿Qué es el metabolismo?
4. ¿Cuáles son las características de la vida?
5. En qué consiste el segundo principio de termodinámica y cómo se relaciona con la vida.
6. ¿Qué tipos de células son mencionadas en la película y cuáles son sus características?
7. ¿Por qué existen tantos tipos de células en un organismo?
8. ¿Cómo se define tejido, órgano y sistema de órganos?
9. ¿Cuál es la razón que exista la reproducción sexual en la naturaleza?
10. ¿Qué es el método científico?
11. ¿Cuáles son los pasos del método científico?
12. ¿Qué es una hipótesis?
13. ¿Cómo se define teoría?
14. ¿Cómo se comprueba (aprueba o rechaza) una hipótesis?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C

Questionario Películas 3

1. ¿Qué es la materia? ¿Cuáles son los componentes más pequeños de la materia?
2. ¿Qué son los isótopos?
3. ¿Cómo afecta el ozono a la salud humana?
4. ¿Cómo se forma un enlace iónico?
5. ¿Qué tipo de átomos forman las proteínas?
6. ¿Por qué la molécula de agua tiene cargas parciales?
7. ¿Cómo se forman los enlaces o puente hidrógeno?
8. ¿Qué es la cristalografía? ¿Para qué sirve?
9. ¿Cuáles son las moléculas de la vida?
10. ¿Qué son las grasas?
11. ¿Qué son las proteínas?
12. ¿A qué se debe el plegamiento específico de las proteínas?
13. ¿Qué tipo de fuerzas favorecen el plegamiento de una proteína?
14. ¿Qué rol cumplen las cinasas o quinasas en la célula?
15. ¿Qué enfermedades se encuentran asociadas a quinasas o cinasas defectuosas?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Questionario Películas 4

1. ¿Cuáles son las razones de hacer cortes histológicos?
2. ¿Cómo se toma una muestra? ¿Qué cuidados hay que tener?
3. ¿Cuáles son las etapas de la técnica de corte histológico?
4. ¿En qué consiste la etapa de fijación y cuales son los principales fijadores?
5. ¿Cuál es el objetivo de la etapa de fijación?
6. ¿En qué consiste la etapa de deshidratación y sustitución? ¿Cuál es el objetivo de esta etapa?
7. ¿En qué consiste la etapa de inclusión? ¿Cuál es el objetivo? ¿En qué material se incluye?
8. ¿En qué consiste la etapa de corte? ¿Cuál es el objetivo? ¿En qué instrumento se realiza?
9. ¿En qué consiste la etapa de tinción? ¿Cómo se realiza? ¿Cuáles son las tinciones usadas?
10. ¿En qué consiste la etapa de montaje? ¿Qué materiales son necesarios para hacer este paso?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C

Cuestionario Película 5

1. ¿Cuál es la unidad de la vida?
2. ¿Cómo se ilustra la relación estructura función en la audición?
3. ¿Qué organelos se mencionan en la película y cuál es su función?
4. ¿Cuál es la función del retículo endoplásmico rugoso?
5. ¿Cuál es la función del Golgi?
6. ¿Cuál es la composición del núcleo y cuál es su función?
7. ¿Cómo la función de una célula determina la abundancia de cierto organelos?
Dé ejemplos.
8. ¿Cuál es el rol de la membrana plasmática? ¿Cuáles son sus características?
9. ¿Cuáles son las proteínas integrales responsables del intercambio iónico?
10. ¿Qué es el transporte pasivo y el transporte activo?
11. ¿Qué es la endocitosis?
12. ¿Qué es la exocitosis?
13. ¿De dónde se originan las vesículas que se fusionan con la membrana plasmática?
14. ¿Cuáles son las diferencias entre célula procarióticas y eucarióticas?
15. Desde el punto de vista químico ¿Cuáles son las funciones de los organelos de las células eucarióticas?
16. ¿Cuáles son las funciones del citoesqueleto de la célula eucariótica y cómo está conformado?

Questionario Películas 6

1. ¿Cuántos reinos existen en la naturaleza?
2. ¿Qué criterios se usan para ordenar las especies en un determinado sistema de clasificación?
3. Considerando la existencia de todas las bacterias ¿qué porcentaje relativo es dañino al hombre?
4. ¿Cuáles son los tipos de monera que existen?
5. ¿Para qué sirve la tinción Gram?
6. ¿Qué criterios sirven para diferenciar bacterias?
7. ¿Qué es la fisión binaria? ¿Cómo ocurre? ¿Cuánto tiempo dura?
8. ¿Qué son los virus? ¿Cuántos tipos de virus se mencionan en la película?
9. ¿Qué características tienen los antibióticos para combatir las bacterias?
10. ¿Cómo están conformados los virus?
11. ¿Qué necesitan los virus para reproducirse?
12. ¿Cómo infecta un virus a una célula?
13. ¿Qué problema causan los virus a la salud humana?
14. ¿Cuál es la mejor forma de evitar las enfermedades?
15. ¿Qué es la marea roja? ¿A qué tipos de organismos corresponden?
16. ¿Qué es la teoría endosimbiótica?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Questionario Películas 7

1. ¿Cómo se reproducen los virus?
2. ¿Cómo están conformados los virus?
3. ¿Qué son los retrovirus?
4. ¿Qué enfermedades son producidas por virus?
5. ¿Por qué es difícil observar y diagnosticar virus?
6. ¿Qué es una pandemia?
7. ¿Cuál fue la contribución de la Primera Guerra Mundial a la pandemia de influenza?
8. ¿Cómo se reproduce el bacteriofago T₄?
9. ¿Qué son las vacunas?
10. ¿Cómo surgieron las vacunas?
11. ¿Cuáles son las funciones del sistema inmune?
12. ¿Cómo se fabrica una vacuna?
13. ¿A qué razón se atribuye el cambio de cepas de virus que a lo largo del año producen la gripe?
14. ¿Cómo se transmite la poliomelitis?
15. ¿Qué es el rotavirus y en qué circunstancias y lugar se ha hecho más frecuente?
16. ¿Cómo se extinguió la viruela en el mundo?
17. ¿Por qué se piensa que la viruela contribuyó a la conquista de América?
18. ¿Qué es la emergencia viral? ¿En qué circunstancias ocurre?
19. ¿Cómo se rastrea un virus en la selva?
20. ¿Qué órganos ataca el virus hanta en humanos?
21. De acuerdo a la película ¿Cómo se originó y diseminó el virus del SIDA?
22. ¿Dónde surgió el virus ebola o virus del mono verde?
23. ¿Cuál es la utilidad potencial de los virus para curar enfermedades como la fibrosis quística? ¿Cómo se procedería?

Cuestionario Película 8

1. ¿Cuál es el objetivo de la película?
2. ¿Qué es un cariotipo? ¿Cómo se confecciona un cariotipo?
3. ¿Qué características tienen las diferentes especies desde el punto de vista del número de cromosomas?
4. ¿Qué función cumple la heparina?
5. ¿Qué función cumple la colchicina?
6. ¿Qué función cumple la fitohemoaglutinina?
7. ¿Por qué los linfocitos son sometidos a shock osmótico luego de ser cultivados?
8. ¿Con qué tinción se tiñen los cromosomas?
9. ¿Qué elementos es posible visualizar al microscopio luego de hacer la técnica del goteo sobre el portaobjeto y teñirlos?
10. ¿Qué es el síndrome de Turner, a qué se debe? ¿Cuáles son las características que presenta la persona afectada?
11. ¿Qué es el síndrome de Klinefelter, a qué se debe? ¿Cuáles son las características que presenta la persona afectada?
12. ¿Qué es el síndrome de Down, a qué se debe? ¿Cuáles son las características que presenta la persona afectada?
13. ¿Qué es el síndrome de maullido de gato (cri du chat), a qué se debe? ¿Cuáles son las características que presenta la persona afectada?
14. ¿Cuál es la causa del tumor gástrico desde el punto de vista cromosómico?
15. ¿Cuál es la causa de la leucemia mieloide crónica desde el punto de vista cromosómico?
16. ¿Cuál es el efecto de las sustancias mutagénicas sobre la forma de los cromosomas?
17. ¿Qué efectos tienen los virus sobre el genoma?
18. ¿Por qué se decanta la muestra de sangre antes de hacer los cultivos de linfocitos?

Questionario Películas 9

1. ¿Cuál fue el aporte de Mitchel al estudio del ADN?
2. ¿Cuál fue la contribución de Hershey y Chase al estudio del ADN?
3. ¿Cuáles son las bases nitrogenadas del ADN?
4. ¿Qué es un nucleótido y cómo está conformado?
5. ¿Cómo están conformados los pasamanos de la escalera de ADN?
6. ¿Qué es lo que identifica a una especie desde el punto de vista del ADN?
7. ¿Cómo se realiza la duplicación del ADN y en qué etapa del ciclo celular ocurre?
8. ¿Cuándo son sintetizadas las cromátidas hermanas?
9. ¿Qué es lo que pasa con el niño Andrew Gobebe? ¿Qué enfermedad tiene y por qué?
10. Desde el punto de vista genético ¿cuál es la constitución genética del padre, la madre y la hermana de Andrew?
11. ¿Qué es la terapia génica? ¿Cómo se aplicó a Andrew?
12. ¿Dónde se encontraba inserto el gen ADA? ¿Qué se trató de hacer para introducir el gen sano?
13. ¿Qué es un vector? ¿De qué naturaleza es?
14. ¿A qué corresponden las enzimas de restricción y qué función cumple?
15. ¿Qué es una ligasa y que función cumple?
16. ¿A qué corresponde el ADN recombinante?
17. ¿Cómo se evaluó el tratamiento aplicado a Andrew?
18. ¿Qué es el PCR?

Cuestionario Películas 10

1. ¿Cuál es la función de la división celular?
2. ¿Qué son los cromosomas? ¿Qué es la cromatina?
3. ¿Qué son las cromátidas?
4. ¿Qué son los centrómeros? ¿Qué función cumplen?
5. ¿Por qué razón la molécula de ADN siendo tan larga, puede estar contenida en el núcleo de una célula?
6. ¿Qué es el cariotipo y para qué sirve?
7. ¿Cuál es el número haploide de la especie humana?
8. ¿Qué son los cromosomas homólogos?
9. Desde el punto de vista del número de cromosomas ¿cómo se diferencian las distintas especies?
10. ¿Cuáles son las etapas de la mitosis?
11. ¿Cómo se mantiene el número de cromosomas de una célula a través del ciclo celular, y a través de las generaciones?
12. ¿Qué características tiene la interfase?
13. ¿Qué características tiene la mitosis?
14. ¿Cuáles son los eventos que ocurren en la profase de una célula?
15. ¿Qué permite que los cromosomas se muevan en la anafase?
16. ¿Qué función cumple la mitosis en distintos organismos?

Cuestionario Películas 11

1. ¿Cuál es el enfoque de Mendel al iniciar sus estudios sobre herencia en las arvejas?
2. ¿Qué evento vital es intervenido para producir los caracteres deseados en la frutilla?
3. ¿Qué significa dominancia y recesividad en términos de expresión genética?
4. ¿A qué corresponden los factores de Mendel? ¿Dónde se encuentran físicamente?
5. ¿Qué es un alelo?
6. ¿Qué es la homocigosis y la heterocigosis?
7. ¿Qué pasa cuando se cruzan dos homocigotos o cuando los parentales son heterocigotos?
8. ¿Qué es un octoploide, y qué es un diploide?
9. ¿A qué corresponde una cruce monohíbrida?
10. ¿Cómo se explica que de padres a hijos se traspase la información genética?
11. ¿Qué es el cuadrado y para qué sirve?
12. Haga un Tablero de Punnet con T= alto y t= enano de un cruzamiento entre padres heterocigotos ¿Qué proporción de fenotipos altos hay en la generación F1 o descendencia directa?
13. ¿Qué es un cruce dihíbrido? ¿Cuál fue el enunciado de la ley o principio mendeliano que surgió de los estudios de Mendel?
14. ¿Cuántos tipos de gametos distintos resultan de un cruzamiento dihíbrido entre padres heterocigotos altos y púrpura?
15. ¿Cómo se logra que las palomas sean blancas puras?
16. ¿Cómo se denomina este tipo de interacción entre genes para el color?
17. ¿Cómo se explica que las palomas jaspeadas den colores blanco puro en las palomas?
18. ¿Qué es la codominancia? ¿Qué ejemplos se dan en la película?
19. ¿Qué es la dominancia incompleta? Explique el ejemplo de las flores "dragones".
20. ¿Por qué no se ve el color rojo o negro azulado en las palomas?
21. ¿Qué es la interherencia poligénica?

Questionario Película 12

Primera Parte.

1. ¿En qué consiste el Proyecto genoma Humano?
2. ¿Cómo se define Genoma?
3. ¿Cuántos pares de cromosomas hay en el genoma Humano?
4. ¿Qué es un gen?
5. ¿Cuál fue la contribución de Watson y Crick?
6. ¿Por qué los travesaños son más importantes que los pasamanos de la escalera del ADN, desde el punto de vista genético?
7. ¿Cómo se hace la lectura contenida en la molécula de ADN?
8. ¿De dónde se obtiene la muestra para el análisis de ADN de una persona?
9. ¿Cuál es la ventaja genética de la familia Limone proveniente de Milán?
10. ¿Cómo se explica esta ventaja genética?
11. ¿Por qué esta característica está sólo presente en algunas familias y no en otras?
12. ¿Qué nombre recibe el gen responsable de esta característica y en qué cromosoma se ubica?
13. ¿Cómo transcurre la transcripción de un gen?
14. ¿Qué es el ADN mitocondrial y cuáles son sus características? ¿Cuáles son las consecuencias del proyecto Genoma Humano?

Segunda Parte.

1. ¿Qué son los chips de ADN?
2. ¿Cuál es el principal objetivo del Proyecto Genoma Humano?
3. ¿Qué es el cáncer? ¿Qué es la metastasis?
4. ¿Cuál es el problema de salud que afecta a la enfermera y cuál es la causa?
5. ¿Qué función cumple la proteína p53 en la célula?
6. ¿Qué función cumple la proteína ras?
7. En el caso de la enfermedad que padece la enfermera ¿Cuál es la causa genética específica? ¿Qué causa esto en el mal funcionamiento de la proteína p53?
8. Desde el punto de vista genético ¿Cómo se puede mejorar una célula cancerosa?

9. ¿Qué rol cumple el virus del resfrío común en el experimento de terapia génica?
10. ¿Qué causas o evento celular provoca el envejecimiento?
11. ¿Qué efectos tienen los radicales libres sobre el ADN?
12. ¿Cuál es el evento celular desencadenado por la proteína p53 cuando esta proteína detecta algún evento extraño en la célula?
13. ¿Qué son los telómeros? ¿Cuáles son sus características?
14. ¿Por qué razón no funciona la dicisión celular cuando los telómeros son demasiado cortos?
15. ¿Qué función cumple la telomerasa? ¿En qué etapa del desarrollo se encuentra activa?
16. ¿En qué cromosoma se ubica la información (locus) para la telomerasa?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

ANEXO 4: CUESTIONARIO DE SEMINARIOS 1

CUESTIONARIO- SEMINARIO DE VIRUS 1

CAP 23 VIRUS

1. ¿Cómo es la estructura de un virus?
2. ¿A qué se les denomina bacteriofago?
3. ¿Qué son los virus virulentos o líticos?
4. ¿Cuales son los virus temperados o lisogénicos?
5. ¿Cómo se realiza un cultivo de virus?
6. ¿Cuál es la secuencia de un ciclo lítico? Explique cada etapa
7. ¿Qué es un profago?
8. ¿A qué se le conoce como conversión lisogénica?
9. ¿Qué es la transducción?
10. ¿Cuál es la secuencia de una infección lisogénica?
11. ¿Qué es un viroide?
12. ¿Cómo ocurre la coexistencia con virus?
13. ¿Qué es la cápside?
14. ¿Qué es la transcriptasa inversa?
15. ¿Qué enfermedades virales hay en animales y por qué se desarrollan?
16. ¿Qué relación hay entre virus y cáncer?
17. ¿Qué son los priones?
18. ¿Qué tratamientos son posibles en las enfermedades producidas por virus?
19. ¿Cuál es el origen de los virus?
20. ¿Qué rol tiene un profesional de la salud como un (a) enfermero (a) en la prevención de este tipo de afecciones causadas por virus?

Cuestionario- Seminario de virus 2

La gripe y sus virus

1. ¿A qué familia pertenecen los virus de la gripe? ¿Cuáles son sus características?
2. ¿Cuáles son las características moleculares de estos virus?
3. ¿Qué proteínas es posible distinguir?
4. ¿Qué produce la hemaglutinina en los glóbulos rojos y por qué?
5. ¿Qué enzimas es posible encontrar en estos virus?
6. ¿Cómo es posible diferenciar los virus de las gripes A, B y C?
7. ¿Cuáles son las etapas del ciclo biológico de un virus de la gripe?
8. ¿Qué características tiene el ARN viral? ¿Cómo puede proliferar un virus si tiene ARN, y no ARN, como es el caso de los retrovirus?
9. ¿Cómo y por qué se producen las epidemias y pandemias de la gripe?
10. ¿Qué problema presenta la vacunación con virus atenuados? ¿Cómo se soluciona?
11. ¿Qué son los adyuvantes?
12. ¿En qué consisten las vacunas nuevas? ¿Qué son los liposomas?
13. ¿En qué consisten las vacunas recombinantes?
14. ¿Qué es la amantadina y la rimantadina?
15. ¿Cuál es la relación entre virus y lisosoma?
16. ¿Cuál es la importancia de este tema para un profesional enfermero o enfermera en formación?

Cuestionario- Seminario de virus 3

Desarme de los virus de la gripe

1. ¿Qué es una pandemia? Dé ejemplos.
2. ¿Qué problemas presentan las vacunas contra la gripe? ¿Cuánto se demora desarrollar una vacuna contra una nueva variante de virus?
3. ¿Qué origen tuvo la gripe de Hong Kong?
4. ¿Qué fármacos pueden ser administrados contra la gripe? ¿Cuál es su efecto sobre el organismo? ¿Cuál es la diferencia con otros fármacos o curaciones tradicionales?
5. ¿Cuál es el mecanismo de acción de estos fármacos?
6. ¿Qué problemas presenta el uso de los fármacos amantadina y rimantadina?
7. ¿Qué es la neuraminidasa? ¿Qué relación hay con los fármacos contra la gripe?
8. ¿Qué células son atacadas de preferencia por los virus de la gripe?
9. ¿Cuántos tipos gripales existen? ¿Cuáles son las características de cada tipo?
10. Explique detalladamente el ciclo biológico de un virus gripal.
11. ¿Qué es el ácido siálico? ¿Cuál es su rol?
12. ¿Qué es la deriva antigénica y el desplazamiento antigénico? Explique y ejemplifique.
13. ¿Cuál es la causa posible de la pandemia gripal de 1957 y 1968?
14. ¿Qué es un reservorio viral?
15. ¿Por qué se menciona la frase barrera de especies?
16. ¿Qué estudios se realizaron en neuraminidasa?
17. ¿Qué características del sitio activo de la neuraminidasa permiten mejorar el anclaje de una molécula de ácido siálico?
18. ¿Qué problemas presentó el GS4071?
19. ¿Cómo se administra en zanamivir?
20. ¿Qué es la M2 vírica? ¿En qué tipos de virus es posible encontrarla?
21. ¿Cuál es el impacto social de una epidemia gripal?
22. ¿Cuántos tipos de vacunación se señalan en el texto? ¿Cómo se hace la vacuna de ADN?
23. ¿Qué es la hemaglutinina?
24. ¿Qué pasa cuando un retrovirus queda atrapado en un endosoma de la célula?

Cuestionario- Seminario de virus 4

El primer retrovirus humano

1. ¿Qué es la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa?
2. ¿Qué enfermedades humanas se deben a retrovirus?
3. ¿Qué características tienen los virus HTLV, y los virus FeLV? ¿Qué enfermedades producen?
4. ¿A qué se refiere con “secuencias de ADN endógeno” y con “virus exógeno”?
5. ¿Qué es un provirus? ¿En qué cromosomas se integra? ¿Por qué se dice que las células de un tumor son clonales?
6. Explique el ciclo de vida de un retrovirus.
7. ¿De cuántas formas es posible detectar un retrovirus en la célula? ¿Cuál es la herramienta más sensible?
8. ¿En qué consiste el ensayo de la retrotranscriptasa?
9. ¿Qué avances se logró con el descubrimiento de los factores de crecimiento?
10. ¿Qué es la fitohemoaglutinina (PHA)? ¿Cuál es su acción sobre el cultivo de células T?
11. ¿Cuál es el mecanismo propuesto en la aparición de la leucemia?
12. ¿Qué relación hay entre leucemia y HTLV? ¿Qué síntomas presentan los pacientes?
13. ¿Cuál es la distribución geográfica del virus HTLV-I? ¿Qué relación hay con la leucemia adulta de las células T (ATL)?
14. ¿Cuáles son los mecanismos de inducción de la leucemia?
15. ¿Qué diferencias hay entre el virus HTLV-I y los que producen la leucemia crónica (ALV y MuLV)?
16. ¿A qué se refiere con “actuación en trans”?

Cuestionario- Seminario de virus 5

Los nuevos virus

1. ¿A qué se debe la aparición de "nuevos virus", es esto un fenómeno casual?
2. ¿Cómo se define una "enfermedad emergente"? Dé ejemplos.
3. ¿Qué virus son responsables de las fiebres hemorrágicas? ¿A qué familias pertenecen?
4. ¿Cómo se contagia una persona con estos virus? Explique cada caso señalado en el trabajo.
5. ¿Cómo influye la devastación del medio ambiente para la aparición de nuevas virus? Explique los casos señalados en el trabajo.
6. ¿Por qué se les denominó Arenaviridae?
7. ¿Qué es el hantavirus? ¿Cómo es transmitido al hombre?
8. ¿Cómo la industria biológica ha contribuido a la aparición de nuevos virus? ¿Cómo visualiza este aspecto como futuro profesional de la salud? ¿Qué cuidados debería tener en el manejo de este tipo de vacunas si Ud los tuviera que manipular?
9. ¿Explique claramente cómo se han producido las contaminaciones accidentales por virus y por qué casos fueron conocidos?
10. ¿Qué características en cuanto a conformación tienen los Bunyaviridae, Arenaviridae y Filoviridae?
11. ¿Qué características son observables en los individuos que son infectados por estos virus?
12. ¿Qué problemas hay al momento de manipular estos virus en un laboratorio?
13. ¿Con que herramienta es posible verificar un contagio con estos virus?
14. ¿Qué son los reservorios virales, explique en relación al virus hanta?
15. ¿Qué medicamentos preventivos existen en la lucha contra estos virus?
16. ¿Qué acciones es posible desarrollar para evitar nuevos problemas virales en nuestro medio?

Cuestionario- Seminario de virus 6

El virus del SIDA

1. ¿Cuál es el nombre del virus que produce el SIDA?
2. ¿Cómo se produce la infección?
3. ¿Cuál es la célula afectada?
4. ¿Qué es el sarcoma de Kaposi y qué relación tiene con el SIDA?
5. ¿Por qué concluyeron que asociado al SIDA hay una deficiencia inmunológica?
6. ¿Cuántos tipos distintos de virus que producen SIDA existen y cómo se transmiten?
7. ¿Cómo está conformado el virión del HTLV-III?
8. ¿A qué se debe la disminución de células T4?
9. ¿Qué funciones desempeña la célula T4 en la respuesta inmunitaria?
10. ¿Qué rol tiene la endocitosis en el proceso de infección del virus?
11. ¿Cuáles son genes reguladores de los retrovirus y cuales son característicos de HTLV-III, qué función tienen estos genes?
12. ¿Qué son los LTR?
13. ¿Qué efectos patogénicos tiene el virus HTLV-III?
14. ¿Qué es el AZT y para qué se usa?
15. ¿Cuál es la característica principal del virus del SIDA desde el punto de vista de la variabilidad genética?
16. ¿Qué diferencias hay entre virión, profago, cápside y virus?

Cuestionario- Seminario de virus 7

Infección por HIV: cuadro celular

1. ¿Cómo ocurre un proceso de infección vírica en el caso de HIV? ¿Qué es el CD4?
2. ¿Qué efecto tiene el virus sobre las células auxiliares T?
3. ¿Qué es el gp120?
4. ¿Qué son los antígenos monoclonales?
5. ¿Qué es la prueba de pseudotipo?
6. ¿Qué pruebas fueron más sólidas para corroborar que el CD4 era receptor vírico? ¿Por qué?
7. ¿Cómo penetra el material genético de HIV a la célula?
8. ¿Qué rol tiene la acidez en el endosoma cuando penetra el virus? Explique los pros y contras.
9. ¿Cómo participa el mecanismo de endocitosis mediada por receptor en la infección vírica?
10. ¿Cómo se forman los sincitios o sincicios?
11. ¿Cuál es el mecanismo propuesto por el autor del trabajo?
12. ¿Qué es un provirus?
13. ¿Qué significa que un virus se integre a un genoma? ¿En este caso, qué caminos puede seguir?
14. ¿cómo se visualiza la infección por el virus HIV en algún organismo?
15. ¿Qué rol juegan los monocitos en el organismo?
16. ¿Qué evidencias hay que apoye una región específica con alto grado de conservación de la proteína gp120 que participa en más de un tipo de virus? Explique.

ANEXO 5: CUESTIONARIO SEMINARIO 2

ASÍ COMIENZA LA MITOSIS

1. ¿Cuáles son las etapas del ciclo celular?
2. ¿Cuáles son los eventos que ocurren al principio de la mitosis?
3. ¿Para qué usaron la técnica de microinyección? Averigüe en qué consiste.
4. ¿Qué es el factor promotor de la mitosis?
5. ¿Cómo ocurre el empaquetamiento del ADN?
6. ¿Qué se ilustra en la Figura 1, compare ambas situaciones en el embrión normal y el mutado de la *Drosophila*?
7. ¿Qué importancia tienen las mutaciones en la determinación de los eventos de la mitosis?
8. ¿Cuáles son los agentes mutágenos mencionados en el trabajo?
9. ¿Qué efectos tiene la mutación sobre la proteína y para qué sirve al experimento?
10. ¿Cuáles fueron los resultados de los experimentos? ¿Cuáles son los genes responsables de la regulación del ciclo y en qué etapa regulan?
11. ¿Cómo se descubrieron los genes *wee* qué significa etimológicamente el término? ¿A qué se debe que las células de levadura sean más pequeñas?
12. ¿Qué pasó cuando se hizo cruzamiento de mutantes *wee* con jmutantes *cdc2*?
13. ¿Qué es una genoteca?
14. ¿Qué significa homología funcional de genes? ¿cuál es su aplicación?
15. ¿Cómo se regula la actividad del complejo *cdc2/ciclina*?
16. ¿Cómo se comprobó la veracidad del modelo?
17. ¿Cuál es la función de *cdc25*?
18. ¿Qué función tiene la lamin B o lámina B y qué ocurre con esta proteína en el inicio de la mitosis?

Cuestionario seminario 2

El telómero humano

1. ¿Qué son los telómeros?
2. ¿Cuál es la importancia del telómero?
3. ¿Para qué se ha usado la clonación del telómero?
4. ¿Qué significa cartografiar el genoma humano?
5. ¿Por qué el acortamiento telomérico es nefasto en las células somáticas, pero no es un peligro para la sobrevivencia de la especie?
6. ¿Qué porcentaje del genoma presenta secuencias repetitivas, dónde se ubican estas secuencias en el cromosoma y por qué tienen esa ubicación, obedecerá a la función de esa región?
7. ¿Qué significado tiene el término "tándem" y el término "clúster"? Explique.
8. ¿Cómo se realizó la construcción de una biblioteca genómica de ADN telomérico? ¿Qué tipo de problema tuvieron que solucionar? ¿Cuál fue el organismo de modelo que se siguió para caracterizar el telómero humano?
9. ¿Qué son las enzimas de restricción? ¿Por qué no se usaron en el caso de la construcción de la biblioteca genómica humana? ¿Qué técnica reemplazó la acción de las enzimas de restricción?
10. ¿Cuál es la unidad básica del telómero humano?
11. ¿Para qué se usó la construcción de cromosomas artificiales de levadura (CAL) para clonar ADN humano? Describa cómo se hizo la construcción genética.
12. ¿Qué significa ADN "quimérico"?
13. ¿Cuál fue la conclusión que obtuvieron de los experimentos con CAL?
14. ¿Cómo se propone medir la distancia de los genes en este trabajo? ¿Cómo se había hecho hasta antes de los resultados de estos experimentos?
15. ¿Qué características tiene el ADN en la región vecina al telómero (regiones subteloméricas)?
16. ¿Qué relación existe entre el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento? ¿Por qué ocurre?
17. ¿Qué rol cumple la telomerasa? ¿Cuál es el mecanismo molecular conocido para la función de esta enzima?

Cuestionario seminario 3

Telómeros, telomerasas y cáncer

1. ¿Qué son los telómeros?
2. ¿Qué función tiene la telomerasa?
3. ¿Cuál es la composición de los telómeros?
4. De acuerdo a la lectura cuál es la definición de gen.
5. ¿Cuál es la función de la telomerasa?
6. ¿Cómo ocurre la replicación de los extremos?
7. ¿Cómo se comportan en cultivo las células provenientes de personas de más edad comparada con aquellas provenientes de personas más jóvenes, a qué se atribuye esto?
8. ¿Qué relación existe entre la longitud del telómero y el número de divisiones celulares de células somáticas?
9. ¿Qué relación hay entre telómeros, envejecimiento y telomerasa y cáncer?
10. ¿Qué relación existe entre telomerasa e inhibidores de la telomerasa como posible terapia anticáncer?
11. ¿Cuáles son las perspectivas en el tratamiento del cáncer mediante la terapia génica?
12. ¿Qué es el *Tetrahymena* y qué importancia tiene en relación a los telómeros?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C

Cuestionario seminario 4

Bases genéticas del cáncer

1. ¿Cómo se genera el cáncer? ¿Cómo funciona una célula normal? ¿Qué es la metástasis?
2. ¿Cómo pudieron comprobar que habían daños en los cromosomas de las células cancerosas?
3. ¿Es el cáncer hereditario? ¿Cómo lo han comprobado?
4. ¿Cuál es la hipótesis de Knudson? ¿Qué estudios realizó para postular la hipótesis? ¿Qué mecanismo postuló en relación con la hipótesis?
5. ¿Qué son los protooncogenes, qué función cumplen y qué son los oncogenes? ¿a qué tipo de herencia pertenecen?
6. ¿Qué son los genes supresores de tumores? ¿qué función cumplen?
7. ¿Qué es el retinoblastoma? ¿en qué cromosoma se encuentra ubicado? ¿Cuál es la causa que produce la enfermedad?
8. ¿Qué es la evolución clonal? Ejemplifique con el cáncer de colon. Refiérase a la planificación del estudio para demostrar la evolución clonal.
9. ¿Dónde se sitúa el gen *APC*, en qué cromosoma? ¿Cuál sería su función? ¿A qué tipo de proteína codifica?
10. ¿Dónde se encuentra el gen *p53*, en qué cromosoma? ¿Cuál es su función?
11. ¿Dónde se encuentra el gen *DCC*, en qué cromosoma? ¿Cuál es su función?
12. ¿Qué comportamiento sufre el astrocitoma, cuando lo comparamos con el cáncer de colon?
13. ¿Qué alteraciones se evidencian a nivel genético en la aparición y desarrollo del astrocitoma?
14. A nivel celular ¿qué pasa con los receptores que son cifrados por protooncogenes?
15. ¿Qué condiciones mínimas alteradas facilitan la formación de tumores cerebrales y probablemente tumores de colon?
16. ¿Cuáles son las conclusiones del trabajo?

Cuestionario seminario 5

Suicidio celular en la salud y en la enfermedad

1. ¿Qué es la apoptosis? ¿Qué patologías surgen cuando este proceso está alterado?
2. ¿Qué fenómenos biológicos están relacionados con la apoptosis?
3. ¿Qué diferencias hay entre apoptosis y necrosis?
4. ¿Qué son los cuerpos apoptóticos?
5. ¿Cómo está formado el cristalino del ojo y las capas superiores de la epidermis?
6. ¿Cómo se gatilla la apoptosis?
7. ¿Qué son las proteasas de “tipo ICE”?
8. ¿Cuáles son las células apoptóticas en el adulto?
9. ¿Por qué los timocitos y células T sufren apoptosis, y en qué circunstancias?
10. ¿Qué mecanismos permiten la entrada a la apoptosis en las células T?
11. ¿Cómo afecta la diferenciación al gatillamiento de la apoptosis?
12. ¿Cuáles son las proteínas bloqueadoras de la apoptosis?
13. ¿Qué mecanismos han desarrollado los virus para bloquear la apoptosis?
14. ¿Por qué en el trabajo se menciona que el sistema inmunitario tiene algunas estrategias para contrarrestar algunas artimañas víricas?
15. ¿Por qué la inducción apoptótica de las células sanas contribuye al hundimiento inmunitario en los enfermos de SIDA? ¿Cuál es la razón?
16. ¿Qué rol desempeñan los radicales libres en la apoptosis de las células T?
17. ¿Por qué se produce la autoinmunidad?
18. ¿Cuándo se desarrolla el cáncer? ¿Qué rol desempeña la proteína p53?
19. Indique otras enfermedades que serían causadas por apoptosis desregulada.

Cuestionario Seminario 6

Terapia génica contra el cáncer

1. ¿Qué es la terapia génica? ¿Cómo ha sido considerada en el tratamiento de cáncer?
2. ¿En qué se basa la terapia génica?
3. ¿Cuáles han sido los enfoques de la terapia génica?
4. ¿En qué consiste la leucemia? ¿Cómo se ha tratado hasta la fecha? ¿Cuál es el nuevo enfoque?
5. ¿Qué se entiende por “marcador inocuo”, en qué consiste y por qué se usa?
6. ¿En qué consisten las vacunas génicas? ¿Qué problema trae consigo el tratamiento por este método de prevención?
7. ¿Qué es la respuesta inmunitaria? ¿Cómo participan las citoquinas en esta respuesta?
8. ¿Cuál es el enfoque más moderno que ha sido ensayado? ¿En qué consiste? ¿Cuál ha sido la respuesta de esta fase preliminar? ¿y por qué no se considera óptima?
9. ¿Se podrá aplicar el concepto tradicional de vacuna a algunos tipos de cáncer, a cuál y por qué?
10. ¿Cómo se ha concebido y aplicado el concepto de vacunas antioncológicas o vacunas de ADN?
11. ¿En qué consiste el modelo de terapia génica basada en anticuerpos?
12. ¿A qué se le denomina “vacuna reforzada”?
13. ¿Cuál sería el aporte de la técnica de ADN recombinante?
14. ¿Qué es un oncogén y qué es un gen supresor?
15. ¿Qué avances se han obtenido con la inserción del gen supresor *p53* sano en células cancerosas?
16. ¿En qué consiste el fenómeno de “solidaridad”?
17. ¿Cómo se realizó la experiencia del suicidio génico?
18. ¿En qué consiste la terapia génica en el SIDA?
19. ¿Cómo se aplica la terapia de los genes suicida en el sida?
20. ¿Qué otras terapias se han desarrollado contra el sida?

Cuestionario seminario 7

Radiación solar y cáncer de piel

1. ¿Cuál es la estadística para el cáncer de piel en EEUU y en cuántas formas se manifiesta, a qué forma corresponde cada uno, cuál es la gravedad de cada tipo?
2. ¿Cómo se produce una mutación permanente a causa de la luz ultravioleta?
3. ¿Cuál es la población de mayor riesgo en Australia? ¿a qué se debe la susceptibilidad a contraer cáncer de piel?
4. ¿Cómo es la génesis de un tumor de piel? ¿Cómo se producen las mutaciones genéticas inducidas por los rayos ultravioleta en genes de las células epiteliales?
5. ¿Cuáles son los dos tipos de efectos nocivos de origen solar en las células de la piel?
6. ¿Por qué se escogió el gen *p53*? ¿Qué relación hay con el ADN del papilomavirus humano? ¿Qué se concluyó luego de comparar tumores de diverso origen?
7. ¿Qué son los “puntos calientes” de un gen?
8. ¿Qué incidencia muestra el gen *p53* a la mutación en tumores no vinculados a la radiación solar?
9. ¿Por qué no se reparan los puntos de mutación en algunas células donde la secuencia del gen *p53* se ha alterado, como ocurre en otros casos?
10. ¿Qué relación hay entre la proteína P53 en altas concentraciones dentro de la célula y la apoptosis?
11. ¿Qué sucede cuando la proteína P53 está ausentes en ratones sometidos a radiación ultravioleta, comparados con ratones normales?
12. ¿Por qué prolifera una célula con el gen *p53* mutado en tanto las células normales que la rodean sufren apoptosis?
13. ¿Qué es un agente carcinogénico?
14. ¿Qué es la enfermedad de Gorlin?

Cuestionario seminario 8

Lucha contra el Cáncer de próstata

1. ¿Cuál es la incidencia del cáncer de próstata en la población masculina norteamericana?
2. ¿En qué consiste la “prueba de cribado no invasiva”? ¿Qué otras pruebas existen para la detección de este tipo de cáncer?
3. ¿Cuál es el problema de la detección del antígeno PSA?
4. ¿Qué es la “velocidad del antígeno específico”?
5. ¿Qué significado tiene el NPI?
6. ¿Qué relación existe entre cáncer de próstata y cáncer de mamas?
7. ¿Cuáles son los estadios del cáncer de próstata? Describir y caracterizarlos. ¿Qué es el TNM?
8. ¿Qué es la metástasis? ¿En cual de los estadios hay ya indicios de metástasis?
9. ¿Cuáles son los tratamientos que deben seguirse en cada estadio del cáncer de próstata?
10. ¿Qué es el índice de Gleason?
11. ¿Qué herramientas moleculares se usan para predecir el comportamiento de un tumor a nivel experimental?
12. ¿Cuál es el rol del gen *p53* en el comportamiento tumoral?
13. ¿Qué resultados se logran con la radioterapia clásica en el tratamiento de tumores prostáticos?
14. ¿En qué consiste la radioterapia conformacional tridimensional (RTC 3-D)?
15. ¿Qué es la braquiterapia? ¿Qué es la criocirugía?
16. ¿En qué consiste la terapia hormonal?
17. ¿Qué es la terapia combinada? ¿Qué significa el término neoadyuvante?
18. ¿Cuál es la relación entre cáncer de próstata y consumo de grasas en la dieta?
19. ¿Cuáles son los potenciales marcadores de virulencia en el cáncer de próstata?

Cuestionario seminario 9

Envejecimiento

1. ¿Qué es la memoria molecular de las células?
2. ¿Qué genes confieren mayor longevidad a las levaduras? ¿y cuáles en *Caenorhabditis*?
3. ¿Qué causa produce en *Drosophila* una mayor longevidad?
4. ¿Cuáles son las teorías imperantes sobre la naturaleza del envejecimiento?
5. ¿Cuáles son los procesos moleculares responsables del envejecimiento? ¿qué evidencias existen?
6. ¿Qué relación hay entre los genes que regulan el ciclo celular y el envejecimiento?
7. ¿Cómo enfrenta la humanidad el envejecimiento?
8. ¿Cuáles son los eventos celulares del envejecimiento?
9. ¿Cómo se ha probado que el gen *tin2* participa en el acortamiento del telómero?
10. ¿Cuáles son los efectos de las mutaciones mitocondriales?
11. ¿Qué efecto tiene el envejecimiento sobre los sistemas de órgano?
12. ¿Cuál es el aporte de los temas de este seminario a su labor de enfermera o enfermero?

Cuestionario seminario 10

Genes que oponen resistencia al SIDA

1. ¿Qué datos apoyan la tesis que existen genes que protegen contra el SIDA?
2. ¿A qué se refiere con la frase “estirpes diferentes de virus que producen SIDA”?
3. ¿Qué quiere decir que el gen que codifica una proteína sea polimórfico?
4. Compare exogamia y endogamia ¿qué significado tiene en la búsqueda de alelos con resistencia al SIDA? ¿qué es un alelo?
5. ¿Qué es la cartografía genética?
6. ¿qué estrategia pusieron en práctica para lograr el objetivo de encontrar los genes que son protectores contra el SIDA?
7. ¿Cuál es el mecanismo de interacción del virus con los macrófagos?
8. ¿Cuál es la historia natural del alelo de resistencia al SIDA?
9. ¿Cómo se distribuye en la población humana el alelo de resistencia?
10. ¿Cuál es la perspectiva de los fármacos contra el SIDA?
11. ¿Cuál es la contribución de los temas tratados en este trabajo a su formación de enfermero o enfermera?

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de C

ANEXO 6

EL CÓDIGO GENÉTICO

Primera posición	Segunda posición				Tercera posición
	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-Stop	UGA-Stop	A
	UUG-Leu	UCG-Ser	UAG-Stop	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-Ala	GCU-Ala	GAU-Asp	GGU-Gly	U
	GUC-Ala	GCC-Ala	GAC-Asp	GGC-Gly	C
	GUA-Ala	GCA-Ala	GAA-Glu	GGA-Gly	A
	GUG-Ala	GCG-Ala	GAG-Glu	GGG-Gly	G

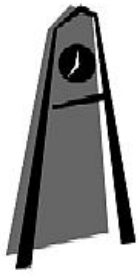
Sistema Biblioteca de C

ANEXO 7

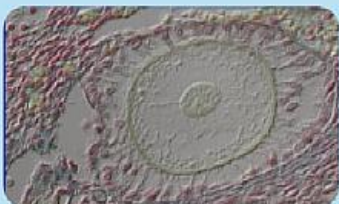
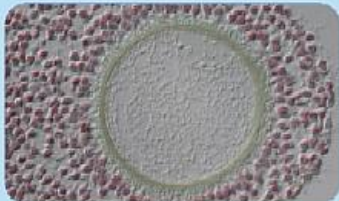
SÍMBOLO DE LOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
B	Asx	Asparagina o ácido aspártico	N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
D	Asp	Ácido aspártico	Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido Glutámico	R	Arg	Arginina
F	Phe	Fenilalanina	S	Ser	Serina
G	Gly	Glicina	T	Thr	Treonina
H	His	Histidina	V	Val	Valina
I	Ile	Isoleucina	W	Trp	Triptófano
K	Lys	Lisina	Y	Tyr	Tirosina
L	Leu	Leucina	Z	Glx	Glutamina o Ácido Glutámico

SIBUDE
Sistema Bibliotecario de la U de C



DIRECCIÓN DE DOCENCIA



MANUAL DE BIOLOGÍA CELULAR PARA LA CARRERA DE ENFERMERÍA

