REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE BARCELONA

REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA Y DIFERENCIACION CELULAR EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTAS

DISCURSO
leído por el Académico Electo
M. Iltre. Prof. Dr. D. SANTIAGO VIDAL SIVILLA
el día 20 de Febrero de 1983
en el acto de su recepción

DISCURSO
de contestación del Académico Numerario
Excmo. Prof. Dr. D. ADOLFO AZOY CASTAÑE

BARCELONA
1983

REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA Y DIFERENCIACION CELULAR EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTAS

REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE BARCELONA

REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA Y DIFERENCIACION CELULAR EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTAS

DISCURSO
leído por el Académico Electo
M. Iltre. Prof. Dr. D. SANTIAGO VIDAL SIVILLA
el día 20 de Febrero de 1983
en el acto de su recepción

DISCURSO
de contestación del Académico Numerario
Excmo. Prof. Dr. D. ADOLFO AZOY CASTAÑE

BARCELONA
1983

Depósito Legal: B. 1.257 - 1983
Industria Gráfica Ferrer Coll, S. A. - Pje. Solsona, s/n. - Barcelona-14

Als meus pares.

Excel·lentíssim Senyor President,
Molt Il·lustres Senyors Acadèmics,
Dignissimes Autoritats i Representacions d'altres Institucions,
Senyores i Senyors:

Es natural que les primeres paraules dels qui han rebut l'honor d'ésser elegits Membres Numeraris de la Reial Acadèmia de Medicina de Barcelona siguin d'agraïment per una tan alta distinció.

En el meu cas, l'expressió d'agraïment és molt sentida perquè crec que la distinció m'ha sigut atorgada generosament, per benevolència dels Senyors Acadèmics més que pels meus mereixements. Quan fou proposada la meva candidatura per a ocupar una vacant d'aquesta Reial Acadèmia, vaig preguntar-me i em pregunto encara quins mèrits podien justificar la distinció que volien atorgar-me.

Havent iniciat la meva formació a la nostra Facultat com metge clínic, sota la direcció d'un gran mestre, el Professor Ferrer Solervicens, vaig sentir-me profondament impressionat pel seu exemple de servei a la Universitat. No sé si en el seu anecdotari s'ha esmentat quelcom semblant, però recordo que més d'una vegada m'havia dit: «La nostra o la meva missió (com Catedràtic) és sembrar sense pensar en la collita. No em preocupa qui, quan o com en recollirà els fruits, però per a que hi hagi collita cal que algú sembri».

Poc després de la mort de Ferrer Solervicens, el seu successor Professor Soriano m'indicà la coveniència d'acceptar la proposta del Professor Jiménez Vargas per a col·laborar, conjuntament amb el Dr. Vives Mañé, en els ensenyaments de Fisiologia i Bioquímica. Es tractava de suplir, encara que sols de manera provisional i transitòria, la penúria de col·laboradors del nou vingut Professor a la nostra Facultat.

El Dr. Vives pogué ésser substituït aviat pel Dr. Alberto Sols, avui brillant Catedràtic de Bioquímica a la Universitat Autònoma de Madrid, però jo bo i seguint la formació de metge clínic, vaig haver de perllongar encara, un any darrera l'altre, la meva tasca provisional a la Càtedra de Fisiologia de la nostra Facultat. Hi col·laborava amb tan bona voluntat

que a més de contribuir a les tasques docents i de recerca, vaig prestar-me fins i tot a anar a una oposició a càtedres de Fisiologia i Bioquímica, no pas amb la intenció d'esdevenir catedràtic sinó a fi d'ajudar a l'amic Sols enfront dels altres opositors.

En aquella oposició no vaig desentonar i fou després quan Jiménez Vargas em proposà seguir decididament la meva preparació en Fisiologia i Bioquímica, ja que per la desbandada de la guerra civil restaven encara a Espanya moltes càtedres vacants, mancades de personal idoni per servir-les. Alguns haurien pogut ocupar-les però preferien anar-se'n a l'estranger, on podien disposar d'uns mitjans incomparables amb els que oferien aleshores les càtedres espanyoles.

I fou així, per l'esperit de servei a la nostra Universitat i per la necessitat de sembrar que m'havia inculcat el Professor Ferrer Solervicens, que vaig emprendre una trajectòria de dedicació decidida a l'ensenyament de la Fisiologia i de la Bioquímica, tot i preveient que aquesta tasca no em reportaria lluïment ni satisfaccions personals, sinó més aviat molts treballs i no pocs sacrificis i contrarietats, com de fet així ha sigut.

Després d'aquesta explicació, considero que si algun mèrit podria justificar la meva incorporació a aquesta Reial Acadèmia és la bona voluntat d'haver emprès una tasca difícil, en condicions poc favorables i amb perspectives d'escàs lluïment. He dit bona voluntat perquè en realitat no em sento prou satisfet de l'encert de la meva actuació i penso que altres potser haurien pogut fer-ho millor o amb més èxit.

August Pi i Sunyer, partint del no res, fou capaç d'aconseguir la creació d'un Institut de Fisiologia modèlic, ben dotat de personal, de material i d'altres mitjans, els necessaris per a realitzar unes tasques docents i d'investigació admirables. Però cadascú és com és i també les circumstàncies i l'ambient varien segons les èpoques.

Si bé durant més de 20 anys no he parat d'escriure memòries, de presentar projectes i de visitar a les autoritats ministerials i acadèmiques de torn, a fi d'aconseguir la reforma dels locals de la Càtedra de Fisiologia i les necessàries dotacions de personal i material, certament sols he obtingut alguna reforma parcial i poques i migrades ajudes. Potser perquè em sobrava ingenuïtat i em mancava la personalitat d'un Pi i Sunyer per a promoure voluntats i ajudes com ell sabé fer-ho en la seva època.

Després d'agraïr als Senyors Acadèmics l'honor d'haver-me elegit, he d'expressar el meu agraïment a tots els qui m'han ensenyat. Als cate-

dràtics Ferrer Solervicens, Soriano, Jiménez Vargas i Pi i Sunyer, ja esmentats com models o protagonistes de la meva formació i dedicació, hauria d'afegir tots els mestres que he tingut durant la meva vida i especialment els professors de la nostra Facultat.

Dels ensenyaments rebuts durant el periode bàsic, recordo especialment, a més dels de Pi i Sunyer, els dels professors Salvador Gil Vernet, Taure, Bellido, Diego Ferrer, Pere Domingo, Pòlit, Ferran Martorell i altres dignes també d'ésser esmentats. Em plau afegir el nom del Professor Adolfo Azoy, de qui els alumnes de la meva promoció, la primera de la Universitat Autònoma de Barcelona, rebèrem unes magnífiques lliçons sobre la fisiologia de l'equilibri, impartides a l'Institut Psicotècnic de la Generalitat.

Dels ensenyaments rebuts durant el periode clínic, a més dels de Ferrer Solervicens i Soriano, he de destacar els dels Professors Pedro i Pons, Carulla, Piulachs, Puig Sureda, Arandes, Víctor Cónill, Nubiola, Peyrí, Vilanova, Casanovas, Casadesús, Lluís Celis, Gibert-Queraltó, Sales Vázquez, Sarró, Gallart Monés i altres. Em plau afegir a aquesta llista el nom del Professor Belarmí Rodríguez Arias, de qui d'una manera extraordinària, assistint als cursos de Neurologia que organitzava a l'Institut Neurològic Municipal, vaig rebre unes lliçons molt profitoses.

En aquest capítol d'agraïments, he de recordar molt especialment els collaboradors i deixebles que m'han ajudat en les tasques del Departament de Fisiologia i Bioquímica des de que vaig fer-me'n càrrec. Aquesta època va coincidir amb un creixement progressiu de l'alumnat fins a xifres exorbitants, que implicaven un greu deteriorament de l'ensenyança. La migradesa dels mitjans disponibles i la penúria de professorat i de vocacions abnegades per a dedicar-se a assignatures tan bàsiques com la Fisiologia i la Bioquímica foren problemes que agreujaven la situació. Si malgrat aquestes dificultats, la docència i la recerca de la Fisiologia i de la Bioquímica s'han pogut complir a la nostra Facultat, no diré a un nivell satisfactori però sí amb un mínim de dignitat i d'eficàcia, ha sigut gràcies a l'esforç dels meus collaboradors.

No puc esmentar-los tots ni sabria amb quin ordre fer-ho. Rememoraré el record de Walter Oppenheimer i Ricard Blanxart, els dos morts al principi, el primer en plena maduresa, quan encara podia donar molt de sí, i el segon prematurament, quan prometia un bon esdevenidor científic. D'altra part, no puc oblidar la collaboració valuosa dels amics Josep Vives Mañé i Jordi Gras Riera, tan pretigiosos en llurs respectius ensenyaments de la Fisiologia i de la Bioquímica.

Esmentaré també els qui assoliren, per mèrits propis, categoria de catedràtics o d'agregats: Ramon Segura, esdevingut ilÏustre Catedràtic de Fisiologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Bellaterra; Josep Carreras, brillant Catedràtic de Bioquímica i actualment Degà de la nostra Facultat; August Corominas, illustre Catedràtic excedent de la Facultat de Medicina de Múrcia, i Cristóbal Mezquita, Professor Agregat i distinguit investigador de la nostra Facultat.

Ara hauria de seguir amb una llarga llista de professors adjunts, ajudants, becaris, doctorants, alumnes interns i personal no docent que han col·laborat en les tasques del Departament durant un nombre variable d'anys. Com representant de tots ells esmentaré el més antic, Antoni Balagué, qui començà en els temps del Professor Jiménez Vargas com alumne intern i segueix actualment com professor adjunt.

En aquest acte, voldria recordar també tots els amics que m'ajudaren o m'estimularen d'alguna manera en el transcurs de la meva vida. Entre ells, em plau esmentar els del veïnat del meu poble de Talarn, que fa alguns anys m'honraren amb llur homenatge.

No cal dir que dec l'agraïment més sentit a la meva família, a la que les tasques universitàries m'han privat de dedicar tot el temps que hauria desitjat.

Em toca ocupar el seient que deixà vacant el Molt Il·lustre Acadèmic Professor Joan Obiols Vié, qui ingressà a la Reial Acadèmia el 1977 i morí el 1980, quan es podien esperar d'ell els millors fruits.

La figura, les obres i les qualitats del Professor Obiols son ben conegudes de tots nosaltres i han sigut exposades en sessions necrològiques i escrits relativament recents. Tractaré de fer l'elogi del meu antecessor sense pretendre un estudi biogràfic que podria resultar massa llarg per l'extensió de la seva obra i la riquesa de la seva personalitat. No és fàcil glossar en poques paraules una personalitat tan extraordinària, vigorosa i pletòrica d'activitats com la del Professor Obiols.

Vaig conèixer l'amic Obiols al voltant del 1946, amb motiu de visitar la càtedra de Fisiologia, acompayant al seu mestre Professor Sarró, per a veure les possibles aplicacions d'un primitiu electroencefalògraf que acabava d'adquirir el Professor Jiménez Vargas. Aleshores ja m'impressionà el seu esperit de recerca i l'afany de fonamentar-la en dades neurobiològiques. Aquest afany fou una preocupació constant del Professor Obiols en la seva orientació innovadora de la Psiquiatria.

Una manifestació ben palesa d'aquesta actitud innovadora fou la celebració a Barcelona, l'any 1978, del II Congrés Mundial de Psiquiatria Biològica, organitzat i presidit pel Professor Obiols. En el pròleg de l'obra «Biological Psiquiatry today», recull dels treballs de l'esmentat Congrés, Obiols proclamava la necessitat de nous horitzons i el neixement d'una nova Psiquiatria, però sense renunciar a seguir essent un psiquiatra clínic. Obiols, amb un esperit sempre obert, tenia la capacitat de saber conjuntar posicions aparentment antitètiques.

El Professor Obiols no es limità a desenvolupar unes tasques docents i de recerca admirables dintre del seu Departament. Com professor universitari anà més enllà. Havent esdevingut l'any 1972 catedràtic de la nostra Facultat, tres anys després fou elegit Degà, càrrec que acceptà malgrat ésser conscient de les dificultats d'enfrontar-se amb els problemes greus que comportava. Pel seu esperit de servei a la Universitat, fins i tot s'avingué a ocupar el Rectorat l'any 1977, en moments altament crítics.

Aquell mateix any, pel seu brillant historial universitari i amb tots els mereixements, el Professor Obiols fou anomenat Membre Numerari d'aquesta Reial Acadèmia. Perquè reflexen el seu esperit, crec oportú repetir aquí alguns paràgrafs del seu discurs de recepció sobre «Psiquiatria d'ahir, Psiquiatria d'avui i Psiquiatria de demà»:

«Veritablement per a mi, avui és un gran dia. No se m'amaga que a l'honor que suposa aquest anomenament s'hi afegeix la responsabilitat per la tasca a complir. La missió de les Reials Acadèmies es fonamental en la vida científica d'un país... La nostra institució ha d'estar al front i a l'avantguarda de totes les inquietuts mèdiques del nostre país. Vull dir-vos que accepto amb joia formar part de les vostres files i treballar amb tots vosaltres perquè la Reial Acadèmia de Medicina de Barcelona, pugui unir al seu passat gloriós, un esdevenidor carregat de realitzacions. Senyor President, Senyors Acadèmics, compteu-me des d'ara com el més humil seguidor en aquestes empreses.»

Avui, com successor del Professor Obiols en aquesta Reial Acadèmia, em fagi ressò d'aquestes paraules d'ell en el seu discurs de recepció. I per acabar de glossar l'elogi del meu antecessor, vull recordar solament que a més d'acadèmic i universitari exemplar, Obiols fou un gran metge, un humanista profond i una persona de qualitats excellents.

Com metge clínic, la seva formació fou molt completa, ja que abans de dedicar-se a la difícil especialitat del diagnòstic i del tractament propis de la Psiquiatria, el Doctor Obiols s'havia iniciat en el contacte amb el malalt exercint la medicina general a San Adrià del Besòs.

Com humanista, era d'una espiritualitat molt cultivada, ja que del temps absorbent de les seves tasques científiques i docents, Obiols encara en restava no poc per a dedicar-lo a lectures literàries i activitats artístiques, que dominava de manera admirable.

En l'aspecte de les seves qualitats personals, Obiols era l'home bo per excel·lència. Amable sempre i amb tothom, rebia amb atenció a qualsevol que volgués visitar-lo o exposar-li algun problema. Disfrutava fent favors i era incapaç de fer cap tort a ningú, dues actituds que ell sabia conciliar malgrat que no li era fàcil, ja que ocupà llocs de gran responsabilitat i havia de resoldre problemes molt importants.

El tema del meu discurs, «Regulación de la expresión genética y diferenciación celular en los organismos eucariotas» l'exposaré en dues parts, dedicant la primera a la «Regulación de la expresión genética en general» i la segona a la «Regulación de la expresión genética en relación con la diferenciación celular».

L'elecció d'aquest tema es deu en part a que alguns aspectes del mateix han sigut i segueixen essent investigats en el nostre Departament de Fisiologia de la Facultat de Medicina per l'equip del Professor Agregat Cristóbal Mezquita.

REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA Y DIFERENCIACION CELULAR EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTAS

1. REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN GENERAL

En los últimos veinte años se han acumulado bastantes datos fidedignos sobre la regulación de la expresión genética en procariotas, es decir, en células del tipo de los virus, fagos y bacterias cuyo material genético, el ADN, no está organizado en núcleos sino aislado o disperso en el citoplasma. Pero son todavía muy fragmentarios y relativamente escasos los datos experimentales aportados hasta ahora sobre la regulación de la expresión genética en las células eucariotas de los organismos unicelulares y de los organismos pluricelulares que constituyen la mayor parte de los seres vegetales y animales.

El sistema del operón, propuesto por Jacob y Monod, principalmente en base a sus experimentos de regulación de la expresión genética del operón de la lactosa en mutantes anormales de Escherichia coli, ha sido corroborado como modelo adecuado para explicar dicha regulación con respecto a otros supuestos operones, como el de la arabinosa y el del triptófano, investigados también en mutantes de Escherichia coli.

Mientras en Escherichia coli han sido identificados más de 200 operones y en otros procariotas resulta también muy numerosa la presencia y distribución de modelos de operón, no parece que tales modelos hayan sido demostrados en las células eucariotas en general, con sólo alguna posible excepción, como la de los genes del catabolismo de la galactosa en levaduras.

La organización de genes y locus o regiones reguladoras formando modelos de operón ofrece posibilidades muy simples y eficaces para coordinar la actividad de genes con funciones relacionadas entre sí. Mediante la organización básica del operón, con un gen represor y genes estructuralmente contiguos de regiones o locus promotores y operadores, la regulación de la expresión genética puede ser alcanzada por mecanismos de inducción o de represión (operones controlados negativamente) y por mecanismos de activación (operones controlados positivamente).

Si bien la regulación por operones se limitaría en principio al nivel

transcripcional, caben además posibilidades de atenuación o de modulación de los operones que actuarían a nivel postranscripcional o en los procesos de traducción.

En general, la regulación de la expresión genética por el modelo de los operones puede ser considerada como muy adecuada para controlar una o pocas unidades de transcripción, mediante señales reguladoras muy específicas, que permitirían la adaptación de los procariotas a determinados cambios ambientales, tales como pueden ser la presencia o disponibilidad de ciertos azúcares en el medio de cultivo de Escherichia coli.

Sin embargo, aún en los mismos procariotas, cuando se trata de la regulación de la expresión genética para el crecimiento y la síntesis de proteínas y de macromoléculas, que han de abocar a la división o a la reproducción de las bacterias y de los fagos o virus, el modelo del operón no puede resultar tan sencillo. Efectivamente, el control de tales procesos implica la intervención coordinada de varias o muchas unidades genéticas, y los mecanismos reguladores han de ser múltiples y capaces de actuar simultáneamente sobre varios locus y no sólo a nivel de la transcripción sino también a niveles postranscripcionales.

Se podrían aducir varios ejemplos de datos obtenidos en Escherichia coli que demuestran la mayor complejidad de regulación de la expresión genética para los procesos de crecimiento y división de los procariotas. Es de esperar un mejor conocimiento de los mismos en el futuro, a medida que sean aislados, identificados y secuenciados nuevos fragmentos de material genético o codones obtenidos de distintos procariotas.

La descripción y el análisis, con ejemplos, de estos mecanismos reguladores más complejos de los procariotas podría ser no ya el tema de un simple discurso sino el contenido de todo un curso de Genética, ya que ésta se basa fundamentalmente en las investigaciones realizadas en virus, fagos y bacterias. Pero, seguir hablando ahora de dichos mecanismos reguladores en los procariotas no sería oportuno en este discurso sobre la regulación de la expresión genética en los eucariotas. Sin embargo, no es posible dejar de aludirlos, aunque haya sido tan sólo brevemente, pues siendo tales mecanismos los más conocidos y constituyendo la base de la Genética moderna, se ha intentado postular la validez de los mismos, aplicándolos por extrapolación a las células eucariotas.

No vamos tampoco a discutir aquí la validez de una extrapolación del modelo del operón a la regulación de la expresión genética en los eucariotas. No pretendemos negarla ni afirmarla sino que vamos a prescindir de dicho modelo como hipótesis y proseguiremos este discurso utilizando sólo los datos y los argumentos interpretativos a base de re-

sultados obtenidos directamente de las investigaciones en organismos eucariotas.

Como ya hemos indicado, los datos conocidos sobre la regulación de la expresión genética en eucariotas son sólo resultados relativamente escasos y fragmentarios, en comparación con los conseguidos en los procariotas. Los eucariotas presentan la mayor parte del material genético ordenado en la estructura del núcleo y ofrecen múltiples compartimentos y orgánulos celulares separados y organizados por el desarrollo de numerosas e intrincadas estructuras membranosas. Tanto la ordenación del núcleo como la de las estructuras membranosas celulares no son estáticas, sino extraordinariamente cambiantes en distintas fases y momentos de la vida celular, evolucionando según equilibrios muy dinámicos.

Por la ordenación del material genético nuclear, por la complejidad de la compartimentación celular y por el dinamismo de su organización estructural, resulta que las posibilidades de regulación de la expresión genética son en las células eucariotas mucho más numerosas y complejas que en las procariotas. Sus múltiples y complejos mecanismos de regulación actúan o pueden actuar a muy distintos niveles y entre ellos cabe distinguir teórica y cronológicamente los cuatro siguientes:

1. A nivel de la transcripción en la cromatina nuclear.
2. A nivel de la transición de los ARN premensajeros a los mensajeros maduros, en el núcleo.
3. A nivel de la membrana nuclear, en el transporte de los ARN mensajeros al citoplasma.
4. A nivel del citoplasma, por los equilibrios entre los ARN mensajeros estables, los libres y los unidos a los polirribosomas y en proceso de traducción.

Para poder ejercer su acción reguladora es indispensable que las moléculas efectoras de los distintos mecanismos, capaces de actuar como inductoras, activadoras o represoras, se encuentren o puedan llegar a los niveles de regulación correspondientes. Los efectores que actúan a nivel del proceso de transcripción o bien en la transición de los ARN premensajeros a los ARN mensajeros maduros han de encontrarse en el núcleo o han de penetrar en él si proceden del citoplasma o del exterior de la célula. Los efectores capaces de intervenir en el transporte de los ARN mensajeros desde el núcleo al citoplasma han de actuar a nivel de la

membrana nuclear. Finalmente, ha de admitirse la existencia de efectores capaces de intervenir en los procesos de traducción que ocurren en el citoplasma y concretamente a nivel de los polirribosomas.

1.1. Regulación de la expresión genética a nivel de la transcripción en la cromatina nuclear

La cromatina es un complejo de ADN, histonas y proteínas no histonas, que adopta formas y estructuras variables según las fases que se suceden cíclicamente para la replicación del ADN y consiguiente división de las células eucariotas. En la mayoría de las células somáticas de las plantas superiores y de los animales, entre una mitosis y la siguiente (unas 24 horas) se intercala la síntesis de ADN (6 a 10 horas) precedida de un período postmitósito G1 (de 6 a 20 horas) y seguida de un período premitósico G2 (de unas 4 horas). La cromatina se condensa y adquiere las características de la heterocromatina durante la mitosis (1 hora aproximadamente), en que la transcripción es inactiva, y adopta parcialmente las características de la eucromatina en los períodos de intermitosis, en los que se manifiestan las actividades de la transcripción.

En el transcurso de la evolución filogenética, el incremento progresivo de las cadenas o hebras del ADN y la necesidad de empaquetarlas en el pequeño volumen nuclear planteó un problema formidable. Téngase en cuenta que unos 2 metros de ADN humano están colocados en el interior de núcleos celulares cuyo diámetro es sólo de unas centésimas de milímetro. La dificultad del problema viene dada por la rigidez de la molécula de ADN, por la repulsión electrostática de sus grupos fosfato y por la tendencia entrópica a la expansión, y la resolución del mismo fue posible gracias a las asociación del ADN con las histonas.

Las interacciones del ADN con las histonas dan lugar a dos niveles de organización de la cromatina: Por una parte, el enrollamiento del ADN alrededor de un complejo de histonas, constituyendo el nucleosoma, y por otra parte, la organización de los nucleosomas en estructuras de orden superior. Un empaquetamiento muy compacto de los nucleosomas, formando las regiones de heterocromatina, impide la transcripción. La transcripción requiere una conformación más laxa y extendida o menos compacta, como la de la eucromatina, siendo necesario que por lo menos una de las hebras del ADN, la que contiene la secuencia a transcribir, se desenrolle por completo para facilitar el acceso y el desplazamiento de la ARN polimerasa.

Los conjuntos de histonas, a cuyo alrededor se enrolla la doble cadena helicoidal del ADN son bastante bien conocidos y comprenden las histonas H2A, H2B, H3 y H4 que forman el octámero o núcleo del nucleosoma, y además la H1 que une y estabiliza los nucleosomas. La función estructural de las histonas en el empaquetamiento del ADN y por consiguiente en la actividad genética está condicionada y puede variar cuando las histonas resultan modificadas por reacciones químicas tales como las de acetilación, de fosforilación, de metilación o de ADP-ribosilación.

Las proteínas nucleares no histonas son mucho más numerosas, más heterogéneas y menos estables que las histonas. Por otra parte, son más específicas para los diferentes tejidos y para unirse con el ADN y abundan mucho más en las células con actividad de transcripción que en las inactivas. Aunque las proteínas nucleares no histonas son menos conocidas que las histonas, existen otros datos indicativos de su probable valor regulador de las actividades de replicación y de transcripción.

Por los datos indicativos generales que acabamos de mencionar, parece evidente que las proteínas no histonas intervienen como determinantes o reguladoras de las actividades de transcripción del ADN. Actualmente se cree que son variaciones de las proteínas no histonas, provocadas probablemente en respuesta o en relación con señales específicas, las que juegan el papel más destacado o principal en la regulación de las actividades de transcripción de las células eucariotas.

Sin embargo, estamos todavía lejos de poder explicar a nivel molecular, como actúan las proteínas no histonas sobre el complejo de las nucleohistonas. Existen datos de que algunas de las proteínas no histonas actúan como enzimas capaces de catalizar reacciones de acetilación y desacetilación, de fosforilación y desfosforilación, de metilación y desmetilación, de ADP-ribosilación y de hidrólisis, o bien, con funciones no tan específicas pero no menos importantes para la viabilidad de tales reacciones o como activadoras o inhibidoras de las mismas.

Reacciones enzimáticas como las mencionadas además de ocurrir entre las proteínas nucleares no histonas, afectan principalmente a las histonas y pueden repercutir más o menos indirectamente sobre el ADN portador del mensaje genético, así como sobre las actividades enzimáticas de las ADN y ARN polimerasas, más directamente vinculadas a la replicación y a la transcripción de dicho mensaje.

Los métodos analíticos de alta resolución disponibles hasta ahora, como el de electroforesis bidimensional, han permitido detectar alrededor de 500 proteínas nucleares no histonas, algunas de las cuales han podido ser incluso bien identificadas por los aminoácidos componentes

y por el orden de sus secuencias. Es posible que en los núcleos de los distintos tejidos existan muchas más, que no han podido ser detectadas e identificadas todavía por hallarse a concentraciones pequeñísimas. Pero, su escasa cuantía no excluye su valor funcional de agentes reguladores, antes al contrario, ya que es propio de estos agentes o de los efectores en general el actuar a concentraciones ínfimas y en virtud de variaciones mínimas.

Entre las proteínas nucleares no histonas identificadas hasta ahora se encuentran bastantes que actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones químicas nucleares. Entre las enzimas nucleares merecen ser destacadas en primer lugar las ADN polimerasas que actúan en la replicación, las ARN polimerasas que actúan en la transcripción y las nucleasas que junto con otras enzimas actúan en los procesos de reparación del ADN.

En las células eucariotas superiores se han caracterizado bien tres enzimas ADN polimerasas que actúan en la replicación, la alfa (α), la beta (β) y la gamma (γ), diferentes por el peso molecular y el comportamiento electroforético, así como por su especificidad, su sensibilidad a las sales y a distintos inhibidores y también por su distribución en los diversos eucariotas.

Con respecto a las ARN polimerasas, se han descrito también tres tipos, Ia I, Ia II y Ia III, que actúan en la transcripción y se distinguen entre sí por algunas propiedades físico-químicas, por su sensibilidad a determinados inhibidores y por su distribución en diversas especies de eucariotas.

Otras proteínas nucleares no histonas identificadas también como enzimas que actúan en el núcleo celular son las que catalizan reacciones de acetilación y desacetilación, de fosforilación y desfosforilación, de metilación y desmetilación, de ADP-ribosilación y de hidrólisis. Los sustratos de estas reacciones son las histonas y otras proteínas no histonas y ya hemos mencionado la importancia de tales reacciones como condicionantes o reguladoras de los cambios estructurales de las nucleohistonas y de las actividades de replicación, de transcripción y de reparación del ADN.

Han sido identificadas también diversas proteínas nucleares no histonas que carecen de función enzimática, pero cuya intervención en las reacciones nucleares no es menos importante para las actividades genéticas. Entre estas proteínas no enzimáticas se conocen algunas capaces de unirse o de interaccionar con gran afinidad con las secuencias específicas de determinados genes, de manera similar a como lo hacen otras

proteínas bien conocidas por actuar en los procariotas como represoras o activadoras. De proteínas que actúen en los eucariotas de esta manera se conocen pocas, pero sí algunas y puede servir de ejemplo la proteína ácida capaz de unirse con gran afinidad al gen de la globina en las células eritropoyéticas.

Algunas proteínas no histonas obtenidas de la cromatina de eucariotas que no tienen función enzimática son las denominadas HMG (High Mobility Group) porque se distinguen por su alta movilidad electroforética. Son de pequeño peso molecular y en su composición entran en proporciones similares aminoácidos básicos y ácidos. De entre las proteínas de este grupo que han sido identificadas y secuenciadas, cabe destacar las HMG 1 y 2, las HMG 14 y 17 y la HMG 20, denominada también ubicuitina.

Además de las macromoléculas constituyentes de la cromatina, ADN, histonas, proteínas no histonas y ARN, están también presentes en el núcleo, a concentraciones variables, sustancias de pequeño peso molecular, como diversos iones orgánicos e inorgánicos y mensajeros intracelulares, que son capaces de influir sobre la conformación y el comportamiento de dichas macromoléculas. Entre los cationes orgánicos deben citarse las poliaminas, entre los inorgánicos el Mg^{++} y el Ca^{++} y entre los mensajeros intracelulares los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc.

1.2. Regulación de la expresión genética a nivel de la transición de los ARN premensajeros a los mensajeros maduros en el núcleo

La transcripción genética para la síntesis de proteínas produce primariamente ARN premensajeros cuya cadena es más larga que la de los mensajeros maduros. Para la formación de estos últimos, la mayoría de los premensajeros han de experimentar procesos de transformación que ocurren en el mismo núcleo (adiciones en los extremos 3' y 5' y cortes y reuniones internos en las moléculas) antes de que los mensajeros maduros, de cadena más corta, puedan pasar al citoplasma.

En la actualidad está demostrado que la mayor parte de los premensajeros primariamente transcritos a nivel de los genes resultan rápidamente degradados y parcialmente destruídos en el mismo núcleo, de manera que sólo partes relativamente pequeñas de aquéllos son utilizadas para la formación de mensajeros maduros, capaces de pasar al citoplasma. Es evidente que todas las influencias o factores que puedan intervenir en los procesos de degradación de los premensajeros y en su

transición hasta la formación de mensajeros maduros, han de regular la expresión del mensaje genético transcrito, condicionando tanto el tipo como la cuantía de la proteína que va a ser sintetizada ulteriormente, en el citoplasma. Incluso es posible, en ciertos tipos de células, que determinadas secuencias primariamente transcritas nunca lleguen a tener expresión genética.

1.3. Regulación de la expresión genética a nivel de la membrana nuclear, en el transporte de los ARN mensajeros maduros al citoplasma

Para que el mensajero maduro pueda llegar a los polirribosomas del citoplasma ha de atravesar previamente la membrana nuclear. Desgraciadamente sabemos muy poco o casi nada de los mecanismos implicados en el transporte a través de la membrana nuclear, pero cabe suponer que tanto si fuese activo como si es más o menos pasivo, en el mismo han de estar involucradas de alguna manera las propiedades de la membrana nuclear. En consecuencia, parece evidente que las influencias o factores capaces de modificar las propiedades de la membrana nuclear han de controlar a nivel de la misma la eficacia de la expresión genética, condicionando la cuantía o la rapidez de la llegada de los ARN mensajeros al citoplasma y a los polirribosomas, así como la disponibilidad de los ARN amino-acil transportadores.

1.4. Regulación de la expresión genética a nivel del citoplasma, por los equilibrios entre los ARN mensajeros estable, los libres y los unidos a los polirribosomas

Cuando las moléculas de ARN mensajero llegan al citoplasma se asocian en parte con proteínas del mismo, adoptando así una forma fija o estable que no está disponible para el proceso de traducción en los polirribosomas. De la cuantía de los ARN mensajeros libres, disponibles para la traducción, depende la intensidad de esta última; por consiguiente, la relación o el equilibrio entre las formas libres y las fijas de cada tipo de ARN mensajero condiciona la velocidad de su traducción en los polirribosomas. Además, los ARN mensajeros libres son más o menos lábiles y susceptibles de procesos de degradación, que ocurren en cada

ARN mensajero con mayor o menor facilidad según las secuencias de sus polinucleótidos.

Parece evidente que cualquier influencia o factor capaz de modificar el equilibrio entre las formas libres y las formas fijas de los ARN mensajeros, así como la degradación de las formas libres, ha de condicionar el acceso de estas últimas a los polirribosomas y en consecuencia la velocidad del proceso de traducción.

Finalmente, la actividad traductora de los polirribosomas puede depender de que éstos estén más o menos cubiertos por estructuras membranosas, de que sean más o menos estimulados o inhibidos, de que ofrezcan mayor o menor acceso a los sitios de iniciación de secuencias y de la disponibilidad de ARN amino-acil transportadores.

1.5. Características de la regulación de la expresión genética con respecto al tiempo y al medio ambiental

Después de lo esbozado sobre los niveles y posibilidades de regulación de los eucariotas, conviene insistir en la comparación con la regulación genética de los procariotas, a fin de subrayar algunas diferencias en dos aspectos importantes para la eficacia de la regulación. Uno se refiere al tiempo o velocidad de intervención de los mecanismos reguladores y otro al medio ambiental que rodea a los procariotas y a los eucariotas.

Con respecto al tiempo, los procariotas, cuyos mecanismos reguladores son bastante simples y actúan esencialmente en la transcripción del ADN, requieren un tiempo relativamente largo. Se trata de mecanismos de inducción, de represión o de activación controlados por operones y su tiempo de actuación, aún en los casos de adaptación más rápida, se mide en minutos. Así, por ejemplo, en Escherichia coli la inducción de enzimas frente a nuevos sustratos metabólicos requiere un tiempo mínimo de 20 minutos.

En cambio, en las células eucariotas, si bien actúan también mecanismos relativamente lentos de regulación de la transcripción a nivel del ADN, pueden intervenir además otros mecanismos reguladores, los postranscripcionales, que permiten respuestas mucho más rápidas, del orden de segundos y aún de fracciones de segundo. Así, por ejemplo, la noradrenalina actuando sobre las células miocárdicas, además de provocar modificaciones de la transcripción a largo plazo, puede incrementar

de manera inmediata la concentración de ARN mensajeros acelerando la transición de premensajeros a mensajeros maduros.

Con respecto al medio ambiental, los procariotas y especialmente las bacterias se desarrollan en medios susceptibles de experimentar cambios muy intensos y tan drásticos como los que se pueden provocar en caldos de cultivo o por transmigraciones, diseminaciones o siembras en medios naturales o en los utilizados experimentalmente.

En cambio, si bien los eucariotas más inferiores (hongos, levaduras y protozoos) también pueden encontrarse o ser cultivados en medios naturales o artificiales susceptibles de grandes variaciones cualitativas y cuantitativas, resulta que la mayoría de las células eucariotas, las superiores, se encuentran en la naturaleza formando parte de organismos pluricelulares, rodeadas de un medio interno cuya composición y propiedades se mantienen bastante constantes por la homeostasis. Sin embargo, tanto en su medio natural como en los de cultivos de tejidos, las células eucariotas superiores han de adaptarse y regular su actividad genética en relación con variaciones del medio que aún siendo mínimas ocurren inevitablemente, con gran rapidez y con mucha frecuencia.

No es de extrañar, pues, que las células eucariotas superiores, aún gozando de una mayor constancia del medio por la homeostasis, dispongan de mecanismos de regulación genética más complejos, de mayor sensibilidad y de respuesta muy rápida. Lo requiere incluso la misma necesidad de mantener la homeostasis, ya que ésta sólo es posible si todos los tejidos y órganos funcionan mancomunadamente, en estrecha interdependencia y de manera muy bien coordinada.

1.6. Intervención de los agentes hormonales y nerviosos

Una coordinación tan perfecta como la existente entre las células de un organismo pluricelular, además de necesitar mecanismos de respuesta sensibles y rápidos, requiere unos medios o sistemas de comunicación intercelular adecuados, cuya puesta en marcha sea también sensible y rápida y que sean capaces de regular no sólo las actividades metabólicas sobre los sustratos sino también las actividades genéticas transcripcionales y postranscripcionales, a nivel del núcleo y del citoplasma.

Y aquí es necesario referirse principalmente a la intervención de los agentes hormonales y nerviosos, que son los medios de comunicación intercelular más especializados de los organismos pluricelulares de ma-

yor complejidad. Tanto las hormonas, segregadas por las glándulas endocrinas y vehiculadas por la sangre, como los efectores químicos liberados por las terminaciones nerviosas, en virtud de los impulsos transmitidos por las vías correspondientes, son capaces de llegar rápidamente a los tejidos y órganos más diversos y distantes del organismo, para regular las actividades de todas sus células, de manera que el ser pluricelular se comporte como una unidad funcional.

Mientras diversas variaciones físico - químicas del medio interno, como las concentraciones de iones y los valores de pO_2 y pCO_2, ejercen influencias inespecíficas, los agentes hormonales y nerviosos actúan de manera muy específica en los diferentes tipos de células.

Para resultar efectivos, diversas hormonas y muchos transmisores nerviosos requieren la unión con receptores específicos de las membranas celulares, presentes sólo en determinados tipos de células y con distribución cuantitativa variable. La unión de las hormonas o de los transmisores con los receptores de membrana provoca reacciones celulares distintas, que pueden consistir en estimular o inhibir la formación de determinados nucleótidos cíclicos, los mensajeros intracelulares AMPc o GMPc, capaces de actuar en el citoplasma o de llegar al núcleo y de modificar sus actividades genéticas, o en provocar cambios de la permeabilidad de las membranas y de las concentraciones de iones, capaces también de repercutir sobre las actividades genéticas del núcleo y del citoplasma.

Otros agentes hormonales atraviesan las membranas de distintas células y pueden llegar al citoplasma y al núcleo celular, ya sea en forma libre o bien combinados con transportadores específicos, y son capaces de influir más o menos directamente sobre la regulación de las actividades genéticas nucleares o citoplasmáticas en determinados tipos de células.

Podría ahora tratar de describir cómo actúan, a nivel molecular, los distintos agentes hormonales y nerviosos en las diversas células de los seres pluricelulares más complejos, concretamente de los organismos animales y más especialmente del organismo humano. Sin embargo, aunque prescindiese de la regulación del metabolismo en general y me limitara sólo a la regulación de las actividades genéticas, no cabría tanto contenido en un discurso cuyo objetivo principal es considerar la regulación de la expresión genética en relación con la diferenciación celular.

2. REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN RELACION CON LA DIFERENCIACION CELULAR

Que una semilla o un óvulo fecundado, diminutos y aparentemente simples, se transformen en un organismo grande y complejo, como un árbol con su tronco, sus raíces, ramas y hojas, o como un animal con sus distintos órganos, huesos, músculos, piel, uñas y pelos, son fenómenos de la Naturaleza cuya observación ha venido maravillando al hombre desde los tiempos más remotos.

De la cultura helénica nos han llegado escritos de distintos filósofos o fisiólogos, así llamados como observadores y pensadores sobre la Physis o Naturaleza, que se refieren a los fenómenos de los seres vivientes. No voy a cansarles citando fragmentos de aquellos clásicos griegos, desde Anaxágoras y Empédocles hasta Platón y Aristóteles, que trataban de interpretar sus observaciones sobre el desarrollo y la diferenciación de los seres vivos de acuerdo con sus respectivas concepciones del Cosmos.

La interpretación de los fenómenos del desarrollo y de la diferenciación de los seres vivos han seguido siendo en todos los tiempos motivo de polémicas y discusiones, entre los biólogos y también entre los filósofos, ya que los distintos argumentos no suelen limitarse a los resultados experimentales sino que trascienden inevitablemente hacia especulaciones filosóficas.

Como muestras que corresponden a posturas opuestas sobre el tema citará dos frases. Una es de Diderot, quien decía a D'Alembert «Voyez-vous cet oeuf? C'est avec cela qu'on renverse toutes les écoles de theologie et tous les temples de la terre». En la otra frase, tomada de Lewis Carrol en «De l'autre coté du miroir», a la afirmación de un interlocutor «On ne peut pas croire des choses impossibles» replicaba un personaje «Je suppose que tu manques d'entrainement. Il m'est arrivé quelquefois de croire jusqu'à six choses impossibles avant le petit déjeuner».

Lo curioso de estas frases contrapuestas es que me han llegado a través de un mismo autor, François Jacob, el famoso genetista francés distinguido con el premio Nobel, quien cita la primera como lema de portada de su libro «La lógica de lo viviente», publicado y traducido en 1971, y la segunda también como lema de portada de su libro «Le jeu des possibles», publicado en 1981.

No quiero seguir divagando y si me he permitido esta disgresión

ha sido sólo para poner de relieve la importancia y la trascendencia de algo que por ser tan maravilloso parece increíble.

El desarrollo de un ser animal, como el humano, consiste esencialmente en procesos de crecimiento y diferenciación celulares, aparentemente irreversibles, que se suceden en el ciclo vital de cada organismo. Se manifiesta por cambios fenotípicos del individuo que se originan a nivel celular por interacciones entre el genoma nuclear y el citoplasma, entre la célula y el medio interno y entre el organismo y el medio exterior. En otras palabras, el genoma aporta desde el principio y en forma potencial lo esencial para el desarrollo de un individuo adulto, pero el resultado final depende de sus interacciones con el medio que le rodea directa o indirectamente.

A nivel molecular, el crecimiento y la diferenciación celulares involucran tres tipos de procesos también con mútuas interacciones: la replicación del material genético, el crecimiento como resultado de la actividad metabólica y la diferenciación entre las células que se reproducen. Esta diferenciación ocurre de manera que aún siendo genéticamente idénticas, las células reproducidas difieren en su estructura y en su función, hasta el punto de dar lugar a tejidos que se asocian formando órganos diferentes. Una diferenciación tan ordenada sólo puede ser explicada como el resultado de interacciones entre el genoma y su medio inmediato, que han de ser variables localmente y cambiantes temporalmente y, por consiguiente, regulables en el espacio y en el transcurso del tiempo.

A continuación vamos a considerar primero los mecanismos reguladores de la diferenciación celular a nivel de la transcripción en la cromatina del núcleo, y en segundo lugar algo de lo que se sabe actualmente sobre los mecanismos reguladores que actúan en los niveles postranscripcionales.

2.1. Mecanismos reguladores transcripcionales: Constancia del genoma y cambios de conformación de la cromatina

Las primeras hipótesis para explicar la aparición de células diferentes a partir de un mismo material genético atribuían la diferenciación a variaciones del genoma, consistentes en la pérdida progresiva de determinados genes según una secuencia programada y ordenada en relación con supuestos factores reguladores.

Pero estas hipótesis carecían de base experimental y han resultado invalidadas por no pocos experimentos, algunos tan demostrativos y elegantes como el realizado por Gurdon en 1968. Este investigador logró trasplantar el núcleo de una célula intestinal del renacuajo del Xenopus laevis sudafricano en el interior de un huevo no fecundado de la misma especie, del cual previamente había extraído el núcleo propio; situó el huevo en un medio adecuado y lo estimuló, consiguiendo que se multiplicase y se desarrollara hasta transformarse en un sapo adulto y normal.

Resultó así evidente que el núcleo de una célula diferenciada intestinal conserva íntegramente todo el genoma pluripotencial como si se tratase del núcleo de una célula huevo fecundada, y que basta situarlo en el citoplasma de otra célula huevo para que, bajo la influencia de esta nueva interacción nucleocitoplasmática, se multiplique y reproduzca no únicamente células intestinales sino todos los tejidos y órganos del sapo adulto.

Lo demostrado por el experimento de Gurdon ha sido corroborado por otros experimentos y también por la experiencia común de que basta trasplantar fragmentos de vegetales, constituídos por células diferenciadas, para que uno solo de ellos origine, por sucesivas divisiones mitósicas, un nuevo organismo entero, constituído por todos los tejidos diferentes que lo integran.

Por consiguiente, aunque no es posible demostrarlo siempre y en todos los casos, se puede admitir que todas las células diferenciadas de un organismo pluricelular contienen la misma cantidad de ADN y las mismas secuencias, es decir, el mismo genoma o dotación de genes que el núcleo de la célula huevo o zigoto.

Existen, no obstante, algunas excepciones a tal generalización, por ejemplo, la amplificación de los genes del ARN ribosómico durante el desarrollo de los anfibios o durante la formación del macronúcleo en Tetrahymena. También se pueden aportar ejemplos de excepciones con respecto a la invariabilidad de las secuencias del ADN, dado que se ha observado la reorganización de determinadas secuencias durante la diferenciación de los linfocitos.

Por otra parte, se pueden aducir ejemplos de casos en que ocurren realmente pérdidas parciales del genoma, tales como las descritas en el desarrollo de ciertos insectos dípteros y hemípteros, de manera que al final del desarrollo resultan todas las células somáticas con el mismo cariotipo pero reducido con respecto al del zigoto. Puede darse incluso la pérdida total del genoma, como es bien sabido que ocurre en la diferenciación terminal de los eritrocitos de mamíferos.

Pero aún contando con estas excepciones, es válido el principio general de que la cuantía y las secuencias del ADN nuclear se conservan durante la diferenciación y lo que varía es la conformación de secuencias específicas en los diferentes tipos celulares. Los cambios de conformación de tales secuencias, las de los genes activos en cada tipo de células diferenciadas, son atribuibles a las proteínas asociadas al ADN en el complejo de la cromatina.

Los cambios de conformación de la cromatina como mecanismos de activación de la transcripción han sido investigados recurriendo a la acción de nucleasas sobre los genes activos y han sido interpretados como debidos a la acetilación de histonas y a la intervención de las proteínas HMG. La espermatogénesis ofrece un modelo experimental interesante para estas investigaciones y su interpretación.

2.1.1. *Susceptibilidad al ataque por nucleasas y acetilación de histonas*

El paso de una conformación inactiva a una conformación activa en determinadas regiones de la cromatina puede ponerse de manifiesto por su diferente susceptibilidad al ataque por la desoxirribonucleasa I (DNasa I), ya que esta enzima digiere únicamente las secuencias de ADN activas en la transcripción.

Por ejemplo, el gen de la insulina sólo resulta susceptible al ataque por la DNasa I en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, y no es vulnerable a la digestión por dicha nucleasa en cualquier otra célula del organismo. Sin embargo, como se ha demostrado que el gen de la insulina está presente en todas las demás células del organismo, se ha de admitir que su conformación en ellas ha de ser distinta, de manera que no puede ser atacado por la DNasa I.

La susceptibilidad a la DNasa I no es una simple consecuencia del proceso de transcripción en curso, dado que incluso cuando un gen deja de ser transcrito sigue siendo vulnerable a la nucleasa. Los genes que codifican la síntesis de globina en el adulto se encuentran en conformación activa únicamente en las células de la serie roja del adulto y no en las células embrionarias que sintetizan otros tipos de globina. Los genes que codifican la síntesis de las globinas embrionarias se encuentran en conformación activa, susceptible al ataque por la DNasa I, no sólo en los núcleos de la serie roja embrionaria sino también en las células de la serie roja del adulto donde ya han dejado de transcribirse.

El gen de la ovoalbúmina sólo es vulnerable a la DNasa I en el oviducto de gallina tras la administración de estrógenos y no puede ser destruído en las células de ningún otro tejido por la acción de dicha nucleasa. Cuando dejan de administrarse los estrógenos cesa la transcripción del gen de la ovoalbúmina, pero éste sigue en una conformación activa, es decir, todavía resulta susceptible al ataque de la nucleasa.

La adopción de una conformación activa de los genes es, pues, una condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la transcripción de determinados genes, ya que éstos pueden dejar de ser transcritos según se demuestra en los ejemplos mencionados. La adopción de la conformación activa ocurriría en determinados genes al principio de la diferenciación celular, concomitantemente con la predestinación de los distintos tipos de células.

La composición molecular de las regiones de la cromatina activas en la transcripción ha podido ser investigada por distintos métodos y muy especialmente analizando los productos liberados por la acción de la DNasa I en las condiciones en las que destruye los genes activos. Las histonas liberadas muestran un elevado grado de acetilación, lo que indica que esta modificación resultaría esencial para mantener la conformación activa.

Se ha postulado que la acetilación es un requisito previo para la transcripción y se han demostrado numerosas correlaciones entre la acetilación de las histonas y la actividad de la transcripción. Así, el incremento de la transcripción en los linfocitos va precedido de la acetilación de sus histonas; lo mismo ocurre en la regeneración de las células hepáticas y en múltiples células estimuladas por hormonas. El macronúcleo de Tetrahymena contiene histonas altamente acetiladas y es activo en la transcripción, mientras que en el micronúcleo inactivo las histonas no están acetiladas. La misma correlación se ha observado en otros muchos modelos experimentales y también en experimentos de transcripción «in vitro».

2.1.2. *Intervención de las proteínas HMG*

Otro hecho importante para conseguir la conformación activa sería la presencia de proteínas no histonas, especialmente del grupo denominado de alta movilidad electroforética. Dos proteínas pertenecientes a

este grupo, las denominadas HMG-14 y 17 forman parte de los nucleosomas activos en la transcripción. Dichas proteínas son liberadas tras la digestión de los genes activos por la DNasa I. Es más, se ha demostrado que la presencia de las HMG-14 y 17 en los nucleosomas activos resulta totalmente imprescindible para conferir a tales nucleosomas la susceptibilidad al ataque de la nucleasa. Cuando dichas proteínas son extraídas con ClNa 0,35 M, la DNasa I pierde la capacidad de destruir selectivamente los genes activos y sorprendentemente recupera tal capacidad al añadir de nuevo las HMGs 14 y 17. Esto último indica que alguna característica especial aún desconocida (modificaciones de las histonas, presencia de proteínas no histonas unidas con alta afinidad a las secuencias activas) dirige a las citadas proteínas hacia los nucleosomas activos en la transcripción donde son incorporadas.

Una propiedad interesante de las proteínas no histonas HMG-14 y 17 es su capacidad de abrir la doble cadena de ADN, requisito esencial para que tenga lugar la transcripción.

La doble presencia de histonas acetiladas y de las HMG 14 y 17 en las regiones de la cromatina activas en la transcripción llevó a algunos investigadores a postular que las proteínas HMG podrían inhibir la actividad enzimática que desacetila las histonas y ser responsables de la acetilación de las histonas en los genes activos. Según esta hipótesis, los genes activos poseerían histonas permanentemente acetiladas. No obstante, algunos hechos están en contra de tal suposición.

Mientras el porcentaje de cromatina activa en la transcripción sólo representa alrededor de un 10 % de la cromatina total, la proporción de histonas acetiladas es del orden del 40 %. Sin embargo, sólo un 10 % de los nucleosomas, el mismo porcentaje de nucleosomas activos en la transcripción, se caracteriza por presentar histonas con acetilación inestable, es decir, con un recambio muy rápido de grupos acetilo (vida media de 3 a 7 minutos).

Si el recambio rápido de grupos acetilo en las histonas es una característica de las regiones de la cromatina activas en la transcripción, la inhibición de dicho recambio por bloqueo de la desacetilasa debe interferir la transcripción. Cuando la desacetilasa es inhibida por el butirato queda completamente bloqueada la inducción del gen de la ovoalbúmina y otros genes inducidos por estrógenos en el oviducto de gallina. Al retirar el butirato, la desacetilasa se activa de nuevo resultando posible la inducción de los genes por los estrógenos o la continuación de la transcripción si ya estaba en curso.

2.1.3. *Datos de la espermatogénesis como modelo experimental*

En el modelo experimental de la espermatogénesis, que es el utilizado en las investigaciones de nuestro Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona, las células genéticamente activas muestran un recambio rápido de grupos acetilo en sus histonas. En otros modelos experimentales puede establecerse también una correlación entre el recambio de grupos acetilo y la actividad en la transcripción. Así ocurre, por ejemplo, en el minicromosoma del virus SV-40.

Estos hechos llevaron al Dr. Mezquita a reinvestigar la supuesta relación entre las proteínas no histonas HMG-14 y 17 y la actividad enzimática que desacetila las histonas, y demostró que dichas proteínas no inhiben a la desacetilasa de las histonas y no son responsables, por consiguiente, de su acetilación permanente. Por otra parte, demostró que otra proteína HMG, la ubicuitina o HMG 20, que estaría presente en los genes activos, es capaz de activar a la desacetilasa, facilitando así el recambio de grupos acetilo en dichos genes.

Tratando núcleos con DNasa I en las condiciones en que resultan destruídos los genes activos, obtuvimos desacetilasa de histonas conjuntamente con una serie de proteínas que potencialmente podrían actuar como reguladoras de la actividad enzimática. La desacetilasa y las posibles moléculas reguladoras fueron separadas cromatográficamente obteniéndose una fracción de pequeño peso molecular que contenía un factor termoestable que mostraba la capacidad de activar a la desacetilasa de las histonas «in vitro». Purificamos dicho factor y resultó ser una proteína no histona del grupo de las HMGs, la HMG-20, también conocida con el nombre de ubicuitina.

La ubicuitina, como su nombre indica, está ampliamente distribuída en diversas especies y tejidos y su secuencia se ha conservado a lo largo de la evolución. Se trata de una pequeña proteína globular de peso molecular 8500 y extraordinariamente estable. Se ha demostrado la presencia de dicha proteína en regiones de la cromatina activas en la transcripción. Si la ubicuitina tiene «in vivo» la misma propiedad que nosotros hemos observado «in vitro», es decir, la activación de la desacetilasa de las histonas, la presencia de la ubicuitina en las secuencias activas podría explicar el rápido recambio de grupos acetilos en las histonas de los genes activos.

Mientras la acetilación permanente de las histonas expone al ADN permitiendo tanto las interacciones específicas como las inespecíficas,

un recambio rápido de los grupos acetilo en las histonas de las regiones de la cromatina activas en la transcripción, permitiría que éstas ofrecieran dos conformaciones alternativas, aumentando así las posibilidades de seleccionar las uniones específicas de alta afinidad entre las múltiples interacciones de las secuencias del ADN con las proteínas reguladoras. Se alcanzarían así mayores posibilidades para la intervención de factores reguladores de la afinidad de la ARN polimerasa con las secuencias específicas del ADN.

En el modelo experimental de la espermiogénesis, utilizado en nuestro Laboratorio, la transición desde los espermatocitos, células genéticamente activas, hasta los espermatozoides, células genéticamente inertes, que no sintetizan ARN, se acompaña de una reducción drástica de las proteínas no histonas de la cromatina. Se trata, pues, de un ejemplo de diferenciación celular excepcional, la de las células germinales cuya función final consiste en especializarse no sólo para la síntesis de determinadas proteínas sino principalmente para la protección, conservación y transmisión del mensaje genético. En relación con esta función especial, la cromatina adopta la forma compacta de heterocromatina y simultáneamente con el cese de la transcripción desaparecen todas las proteínas no histonas e incluso las histonas resultan sustituídas por la protamina, lo que confiere mayor estabilidad y protección al ADN portador del mensaje genético.

Fuera de estos cambios extremos propios de la espermiogénesis o diferenciación de las células germinales, en todas las células de los tejidos somáticos existe generalmente una gran variedad de proteínas no histonas que intervienen en el control de la transcripción interaccionando con secuencias reguladoras del ADN. En las células de los distintos tejidos somáticos, la inducción de la actividad transcripcional de un determinado gen se acompaña o guarda relación con variaciones mínimas en la población de proteínas no histonas de la cromatina.

En general, en las células de los distintos tejidos somáticos, el aislamiento y la caracterización de las proteínas no histonas con posible función reguladora resulta difícil, por hallarse en la cromatina a concentraciones inferiores a 10^4 copias por célula. Pero es de esperar que si el perfeccionamiento de estas técnicas y un mejor conocimiento de las modificaciones de las histonas en los genes activos, se combinan con la obtención de tales genes por los procedimientos de la ingeniería genética, se podrán reconstruir modelos «in vitro» que permitan un mejor análisis del control de la transcripción en la cromatina nuclear.

2.2. Mecanismos reguladores postranscripcionales

De lo que acabamos de exponer sobre la importancia de los cambios de conformación del genoma para regular la expresión genética en relación con la diferenciación celular, podría deducirse que esta última viene determinada principalmente por dichos cambios, es decir, que los mecanismos reguladores actúan principalmente a nivel de la transcripción y que la especialización de las diferentes células y tejidos depende de que sean transcritos o no determinados premensajeros. Tal conclusión sería, sin embargo, precipitada, ya que existen datos y argumentos que atribuyen una importancia no menos decisiva a los mecanismos reguladores postranscripcionales.

Davidson y Britten propusieron que muchos genes estructurales serían transcritos en todas las células con independencia de su estado de diferenciación. Sólo los mensajeros más abundantes, presentes a concentraciones del orden de 10^4 copias por célula, tales como los de la globina y la ovoalbúmina, tendrían mecanismos de regulación especiales a nivel de la transcripción. Pero para la mayoría de mensajeros, la transcripción no sería selectiva y deberían existir controles postranscripcionales, concretamente a nivel de la transición de ARN premensajeros a ARN mensajeros maduros. Estos controles resultarían no sólo cuantitativos o reguladores de la cuantía de las proteínas sintetizadas, sino también cualitativos o determinantes del tipo de proteína a sintetizar.

En favor de la teoría de Davidson y Britten cabe aducir algunas observaciones: Los mensajeros embrionarios del erizo de mar no se hallan presentes en los polirribosomas del intestino del erizo adulto pero sí lo están en los núcleos de las células de este tejido. Los mensajeros del cerebro no se encuentran en los polirribosómas de las células renales pero sí en los núcleos de estas células.

Si para una serie de mensajeros la transcripción no es selectiva deberán existir controles postranscripcionales responsables de la especificidad de la expresión genética. La transición del ARN premensajero a mensajero supone la eliminación de una serie de secuencias (intrones) y la reunión de las secuencias restantes (exones). En muchos premensajeros, las secuencias eliminadas son siempre las mismas generándose en consecuencia los mismos mensajeros. En otros casos, las escisiones del premensajero ocurren en puntos variables con lo que se producen distintos mensajeros que comparten secuencias comunes. De esta forma resultaría posible un control cualitativo a nivel postranscripcional.

El sistema que reconoce los puntos de escisión en los distintos pre-

mensajeros debe ser lo suficiente flexible para realizar cortes en secuencias diferentes según los casos. El sistema de reconocimiento estaría constituido por ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño, entre 100 y 300 nucleótidos, que forman complejos con proteínas. Tales complejos interaccionan con secuencias específicas del ARN premensajero y dirigen a los sistemas enzimáticos responsables de la transición premensajero a mensajero.

Por otra parte, las modificaciones que el ARN premensajero experimenta en sus extremos resultan esenciales para el control del transporte y estabilización del mensajero y en consecuencia para la regulación de la cantidad de moléculas disponibles para la traducción. La competencia entre distintos mensajeros por la maquinaria de traducción constituye otro posible mecanismo de regulación de la cantidad de proteína sintetizada.

El polipéptido sintetizado puede no ser el producto final y constituir un precursor de diferentes polipéptidos funcionales. Si las esciciones que dan lugar a estos polipéptidos no ocurren de forma invariable en los mismos enlaces y diferentes células son capaces de originar polipéptidos distintos a partir de un precursor común, tal mecanismo constituye a nivel postraduccional otro interesante eslabón en la cadena de controles responsable del mecanismo de diferenciación celular.

Puede ocurrir en distintos tejidos que sus diferencias en la síntesis de determinadas proteínas no sean sólo cualitativas sino también cuantitativas. Por otra parte, entre las células de un mismo tejido suelen darse, en el transcurso del tiempo, diferencias cuantitativas en la síntesis de determinadas proteínas, como respuesta de adaptación a necesidades variables. En general, las diferencias cuantitativas, bien sean entre células de distintos tejidos o entre células de un mismo tejido, se producen por mecanismos reguladores de la expresión genética que actúan no tanto a nivel de la transcripción sino más bien a niveles postranscripcionales y, por consiguiente, con gran rapidez de respuesta.

Sin embargo, la generalización precedente no excluye la posibilidad de que células diferenciadas o predestinadas para la síntesis de determinadas proteínas presenten diferencias cuantitativas reguladas a nivel de la transcripción, en cuyo caso las respuestas de adaptación serían relativamente lentas o no tan rápidas como las reguladas por los mecanismos que actúan a niveles postranscripcionales. Estos casos de regulación cuantitativa a nivel de la transcripción pueden ser debidos a efectos moduladores de la actividad de la ARN polimerasa.

He pretendido esbozar sólo algunos de los mecanismos moleculares que intervienen en la diferenciación celular de un organismo pluricelular. Si una célula huevo origina células que aún dotadas de un mismo genoma resultan muy diferentes estructural y funcionalmente, hemos de atribuirlo a interacciones entre dicho genoma y el medio que han de ser también muy diferentes en el espacio y en el tiempo. Por estas interacciones reguladoras, cada uno de los tejidos y órganos resultantes ocupan el lugar que les corresponde y desempeñan sus funciones coordinadamente, de manera que el organismo individual se comporta como una unidad funcional.

Mi discurso se ha limitado a la diferenciación de un organismo pluricelular a lo largo del desarrollo ontogénico. Sería salir del tema referirme a otros tipos de diferenciación, tal como el de la diferenciación de las especies a lo largo del desarrollo filogenético. Tampoco cabe en los límites de este discurso referirme a la diferenciación individual, así como a la diferenciación sexual dentro de una misma especie. Pero sin ocuparme de estos temas, he de mencionar que su análisis a nivel molecular nos llevaría a conclusiones similares a las planteadas. Es decir, a nivel biomolecular, la diversidad de los seres vivos ha de ser el resultado de interacciones entre el genoma y las influencias del medio, ya que, en lenguaje terminodinámico, los seres vivos no son sistemas cerrados, existentes en el vacío, sino abiertos y sólo pueden desarrollarse, crecer y reproducirse gracias a un triple flujo de materia, de energía y de información.

Mientras los organismos más simples desarrollan el programa genético de su genoma de manera más o menos rígida, los organismos más complejos, como el humano, se distinguen por una mayor flexibilidad en el desarrollo de su programa genético, con más capacidad de interacción con el medio, que se manifiesta por mayores posibilidades en la percepción de los cambios ambientales y en la elección de respuestas más variables. Es decir, su programa genético se cumple no según un determinismo fatalista sino con una amplia apertura a las influencias variables del medio.

La mayor capacidad de interacción del organismo humano con el medio, sus mejores posibilidades de percibir las variaciones ambientales y de elegir las respuestas más adecuadas, son debidas fundamentalmente al desarrollo alcanzado por el sistema nervioso, que es el sustrato ana-

tomo-funcional donde se integran las actividades de relación con el medio ambiente.

En los niveles más altos del cerebro, las vías neuronales son de inmensa complejidad y en principio cabe imaginar que estas vías proporcionan una explicación adecuada incluso de las labores más complejas y sutiles del hombre. Sin embargo, aunque se lograse identificar todas las respuestas del cerebro como originadas por operaciones de la que podríamos llamar su maquinaria neuronal constituyente, persisten muchos problemas y desde luego no se resuelve ni siquiera llega a plantearse el problema de la neurogénesis o diferenciación de las distintas células nerviosas.

En estos problemas de la neurogénesis, las neuronas se conectan constituyendo no una red al azar sino de una manera muy específica, por las conexiones particulares de las neuronas entre sí y también por el número, la localización y la distribución de los nudos sinápticos correspondientes a cada neurona.

La organización del sistema nervioso en vías topográficamente ordenadas depende de instrucciones genéticas que logran su expresión como marcas moleculares específicas en cada una de las neuronas. Pero para que las instrucciones genéticas, contenidas igualmente en el genoma de todos los núcleos neuronales, resulten expresadas no igualmente en todas las neuronas sino de manera bien distinta y específica, es menester que en cada neurona o grupo de ellas se regule la expresión de determinadas instrucciones genéticas y la simultánea anulación o inhibición de otras. Parece evidente que esta regulación ha de depender de señales químicas o tróficas y existen datos experimentales que lo indican.

En las neuronas, junto a la transmisión de impulsos, se ha desarrollado una capacidad de sensibilidad y reconocimiento químicos, que se manifiesta en todas sus actividades y especialmente en las comunicaciones de las neuronas entre sí. Es importante reconocer que las neuronas están ligadas no sólo por comunicación de impulsos, sino también por transmisiones químicas especiales, como la que se manifiesta por las acciones tróficas.

Mientras algunas señales químicas o tróficas actuarían de una manera fija o irreversible, determinando la organización genérica del sistema nervioso en vías y centros bien definidos, otras señales químicas o tróficas actuarían de manera lábil o reversible dando lugar a variaciones que se manifestarían en los distintos comportamientos individuales, dependientes de las influencias del medio en que se desarrolla cada individuo (reflejos condicionados, memoria, aprendizaje, educación).

Es evidente que el cerebro no es una estructura de acción fija y que especialmente en sus niveles más altos lo esencial es la capacidad de modificación, como se demuestra por el aprendizaje y la memoria. Esto puede manifestarse incluso por cambios microestructurales. Cabe admitir que la actividad sináptica origina tales cambios provocando la síntesis de distintos ARN mensajeros y, en consecuencia, de proteínas diversas que constituyen enzimas y otras moléculas, capaces de originar o explicar las diferencias estructurales y funcionales entre distintas neuronas. En contraste con la idea generalmente aceptada de una estructura estática, hemos de pensar que el cerebro estructuralmente es plástico no ya sólo a nivel molecular sino incluso a nivel microscópico. Mientras algunas sinapsis son maduras, otras están en desarrollo y otras en regresión.

Seguir discurriendo sobre la neurogénesis sería abusivo y si he aludido a ella ha sido sólo para poner punto final a mi discurso, insinuando un ejemplo, el de la diferenciación de las neuronas, que es sin duda el problema más complejo de los planteados por la regulación de la diferenciación celular en general. He dicho.

DISCURSO

de contestación del Académico Numerario

Excmo. Prof. Dr. D. ADOLFO AZOY CASTAÑE

Excelentísimo señor Presidente,
Muy Ilustres señores Académicos,
Señoras y señores:

> «... La virtud de las alas consiste en levantar las cosas pesadas hasta arriba, elevándolas por los aires, hasta donde habita el linaje de los dioses...»
>
> PLATÓN («Fedra»).

La Real Academia de Medicina de Barcelona, en sus doctos y nobles principios, ha querido honrarme ofreciéndome graciosamente el discurso de contestación al reglamentario parlamento del aspirante electo Profesor D. Santiago Vidal Sivilla, otorgándome así las alas que conducen a las alturas de los privilegiados. La grandeza sutil del galardón emociona los más íntimos sentimientos y sería mi más ferviente deseo dedicar en esta solemnidad, junto con el nuevo don ofrecido, un hombre nuevo, como diría Terencio, portador de una bella y definitiva prueba de la más profunda gratitud.

Este acto sublime y único de entronización a la preciada magistratura de Académico, representa una tradición inolvidable de un señorío de calificación máxima, iniciado en el más noble abolengo de las Ciencias, las Letras y las Artes.

Nuestro Académico recipiendario de hoy, Dr. Santiago Vidal Sivilla, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, cuyo extraordinario discurso preceptivo acabamos de oír, es nuestro protagonista en esta fecha memorable.

Nace en 1916 en Talarn (Lérida). Es buen estudiante, disciplinado y metódico, modelado en el orden y la responsabilidad de cualquiera de sus actos. Alcanza el grado de Bachiller con Matrícula de Honor en casi todas las asignaturas. Comienza la Carrera de Medicina en la Universidad Autónoma de Barcelona el año 1933, sus estudios son detenidos por la

guerra civil española y los reanuda al fin de ella. Se licencia en Medicina en la Facultad de Medicina de Barcelona en 1942, obteniendo premio Extraordinario de Licenciatura. Se doctora en Madrid en 1945, con una Tesis inspirada por el Catedrático de Patología Médica Doctor Ferrer Solervicens, cuyo título es «La anestesia de los esplácnicos en el tratamiento de algunas nefropatías médicas. Resultados clínicos y estudio experimental». Con ella exhibe su fondo de gran fisiólogo en potencia.

Santiago Vidal Sivilla trabajó con ahínco y acierto en la Clínica, vertiendo en cada caso clínico su sentido nato de fisiólogo experimentador, a la vez que analizador y razonador deductivo. Como buen seguidor del «Corpus hipocraticum» pasó por el alumnado de Patología interna y fue médico interno y de guardia del Hospital Clínico.

Al mismo tiempo, llevado por su espíritu de servicio a la Universidad y a fin de paliar en lo posible la falta de personal colaborador para cubrir las enseñanzas básicas de Fisiología y Bioquímica en nuestra Facultad de Medicina, aceptó el compromiso de actuar como Profesor Auxiliar de dichas disciplinas, bajo la dirección del recién llegado Catedrático de las mismas Profesor Jiménez Vargas. La colaboración del Dr. Vidal Sivilla en esta labor hubo de prolongarse durante varios años, y por su dedicación a la misma, con estancias en los Institutos de Fisiología de Mainz, Heidelberg y Londres, llegó a adquirir una preparación y un bagaje científico que le llevaron a obtener, en 1957, la Cátedra de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de Cádiz.

Dos años más tarde, en 1959, al trasladarse el Profesor Jiménez Vargas a la Universidad de Navarra, el Profesor Vidal Sivilla pasó a ocupar por concurso la Cátedra de Fisiología y Bioquímica de la Universidad de Barcelona. El acceso a esta Cátedra de nuestra Facultad de Medicina significó para el Dr. Vidal Sivilla no la consecución de una meta apetecible sino el comienzo de una empresa difícil, sin perspectivas de lucimiento y en circunstancias muy poco favorables, por la escasez de medios disponibles, por el crecimiento masivo del alumnado y por la falta de colaboradores preparados.

A pesar de estas dificultades y a lo largo de más de 20 años, el Profesor Vidal Sivilla ha conseguido que el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona cumpla una labor docente digna y eficaz para contribuir a la educación de los futuros médicos y ha promovido el desarrollo de una labor investigadora muy fructífera para la formación de postgraduados. De entre éstos han surgido en el transcurso de estos años tres Catedráticos, dos Agregados y numerosos Profesores Adjuntos y Ayudantes que se han destacado por sus actividades docentes

e investigadoras en Cátedras de Fisiología y Bioquímica de distintas Facultades o en Centros y Laboratorios importantes de Barcelona y otras ciudades.

Además, en el Departamento de Fisiología dirigido por el Profesor Vidal Sivilla se han formado equipos de investigación que se han distinguido por sus publicaciones nacionales y extranjeras sobre distintas áreas de investigación, tales como las de Absorción intestinal, Fisiología del deporte, Hematología, Analítica de lípidos, Enzimología y Proteínas nucleares en relación con la expresión genética.

Este es el hombre, el maestro de fisiólogos y bioquímicos, cuyo ingreso tiene lugar hoy en este venerable anfiteatro.

Para su discurso de ingreso en esta Real Academia, el Profesor Vidal Sivilla ha elegido el tema «Regulación de la expresión genética y diferenciación celular en los organismos eucariotas». En relación con este tema se ha venido investigando desde hace varios años en el Departamento de Fisiología que dirige el Profesor Vidal Sivilla, y se han conseguido notables y originales hallazgos, de resonancia internacional entre los investigadores de este campo. Sus resultados han sido publicados o aceptados en revistas internacionales y especializadas de tanto prestigio como «Nucleic Acids Research» y «The Biochemical Journal».

Podría ser sorprendente que un tema de este tipo, que parece más propio de científicos dedicados a la Genética, a la Embriología o a las Ciencias Morfológicas, sea objeto de investigación y discusión por parte de los fisiólogos. Pero no resulta tan sorprendente si se considera que la Fisiología actual y la del futuro, en un vigoroso y desbordante ímpetu de hallazgos y alcances insospechados, abre ante sí el más amplio y maravilloso horizonte de infinitas posibilidades, al tratar de penetrar en los más íntimos secretos del funcionalismo de los seres vivientes.

En el siglo XVIII, Lázaro Spallanzani, naturalista con agudas dotes de observación y biólogo cuya mente razonadora captaba rápidamente lo más íntimo de la naturaleza de los seres vivos, fue a la vez un fisiólogo sagaz cuyas observaciones y experimentos comportaron predicciones sorprendentes. Spallanzani, maravillado por el vuelo de los murciélagos en lugares oscuros y llenos de obstáculos, comprobó que no chocaban con ninguno y demostró, cegando a los animales, que seguían volando con la misma facilidad. Les consideró por ello como los animales que tienen los ojos en los oídos y predijo, sin saberlo, el descubrimiento de una especie de radar. Los extraordinarios hallazgos de Lázaro Spallanzani debieron causar en su época extrañeza más que comprensión.

En la época actual, con el advenimiento de la Biología molecular y por la utilización de técnicas de investigación cada día más sofisticadas, el estudio de las funciones de los seres vivos ya no se limita al nivel de órganos y aparatos, como en los tiempos de Claude Bernard, ni siquiera al de los orgánulos subcelulares, objeto de la Fisiología celular, sino que profundiza mucho más y trata de describir e interpretar las funciones como resultado de la integración de cambios en las estructuras y propiedades de los componentes moleculares, es decir, llega al nivel de la Fisiología molecular.

A este nivel, la regulación de las funciones depende de cambios en los componentes moleculares de las estructuras celulares que pueden afectar a la membrana celular, alterando sus propiedades de permeabilidad y de transporte, a las reacciones metabólicas del citoplasma y de los orgánulos subcelulares y a los procesos dinámicos del núcleo y de la membrana nuclear.

En su discurso, el Profesor Vidal Sivilla se ha ocupado de los cambios moleculares que pueden ocurrir en el proceso de la expresión genética y ha subrayado que ésta alcanza su mayor complejidad en las células eucariotas. En los núcleos de las distintas células eucariotas de un mismo organismo pluricelular, aún con genomas idénticos, la transcripción del ADN se produce no igualmente sino con particularidades que explican la diferenciación celular. Incluso en un mismo tipo de células, la transcripción del ADN puede variar por diversas circunstancias y bajo la influencia de determinados cambios o agentes reguladores que actúan a nivel de la cromatina nuclear.

Además, la transcripción del ADN generalmente no da lugar a la formación directa de los ARN mensajeros sino a la de ARN premensajeros, que en el mismo núcleo pueden ser destruídos o bien transformados en los ARN mensajeros auténticos o maduros, capaces de atravesar la membrana nuclear. Tanto la destrucción como la transformación de los ARN premensajeros pueden contribuir a la diferenciación celular y ocurren también en grado variable, según las circunstancias y por la influencia de diversos cambios o agentes reguladores.

Por otra parte, el paso de los ARN mensajeros desde el núcleo al citoplasma, a través de la membrana nuclear, y su llegada a los polirribosomas para dar lugar a la síntesis de proteínas, son fenómenos que tampoco ocurren de manera fija e irreversible, sino que pueden variar por la interferencia de diversos cambios o factores reguladores, unos capaces de actuar a nivel de la membrana nuclear, alterando su permeabilidad y el transporte de los ARN mensajeros, y otros a nivel del citoplas-

ma pudiendo destruir los ARN mensajeros o evitar su incorporación a los polirribosomas.

Los agentes reguladores capaces de actuar a tan distintos niveles pueden consistir en cambios iónicos, en pequeñas variaciones de concentración de diversas sustancias o en la llegada de efectores específicos de origen hormonal o nervioso. En todo caso, lo interesante desde el punto de vista fisiológico es que tales cambios o agentes reguladores son capaces de provocar variaciones en la síntesis de determinadas proteínas y que estas respuestas pueden ser muy rápidas, del orden de segundos o incluso fracciones de segundo.

El Profesor Vidal Sivilla ha expuesto también la trascendencia de la regulación de la expresión genética en relación con los procesos de diferenciación celular. El genoma de las diversas células de un mismo organismo es idéntico, pero se manifiesta de manera diferente en los distintos tipos celulares, por cambios de conformación en la cromatina (mecanismos transcripcionales) o por variaciones en la transición de los ARN premensajeros a mensajeros maduros en el núcleo (mecanismo postranscripcional principal o mejor conocido). Estos cambios y la consiguiente diferenciación celular pueden ser fijos e irreversibles o bien reversibles y más o menos lábiles.

En su discurso, el Profesor Vidal Sivilla no ha querido referirse a la expresión de los genes desde el punto de vista de la Genética clásica, que estudia la transmisión de los caracteres hereditarios, ni ha enfocado la diferenciación celular en el sentido de la Morfogénesis, que sería el objeto de la Embriología clásica. Lo que ha pretendido es demostrar el valor fisiológico de la regulación de la expresión genética para el control de múltiples funciones celulares que contribuyen a la homeostasis del organismo y a su comportamiento como unidad funcional. Por otra parte, ha tratado de explicar cómo actúa la regulación de la expresión genética en los procesos de la diferenciación celular.

En esta ceremonia, dedicada a la Fisiología y a la recepción de un nuevo académico de esta disciplina, no puedo dejar de rememorar, como lo ha hecho también el Profesor Vidal Sivilla, el nombre y la figura estelar de un gran fisiólogo, D. Augusto Pi y Sunyer, que como Ilustre Catedrático de nuestra Facultad y Excelentísimo señor Presidente de esta Real Academia de Medicina nos legó un recuerdo perpetuo e imborrable.

Augusto Pi i Sunyer fue entre nosotros el verdadero promotor y el primer impulsor de la Fisiología moderna. Con su aguda visión prospectiva, propia de una mente privilegiada, con su decidida vocación científ-

fica y con su capacidad y aptitudes extraordinarias de maestro y conductor de investigadores, supo formar una admirable escuela de discípulos y colaboradores, como Bellido, Cervera, Carrasco, Agustí, Puche, Raventós y yo mismo, que en su luminosa Cátedra comencé mis trabajos experimentales sobre motricidad, equilibrio y orientación espacial, todavía vigentes.

Augusto Pi i Sunyer fue siempre un soñador del bien, perceptor de las esencias del alma humana y rígido investigador de la más pura Fisiología. Como hombre catalán, médico, universitario, maestro y académico marcó senderos imborrables y fue un fecundo sembrador de ideales, dejándonos un recuerdo perpetuo de valor incalculable, en el que se expresa su figura definitiva y la huella indeleble de una época estelar en el desarrollo entre nosotros de unas disciplinas tan fundamentales como la Fisiología y la Bioquímica.

Santiago Vidal Sivilla sigue la estela y en su afán de servicio a la Universidad emprende la difícil misión de docente, investigador y formador de maestros en estas complejas y valiosas disciplinas de la Medicina. Con su voluntad, su constancia y su rigor de trabajo, cumple la tarea emprendida sin dejarse desanimar por las dificultades y recibe ahora merecidamente el lauro al que todos aspiramos como máximo galardón de nuestra vida científica y profesional.

Por ello y dados los méritos científicos y las cualidades personales que concurren en el Profesor D. Santiago Vidal Sivilla, me cabe la satisfacción de solicitar al Excelentísimo señor Presidente de esta Real Academia, se sirva entregarle el Diploma y la Medalla de Académico Numerario, representativos del título al que se ha hecho merecedor.

> «... Debemos elevarnos con las alas del amor, de la belleza de los cuerpos y la del alma, y ascender cada vez más arriba, hasta que percibamos la eterna y suprema Belleza, que no es sino el resplandor luminoso del Bien...»
>
> PLATÓN («La República»)

He dicho.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIO 7

1. **REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN GENERAL** . 13

1.1. Regulación de la transcripción en la cromatina nuclear . . 16
1.2. Regulación en la transición de los ARN premensajeros a mensajeros maduros 19
1.3. Regulación a nivel de la membrana nuclear, en el transporte de los ARN mensajeros maduros del núcleo al citoplasma . . 20
1.4. Regulación a nivel del citoplasma, por los equilibrios entre los ARN estables, los libres y los unidos a los polirribosomas . . 20
1.5. Características de la regulación con respecto al tiempo y al medio ambiental 21
1.6. Intervención de los agentes hormonales y nerviosos 22

2. **REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN RELACION CON LA DIFERENCIACION CELULAR** 24

2.1. Mecanismos reguladores transcripcionales: Constancia del genoma y cambios de conformación de la cromatina 25

2.1.1. Susceptibilidad al ataque por nucleasa y acetilación de histonas 27
2.1.2. Intervención de las proteínas HMG 28
2.1.3. Datos de la espermatogénesis como modelo experimental . 30

2.2. Mecanismos reguladores postranscripcionales 32

DISCURSO DE CONTESTACION DEL EXCMO. Prof. Dr. D .ADOLFO AZOY CASTAÑE 37