

49
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

EL PAPEL QUE DESEMPEÑAN LAS HISTONAS
DENTRO DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR
(REVISION BIBLIOGRAFICA)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ELIZABETH ROJAS RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Q. F. I. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I	INTRODUCCION	1
	1 OBJETIVO	9
II	TEORIAS ACERCA DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR	10
	1 TEORIA DE LOS RADICALES LIBRES	11
	2 TEORIA DE LA ACUMULACION DE PRODUCTOS - DE DESECHO	13
	3 TEORIA DEL ERROR CATASTROFICO	16
	4 TEORIA DEL MENSAJE REDUNDANTE	17
	5 TEORIA DE LOS GENES SUICIDAS	17
	A <u>Clasificación de las células según su diferencia-- ción en cuatro categorías principales</u>	18
	6 TEORIA DEL RECAMBIO PROTEICO	19
	7 TEORIA SOBRE LA PARTICIPACION DE LAS -- HISTONAS EN EL ENVEJECIMIENTO CELULAR	20
III	GENERALIDADES SOBRE LAS HISTONAS	23
	1 ESTRUCTURA	24
	A <u>La Histona H4</u>	25
	B <u>La Histona H3</u>	27
	C <u>La Histona H2B</u>	27
	D <u>La Histona H2A</u>	29
	E <u>La Histona H1</u>	29
	2 FUNCIÓN Y LOCALIZACION	35
	3 BIOSINTESIS	41
	4 INTERCAMBIO	49
	5 RECAMBIO	50
	6 PROCESOS POSTSINTETICOS	52
	A <u>Acetilación</u>	53
	B <u>Fosforilación</u>	60
	C <u>Metilación</u>	66
IV	EL PAPEL QUE DESEMPEÑAN LAS HISTONAS DEN-- TRO DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR	68
	1 DISMINUCION EN LA FRACCION DE LA HISTO-- NA H1 RELACIONADA CON LA EDAD EN CULTI-- VOS DE FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS	71
	2 ACUMULACION DE LA HISTONA H1° EN CELU-- LAS TRANSFORMADAS INDUCIDAS QUIMICAMEN-- TE A ENTRAR A UN ESTADO DIFERENCIADO Y PERDIDA DE H1 EN CELULAS BLOQUEADAS QUI-- MICAMENTE EN FASE S POR DROGAS	73
	3 DISMINUCION EN EL CONTENIDO DE LA HISTO-- NA H1 EN ANFIBIOS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE GENES ESPECIFICOS	78
	4 LA HISTONA H5 Y SU CAPACIDAD DE REPRE-- SION GENICA EN CELULAS ERITROIDES DE A-- VES	80

5	CAMBIOS EN LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 RELACIONADO CON LA EDAD EN DIFERENTES TE JIDOS DE RATON	82
A	<u>Incremento en la fracción de la histo- na H1° en función de la edad en cerebro de ratón</u>	82
B	<u>Niveles de la histona H1 y de H1° de-- pendientes de la edad en el hígado de ratón</u>	82
C	<u>Cambios en la cantidad de la histona H1° en glándulas de ratón</u>	85
D	<u>Incremento en la subfracción de la his- tona H1° relacionado con la edad en el bazo de ratón</u>	85
E	<u>Niveles de la histona H1 y de H1° en - corazón de ratón y su relación con la edad</u>	86
F	<u>Niveles de las subfracciones de la his- tona H1 en pulmón de ratón</u>	86
6	CAMBIOS DEPENDIENTES DE LA EDAD EN LOS - NIVELES DE HISTONAS PROVENIENTES DE DIFE- RENTES TEJIDOS DE RATA	86
A	<u>Acumulación de la histona H1° sobre la cromatina durante el desarrollo de hí- gado de rata</u>	86
B	<u>Cambios relacionados con la edad en el patrón de la histona H1° de la cromati- na de bazo de rata</u>	90
C	<u>Acumulación de la histona H1° en pán-- creas de rata</u>	90
D	<u>Acumulación de la histona H1° en nú-- cleos de células completamente diferen- ciadas de miocardio de rata</u>	90
E	<u>Variación en los niveles de la histona H1° en células de cerebro de rata en - desarrollo</u>	91
7	CAMBIOS EN LAS FRACCIONES DE HISTONAS DU- RANTE LA ONTOGENIA BOVINA	92
8	DISTRIBUCION CUANTITATIVA DE LAS FRACCIO- NES DE HISTONAS EN PLANTAS	93
V	DISCUSION	95
VI	CONCLUSIONES	101
VII	BIBLIOGRAFIA	103

I INTRODUCCION

A pesar de vivir en un medio ambiente favorable e incluso -- aunque se hagan los esfuerzos máximos para mantenerlos vivos, todos los seres humanos mueren. Alteraciones progresivas e irreversibles, que ocurren en todas las células, al final producen el -- cambio definitivo de la vida a la muerte. Este paso progresivo de un estado funcional a un estado de desorganización total. en que cesa toda función, no sólo es característico de los seres humanos y de los animales sino de todos los organismos y el momento próximo a este estado es denominado envejecimiento (44).

El envejecimiento se considera como el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos (31).

El envejecimiento humano es un proceso biológico de desarrollo continuo que se inicia con la concepción y termina con la --- muerte (31).

El envejecimiento celular también se define como el incremento gradual de la incapacidad de la célula a mantener la homeostasis (62).

El proceso de envejecimiento -según Wright y Davison- es un complejo conjunto de mecanismos interactivos que progresan en varios niveles: subcelular (genes, ADN, ribosomas), celular (fenómenos de membrana, comunicación intercelular) y extracelular (medio ambiente, desarrollo) (100).

La probabilidad para el ataque por enfermedades intrínsecas aumenta enormemente conforme se envejece. El envejecimiento está asociado con un conjunto de patologías, y una de sus características remarcables es el principio de la sincronización de esos cam-

bios deletéreos en diversos tejidos y órganos. El envejecimiento altera la estructura del tejido conectivo y reduce la resistencia y la elasticidad de las arterias y venas, que en su momento resulta en una enfermedad cardio vascular o cerebrovascular. Está asociado con defectos en los niveles de hormonas, originando, por ejemplo, la diabetes. Afecta la percepción sensitiva, particularmente el oído y la vista. Reduce la memoria y la capacidad intelectual, extendiéndose algunas veces hasta la demencia senil. El funcionamiento eficiente de los riñones y de otros órganos, se daña progresivamente. Los huesos resultan frágiles y son mucho más fáciles de romper que en los adultos jóvenes. Las enfermedades autoinmunes resultan más comunes y contribuyen en muchas ocasiones en la incidencia de varios tipos de carcinoma. Las características más familiares del envejecimiento incluyen el arrugamiento de la piel, pérdida del pigmento del cabello y de folículos del mismo, cambios en la postura y desgaste muscular, que hace más difícil la coordinación del movimiento activo. En general, las modificaciones que ocurren durante el envejecimiento, se caracterizan por una tendencia general a la atrofia y disminución de la eficacia funcional de órganos y tejidos (45,74).

Los procesos de atrofia del envejecimiento se caracterizan principalmente por reducción del número de células, que además se alteran desde el punto de vista cualitativo y se distribuyen en forma irregular en los tejidos. Estas alteraciones son muy importantes en tejidos con células perennes, como el sistema nervioso, y por ello es improbable que se regenere después de su destrucción (74). Se han realizado cuentas celulares en corteza cerebral

humana dónde se ha notado una marcada disminución del número de células con la edad, habiéndose determinado alrededor de 2,500 a 3,800 células/unidad de área en el nacimiento y sólo de 864 a --- 1,382 células/unidad de área en el adulto (84). En tejidos constituidos por células no perennes, es decir capaces de regenerarse, se ha observado cierta disminución del recambio celular, debido a procesos degenerativos (74).

A nivel celular, el envejecimiento se caracteriza por una -- disminución en la velocidad de síntesis del ADN, por una lentitud en las mitosis, hasta que cesa toda división, originando células en reposo. Macieira-Coelho y Azzarone, opinan que la lentitud en las mitosis es más bien un retraso para iniciar la división celular que posiblemente se deba a un declive en la vía de recuperación de las purinas, dejando la síntesis de novo como la fuente principal de precursores de ADN y provocando que la entrada a la fase S se dificulte (24,61,55).

Las principales alteraciones que ocurren durante el envejecimiento celular se resumen en el cuadro I (72,74).

Debido a la alta complejidad de los cambios que ocurren durante el envejecimiento está claro que este proceso no puede deberse a un sólo factor. Las intrincadas interacciones entre las células, los órganos, componentes subcelulares, sistemas y factores desarrollo/ambientales no pueden ser entendidos en términos de un modelo de desarticulación simplista. Sin embargo, es improbable analizar racionalmente el proceso de envejecimiento en todos los niveles de complejidad y organización de un organismo (97 y 98).

ENVEJECIMIENTO CELULAR

Citoplasma celular: reducción del contenido hídrico
Mitocondrias: irregularidad de forma y volumen
disminución de adenina y piridinucleótidos
fosforilación oxidativa y desfosforilación menos eficaces
presencia de enlaces intermoleculares en el ADNmt
Aparato de Golgi: fragmentación
Ergastoplasma: cromatólisis
Lisomas: acumulación de lipofucsina
Membrana celular: modificaciones en la permeabilidad
alteraciones de los intercambios nutricionales
Núcleo: cambios en forma y volumen
inclusiones, vesículas, condensación de la cromatina
ADN: puentes de hidrógeno inter e intramoleculares
rigidez de la molécula del ADN
disminución de la síntesis de proteínas y enzimas
predominio de los procesos catabólicos
Recambio del ADN: más lento, con reducción de mitosis

Cuadro I

Definitivamente existen factores que influyen en el envejecimiento: herencia, raza, medio ambiente (por mencionar algunos) no existiendo aún una hipótesis aceptada de modo general, que explique los procesos fundamentales que intervienen en el envejecimiento. Sin embargo, cualquiera que sea la causa o causas, del envejecimiento, éstas deben encontrarse a nivel molecular, provocando cambios celulares que posiblemente produzcan la degeneración de un tejido o de un órgano. Entonces el objetivo de los estudios sobre el mecanismo de envejecimiento celular, no es el de prolongar la duración de la vida retardando el proceso de envejecimiento, sino prevenir (en el caso humano) el conjunto innumerable de enfermedades que debilitan al organismo conforme avanza la edad (31,45).

Es fácil apreciar la compleja índole de dicho proceso sin -- considerar las múltiples y diversas teorías propuestas para explicar este fenómeno. Como se mencionó antes, mucho gerontólogos consideran improbable que una simple teoría pueda explicar todos los aspectos del envejecimiento. Por lo tanto, dicho proceso debe ser visto como un fenómeno altamente complejo que puede requerir mecanismos explicativos diferentes para los distintos aspectos del -- proceso, es decir, el envejecimiento es el resultado de mecanismos múltiples e interdependientes (31,62).

Los estudios relacionados con el envejecimiento de la cromatina y del ADN han tenido mucho interés en años recientes. Los -- trabajos individuales describen solamente pocos de los muchos cambios que sufre la cromatina. Se sabe que las proteínas, más que -- el ADN de la cromatina muestran especificidad de tejido y cambios

con el desarrollo. De ahí, que una de las teorías que intenta explicar el proceso de envejecimiento celular, se base en las modificaciones de tipo estructural y de concentración celular, que sufren con la edad, cierto tipo de proteínas nucleares, las llamadas histonas. Las histonas se encuentran íntimamente unidas al ADN conformando la unidad repetitiva de la superestructura de éste llamada nucleosoma. Sin embargo, no todas las histonas conocidas hasta la actualidad guardan una relación directa con el envejecimiento celular. Entre las más comunes (H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5), las histonas que se localizan en la región del linker de la cromatina, H1 y H5, la segunda exclusiva de aves, son las que poseen los resultados más consistentes respecto a una relación con el envejecimiento. Una subfracción de la histona H1, H1⁰, ha mostrado estar aún más relacionada con la senescencia que la misma H1 (66,4,87).

El incremento de H1⁰ es mucho más evidente durante el desarrollo y es específico de cada tejido. El incremento en la concentración de H1⁰ en ciertos tipos de células se relaciona generalmente con un decremento en la subfracción H1B. La substitución -- bien conocida de la histona H1 por H5 en eritrocitos de aves tiene un efecto inhibitorio fuerte, hace la cromatina de los eritrocitos completamente inactiva y condensada. La histona H1⁰ inhibe solamente un número limitado de funciones celulares y principalmente la capacidad de las células para dividirse (pero no previene el proceso de poliploidización ó condición en la que existe un múltiplo exacto del estado haploide). La histona H5 está presente en la cromatina de eritrocitos de aves y algunos peces que tienen

aumentada la longitud repetitiva del ADN. Tanto H1° como H5 son muy semejantes en su dominio globular central y tienen partes con secuencias aminoácidas idénticas. Pero son diferentes en la composición de sus extremos que flanquean el dominio central. En general, el patrón de las histonas H1° y H1B parece ser el único componente variable con la edad. Las modificaciones postsintéticas de las histonas durante el envejecimiento son más complejas e incluyen a la mayoría de las histonas del 'core'. Las modificaciones postsintéticas de las histonas (fosforilación, acetilación, metilación, etc.) están cercanamente relacionadas con la modulación de la estructura de la cromatina y con los procesos de activación y de represión génica (66,97).

Lezhava, opina que la heterocromatización es un factor clave en el envejecimiento. Se sabe que la heterocromatización es el aumento de la concentración de proteínas nucleares con respecto al ADN en la cromatina, sobre todo de histonas. Este aumento se observa durante el envejecimiento y dificulta físicamente el acceso al ADN por enzimas reparadoras, originando un número elevado de células con mutaciones, que dependiendo del sitio donde ocurran pueden provocar aberraciones cromosómicas. Por lo tanto, resultan de importancia para la disminución de la función dependiente de la edad, los cambios en las estructuras de las nucleoproteínas -- que constituyen el aparato génico. Además, la condensación estructural de los cromosomas está íntimamente relacionada con una heterogeneidad funcional: las regiones densamente condensadas (heterocromatina) son genética y relativamente inactivas (tienen replicación tardía y no tienen transcripción), mientras que las re--

giones relajadas (eucromatina) desarrollan una función activa. --
Los precursores de ARN y ADN se incorporan rápidamente dentro de
estas regiones. Entonces, la heterocromatización es progresiva --
(59).

A nivel celular la muerte no es simplemente una negación re-
pentina de la vida: se anuncia por adelantado a través de impor-
tantes cambios que modifican el funcionamiento de las células. Di-
cho de otra manera, hay un periodo de la vida en que aparecen ---
transformaciones, que conllevan inevitablemente, a la corta o a -
la larga, a la muerte celular. Se trata de la senescencia. Por o-
posición al envejecimiento, transcurso del tiempo sin referencia
precisa a la muerte, la senescencia se puede definir como la últi-
ma fase de la vida en cuyo curso aparecen series de acontecimien-
tos normalmente irreversibles que conducen a la degeneración celu-
lar y a la muerte (69).

Por lo tanto, la muerte celular es un fenómeno muy extenso, -
no sólo provoca la degeneración de tejidos y órganos completos
después de envejecer y durante la senescencia, sino también inter-
viene en la morfogénesis de animales y vegetales, anfibios e in-
sectos, ocurriendo de manera masiva y coordinada. Es entonces, la
muerte celular, un evento esencial en la formación y funcionamien-
to de los organismos multicelulares (7).

1 OBJETIVO

Difundir los conocimientos más recientes sobre la relación -
que existe entre las histonas y el envejecimiento celular.

II TEORIAS ACERCA DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR

Existen varias teorías que tratan de explicar el proceso de envejecimiento celular, ya sean de error o de inestabilidad homeostática general. En forma breve se explicarán las más relevantes.

1 TEORIA DE LOS RADICALES LIBRES

Esta teoría como factor desencadenante del envejecimiento fisiológico está en línea coherente con los conocimientos actuales, dentro de la programación genética de la duración de la vida limitada por la toxicidad de los radicales libres.

Los radicales libres son compuestos químicos de génesis plural, ya que se originan tanto a nivel celular, resultado de la respiración aerobia, como por la acción directa o inducida por la contaminación del entorno (medio ambiente, alimentación, radiaciones); con una gran capacidad de reacción y alto poder oxidativo; con éste último actúan interfiriendo con el funcionamiento metabólico, además de ser responsables de la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos componentes de las membranas biológicas (Fig. 1). De esta manera desorganizan las membranas celulares y sus organelos, acumulan lipopigmentos, principalmente en cerebro y corazón, incrementan el establecimiento de puentes anormales (cross-links) de macromoléculas (colágena y elastina), generan la fibrosis arteriolo-capilar y degradan los mucopolisacáridos. Todos estos procesos de disminución funcional se van compensando por las sucesivas divisiones celulares, pero hay que recordar la lentitud de las últimas mitosis dentro del específico programa genético; en la célula postmitótica, la acción de -

MITOCONDRIA

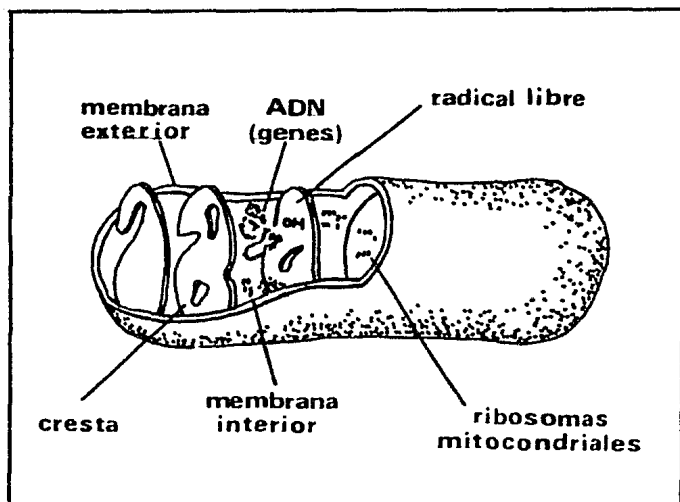


Fig. 1 La degeneración mitocondrial probablemente tiene un papel en el envejecimiento de los animales y del hombre, causada por la inactivación de su ADN -- por los productos nocivos (radicales libres y peróxidos de lípidos) que se originan durante la producción de energía por medio de la respiración celular (69).

los radicales libres sería acumulativa, sobreviniendo la muerte - por incapacidad funcional total. La lesión inicial, producida por los radicales libres probablemente tiene lugar en el ADN (genes) de las mitocondrias, con lo cual estos organelos pierden la capacidad de multiplicarse y con ello la capacidad de regeneración;-- los genes de las mitocondrias están situados en la proximidad de las membranas donde se liberan radicales libres durante la respiración mitocondrial, es muy probable que el ADN de este organelo sea la estructura más vulnerable de todas las de la célula y de inicio al proceso de envejecimiento (Fig. 2) (31,69).

Numerosos estudios de gerontólogos de Estados Unidos, Francia, Suecia y U.R.S.S. demuestran que antioxidantes como los indicados en la Fig. 3 aumentan la longevidad de los animales de laboratorio, lo que vendría a apoyar la teoría de los radicales libres (69).

2 TEORIA DE LA ACUMULACION DE PRODUCTOS DE DESECHO

Considera que el acopio de determinadas sustancias, como la lipofucsina, es perjudicial para las células ya que entorpecen la función intracelular. Concominadamente se pueden presentar incrustaciones celulares de sustancias que no pueden ser degradadas permaneciendo indefinidamente dentro de la célula. Ambos procesos ocurren en las células de algunos órganos, como el hígado, corazón y cerebro, al parecer debidos a la peroxidación lipídica que sufre el Aparato de Golgi por presiones del medio ambiente. Como es sabido, este organelo celular está encargado de producir -entre otras cosas- lisosomas, vesículas membranosas encargadas -

**ESQUEMA QUE INDICA LOS TRANSTORNOS —
PRODUCIDOS POR EXPOSICION A RADICALES LIBRES**

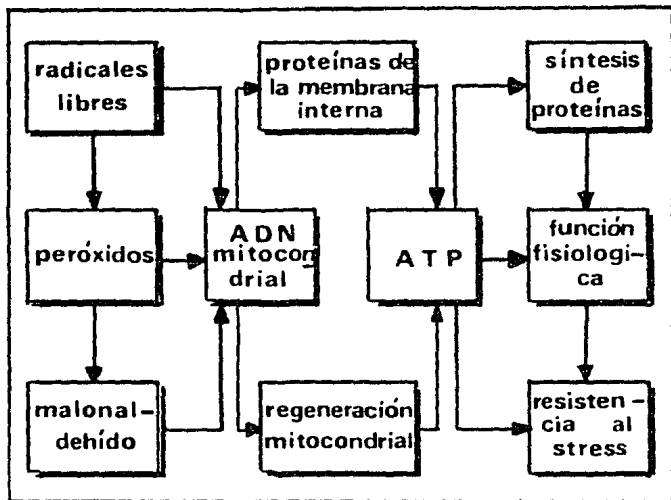


Fig. 2 La desorganización del ADN mitocondrial debida al ataque de los radicales libres (y de sus productos, los peróxidos y el malonaldehído) puede explicar las manifestaciones del envejecimiento normal del hombre y de los animales. Puesto que la integridad del ADN o del genoma de la mitocondria es esencial para la regeneración de este organelo, la lesión mitocondrial, por fuerza, ha de desencadenar una cascada de alteraciones que dan lugar a la disminución de las funciones fisiológicas y pérdida de la resistencia al stress, que son las manifestaciones más evidentes del envejecimiento (69).

FARMACOS PRODUCTORES DE LONGEVIDAD

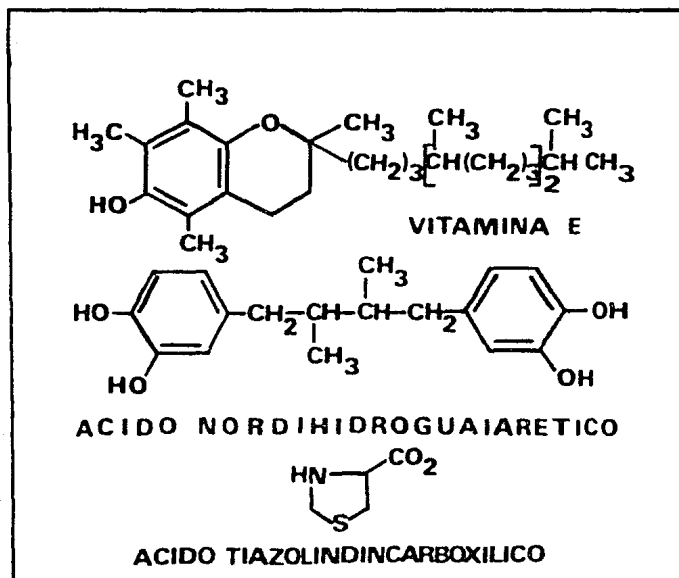


Fig. 3 La teoría según la cual el envejecimiento celular tiene su origen en los efectos nocivos de la oxidación mitocondrial está de acuerdo con los resultados de los experimentos en animales tratados con antioxidantes que neutralizan los efectos de los radicales libres. Un número creciente de estudios demuestran que se pueden conseguir aumentos marcados en la duración de la vida de los animales de laboratorio, mediante el tratamiento con antioxidantes tales como los indicados en el esquema. Sin embargo, hacen falta más investigaciones antes de que estos fármacos se puedan recomendar para uso humano (69).

de segregar enzimas hidrolíticas para destruir los productos celulares de desecho. Entonces el envejecimiento sería consecuencia de la acumulación de presión del medio ambiente, del agotamiento por la acumulación de subproductos de las reacciones químicas vitales y de los residuos metabólicos e incrustaciones externas, que inutilizarían los mecanismos de las células (31,74).

3 TEORIA DEL ERROR CATASTROFICO

El tiempo de vida de los organismos se considera generalmente que está bajo control genético. Los cambios en el aparato genético y en la síntesis de proteínas, además podría constituir uno de los mecanismos del proceso de envejecimiento. Muchas teorías de envejecimiento hacen predicciones específicas concernientes a la síntesis de proteínas durante el envejecimiento. Una de estas teorías se denomina del error catastrófico, que predice errores en la transmisión de información del ADN a ARN y a proteínas, resultando en la producción de proteínas alteradas en la célula. -- Los errores en la síntesis de proteínas pueden guiar a una acumulación anormal de proteínas celulares. Si tales moléculas defectuosas resultan parte del organismo sintético protéico de la célula, la producción de otras proteínas aberrantes podría estar acelerada autocatalíticamente, guiando a una catástrofe. El envejecimiento y la muerte eventual de un organismo puede sobrevenir; un incremento exponencial en la frecuencia de errores es inevitable y un estado estable de la frecuencia de errores puede alcanzarse durante el envejecimiento celular. Además se considera a la célula incapaz de corregir estas fallas, dando lugar a una acumula---

ción al azar de moléculas anormales dando como resultado la muerte celular (31,51,62).

4 TEORIA DEL MENSAJE REDUNDANTE

Como se sabe, sólo el 0.4% de la información del ADN es utilizada por las células en su periodo vital; también muchos de los genes están repetidos en secuencias idénticas, por lo que el mensaje resulta redundante. La teoría se basa en que las secuencias repetidas estarían normalmente reprimidas, pero que en el momento que un gen activo fuese dañado sería reemplazado por un gen idéntico de reserva; por lo que la redundancia del ADN podría proporcionar un mecanismo protector frente a la vulnerabilidad del sistema, causada por accidentes moleculares, y así, por medio de este mecanismo se prolongaría el tiempo de supervivencia al evitar la acumulación de errores, suficientes para alterar el mensaje genético. Sin embargo, al final todos los genes repetidos serían utilizados, los errores se acumularían y las deficiencias fisiológicas del envejecimiento comenzarían a aparecer (66,62,31).

5 TEORIA DE LOS GENES SUICIDAS

Propone que los cambios producidos por la edad son simplemente una continuación de las señales genéticas normales que regulan el desarrollo de un ser viviente desde el momento de la concepción a la madurez sexual y lo que sucede luego es irrelevante para la supervivencia de la especie. Supone incluso la existencia de 'genes del envejecimiento' que frenarían o detendrían vías bioquímicas de forma secuencial y conducirían a una expresión prográ

mada de los cambios propios del envejecimiento. Por lo tanto el envejecimiento sería consecuencia de la diferenciación, sugiriendo que todas las células poseen una longevidad programada que varía de acuerdo a la longevidad de la especie pero puede modificarse por factores extrínsecos (31,29).

A Clasificación de las células según su diferenciación en cuatro categorías principales:

- a) Células relativamente indiferenciadas destinadas a producir una progenie similar, como las células basales de la epidermis, los espermatozonios y las células primordiales de la sangre.
- b) La segunda categoría deriva de la anterior y exhibe una diferenciación celular creciente, pero sus integrantes todavía son capaces de sufrir división celular hasta que llegan a una etapa terminal de su desarrollo.
- c) La tercera categoría está constituida por células muy diferenciadas como las del hígado, riñón, tiroides (estas células rara vez se dividen, pero conservan su potencial para multiplicarse en caso necesario).
- d) Por último están las células postmitóticas fijas, como las del encéfalo, estas células son las más especializadas de todas y parecen no poder dividirse en circunstancias normales (31).

Los gerontólogos están de acuerdo con el hecho de que los cambios más importantes que ocurren con la edad tienen lugar en las células altamente especializadas y no en las células que experimentan rápidas divisiones. Sin embargo, el mecanismo que limita la división celular en las células que proliferan rápidamente es probablemente el mismo que limita la capacidad funcional de las

células especializadas, que se dividen más lentamente o que no experimentan división. Por lo tanto, puede existir información en el mensaje genético para morir (31,62).

La muerte celular es un evento esencial para la formación y funcionamiento de los organismos multicelulares. Las diferentes formas de muerte celular están acompañadas de una degradación enzimática del ADN nuclear. En muchos casos esta degradación del material genético ocurre en células morfológicamente intactas y no es consecuencia de la activación de enzimas hidrolíticas en células muertas. La causa es la programación genética cuya realización provoca una degradación irreversible del ADN y la muerte celular. Puede suceder en las primeras etapas de la evolución de los eucariotes multicelulares cuando la viabilidad de un organismo resulta ser dependiente del funcionamiento normal de sus células. El propósito inicial de este programa genético es el de eliminar las células dañadas que parecen perjudiciales para todo el organismo (7,90).

El mecanismo por el cual pueden entrar en acción estos 'genes suicidas' que dan lugar a la pérdida del potencial proliferativo en células animales normales puede consistir en la expresión de un nuevo gen o en un cambio en la expresión de un producto génico que debe estar involucrado en la regulación del ciclo celular. Esta suposición es producto de estudios de hibridización celular (24).

6 TEORIA DEL RECAMBIO PROTEICO

Se sabe que las proteínas experimentan un recambio metabóli-

co en el que una velocidad relativamente elevada de síntesis es -
contrarrestada por una velocidad también relativamente elevada de
degradación de una manera exacta, por lo que las proteínas se ha-
llan en un estado estacionario dinámico. Se cree que el envejeci-
miento celular sería la consecuencia de la disminución tanto en -
la velocidad de síntesis como en la de degradación de proteínas -
provocando que éstas tengan un tiempo de vida media mayor y por -
lo tanto estén expuestas a sufrir modificaciones estructurales --
(metilación, fosforilación, acetilación, etc.), que cambien su ca-
pacidad funcional (sea como componentes estructurales o en su ac-
tividad funcional como enzimas, etc.) causando una pérdida de la
homeóstasis celular, que a la corta o a la larga produciría la --
muerte (55).

7 TEORIA SOBRE LA PARTICIPACION DE LAS HISTONAS EN EL ENVEJECIMIENTO CELULAR

Esta teoría netamente molecular pretende explicar el proceso
de envejecimiento celular apoyándose en las investigaciones que -
indican cambios significativos en función de la edad, de las pro-
piedades fisicoquímicas de las histonas y en la composición y es-
tructuración de la cromatina, por lo menos en tejidos que esen-
cialmente no se regeneran como el cerebro y el hígado. Como ele-
mentos conformadores de la cromatina, las histonas han atraído el
interés de muchos investigadores recientemente (34).

Las histonas exhiben una uniformidad y una relativa carencia
de especificidad que les permite encontrarse involucradas en la -
organización estructural del ADN en subunidades repetitivas llama

das nucleosomas. De las cinco clases principales, la histona H1 parece ser la más promisoría para la investigación del envejecimiento celular. Una isoproteína de la histona H1, la histona H1⁰ está aún más relacionada con el proceso de envejecimiento que la misma H1 (94).

Se piensa que las histonas del linker (H1 y sus análogas) -- son los mecanismos de control que determinan la expresión genética. Como es sabido, solamente una fracción pequeña del genoma se expresa en cualquier tipo celular somático particular. Los genes que son transcripcionalmente competentes (aquellos que han sido o están a punto de ser expresados) están tipificados por un incremento variable en el acceso a las nucleasas. La cromatina que no está en condiciones transcripcionalmente competentes difiere en composición y estructura de aquella que es competente. Las diferencias en constitución incluyen: un incremento en la metilación de las bases del ADN, presencia de varias proteínas del 'linker' nucleosomal y sus modificaciones post-traduccionales: que contribuyen a la condensación de la cromatina y a la represión no específica de la expresión genética. Conforme avanza la edad en un organismo, la transcripción del ADN disminuye debido a una condición más condensada o heterocromatinizada. La disminución en la capacidad de transcripción del ADN provoca, a su vez, una disminución en la concentración de proteínas (funcionales y/o estructurales) indispensables para mantener la homeóstasis celular, por lo que el envejecimiento celular sobreviene por una incapacidad celular para mantener dicha homeóstasis (Fig. 4) (96).

LA HISTONA H1° CAUSA DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR

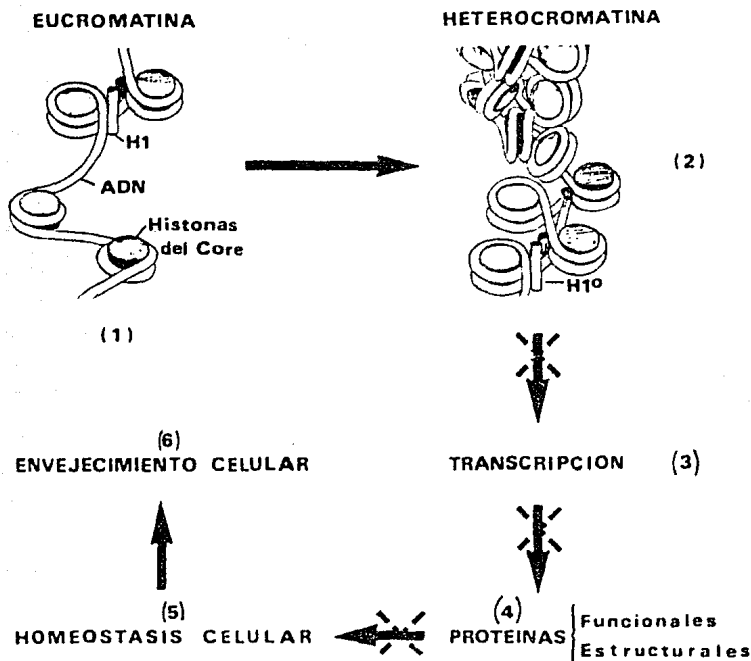


Fig. 4. Esquema que pretende explicar el proceso de envejecimiento por la carencia de proteínas funcionales o estructurales, debida a la represión no específica provocada por las histonas del "linker" (principalmente H1°). Dicha carencia proteica provoca inevitablemente una ruptura de la homeostasis celular. (1) Eucromatina, normalmente se transcribe y replica tempranamente; (2) heterocromatinización progresiva del material genético por aumento en la concentración de la histona H1°, lo que provoca una compactación del ADN, reduciéndose la distancia internucleosomal; (3) al compactarse la cromatina, la ARN-polimerasa no tiene acceso al ADN por impedimento estérico y por lo tanto no existe procesamiento de la información genética; (4) al no haber transcripción, no hay producción de proteínas, (5) existe una pérdida de la homeostasis celular, sobreviniendo inevitablemente (6) el envejecimiento celular.

III GENERALIDADES SOBRE LAS HISTONAS

Antes de profundizar en el papel que desempeñan las histonas dentro del envejecimiento celular, resulta necesario revisar la estructura, localización, función, biosíntesis, recambio, y los procesos postsintéticos de las histonas (acetilación, fosforilación y metilación); características que se encuentran involucradas en cierta medida con tan importante fenómeno.

1 ESTRUCTURA

Las histonas son proteínas relativamente pequeñas, muy básicas (es decir a pH 7.0 están cargadas positivamente) y poseen pesos moleculares comprendidos entre 10,000 y 23,000 d. Existen cinco clases principales, que se diferencian en sus contenidos relativos de lisina y arginina (55,12):

CLASE	AMINOACIDOS MAS ABUNDANTES (%)			
I	= 1	Lys	27	
IIB2	= 2B	Lys	16	
IIB1	= 2A	Lys	11	Arg 9
III	= 3	Lys	10	Arg 15
IV	= 4			Arg 14 Gly 15

La cromatina consiste de dos partes -la partícula 'core', y la región del 'linker' uniendo estas partículas. El 'core' o cromatosoma consiste de dos moléculas de cada una de las histonas internas, H2A, H2B, H3 y H4, más unos 145 pares de bases de ADN enrollado alrededor de las histonas internas. Las histonas de la clase I (H1 y sus análogas) están asociadas con la región del ---

'linker' (47).

A La Histona H4

Es bien conocido que la histona H4 de las plantas de guisantes difiere de la H4 de timo de ternera solamente en dos posiciones, estableciendo a la H4 como una molécula altamente conservada. Existen sin embargo, cuatro reinos eucarióticos: animales, plantas, hongos y protistas, y sería interesante tener secuencias completas de ejemplos representativos de H4 de hongos y protistas. Desafortunadamente solamente se conocen secuencias parciales hasta el momento (47).

Sesenta y cinco residuos de la H4 de los protistas, Tetrahymena thermophila se secuenciaron recientemente. Quince de éstos difirieron de los de ternera, entonces H4 parece mostrar cierta divergencia evolucionaria. Sin embargo, comparada con otras histonas, H4 permanece siendo una molécula altamente conservada. De hecho, lo que ahora debe enfatizarse no sólo es que H4 esté conservada, sino que está conservada tanto en su extremo amino (N-) como en su extremo carboxi (C-) terminal (47).

Como se ilustra en la Fig. 5, la región N-terminal es altamente básica, mientras que la región C-terminal tiene una distribución de aminoácidos característica de las proteínas globulares (47).

Complejos histona-histona ocurren entre las regiones globular y C-terminal de las histonas internas, y la fuerza de tales interacciones parece estar altamente conservada. La presión evolutiva que mantuvo la fuerza de tales interacciones, puede por lo tanto

SECUENCIA DE LA HISTONA H4

a)

Ac-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Leu-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-His-Arg	10	20
	30	40
Val-Leu-Arg-Asp-Asn-Ile-Gln-Gly-Ile-Thr-Lys-Pro-Ala-Ile-Arg-Arg-Leu-Ala-Arg-Arg	50	60
Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Ile-Ser-Gly-Leu-Ile-Tyr-Glu-Glu-Thr-Arg-Gly-Val-Leu-Lys-Val	70	80
Phe-Leu-Glu-Asn-Val-Ile-Arg-Asp-Ala-Val-Thr-Tyr-Thr-Glu-His-Ala-Lys-Arg-Lys-Thr	90	100
Val-Thr-Ala-Met-Asp-Val-Val-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe	102	
Gly-Gly		

b)

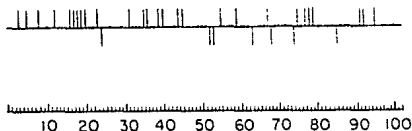


Fig. 5. (a) Secuencia de la histona H4 de ternera. (b) Las líneas hacia arriba indican Arg, Lys, ó His, las líneas hacia abajo muestran Glu ó Asp y los puntos representan Val, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Pro, Ala; en un intento por mostrar la distribución de los -residuos hidrofóbicos e hidrofílicos neutros, básicos y ácidos de la histona H4 de ternera (47).

considerarse responsable, por lo menos en parte, de la conservación de la secuencia de la región globular. Por otra parte, la conservación de la secuencia N-terminal básica de H4 puede deberse a una presión evolutiva un poco diferente, pero todavía no hay indicios sobre esto (47).

No se conocen secuencias primarias de ellas en hongos. Se sabe que la movilidad en gel de la H4 de Saccharomyces es similar a la de H4 de timo de ternera y por lo tanto no hay razones para sospechar que la H4 de hongos y de ternera muestren divergencias significativas (47).

B La Histona H3

La estructura primaria de la H3 de guisantes difiere de la de timo de ternera solamente en cuatro posiciones. H3, como H4, está por lo tanto altamente conservada tanto en su región N-terminal como en su región C-terminal. Sin embargo, las movilidades en gel de H3 proveniente de levadura y de Tetrahymena son diferentes de la de timo de ternera. Esto hace sospechar que las estructuras primarias son diferentes. Hacen falta secuencias de los aminoácidos completas de la H3 proveniente de hongos; los primeros 15 residuos de la H3 de levadura se conocen, sin embargo, como éstas son idénticas a su contraparte en ternera, parece que las diferencias aparecen en la cadena polipeptídica después del aminoácido -15 (Fig. 6) (47).

C La Histona H2B

H2B es un híbrido evolutivo: las regiones C-terminal y cen--

SECUENCIA DE LA HISTONA H3

a)	10	20
Ala-Arg-Thr-Lys-Gln-Thr-Ala-Arg-Lys-Ser-Thr-Gly-Gly-Lys-Ala-Pro-Arg-Lys-Gln-Leu	30	40
Ala-Thr-Lys-Ala-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Pro-Ala-Thr-Gly-Gly-Val-Lys-Lys-Pro-His-Arg	50	60
Tyr-Arg-Pro-Gly-Thr-Val-Ala-Leu-Arg-Glu-Ile-Arg-Arg-Tyr-Gln-Lys-Ser-Thr-Glu-Leu	70	80
Leu-Ile-Arg-Lys-Leu-Pro-Phe-Gln-Arg-Leu-Val-Arg-Glu-Ile-Ala-Gln-Asp-Phe-Lys-Thr	90	100
Asp-Leu-Arg-Phe-Gln-Ser-Ser-Ala-Val-Met-Ala-Leu-Gln-Glu-Ala-Cys-Glu-Ala-Tyr-Leu	110	120
Val-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp-Thr-Asn-Leu-Cys-Ala-Ile-His-Ala-Lys-Arg-Val-Thr-Ile-Met	130	
Pro-Lys-Asp-Ile-Glu-Leu-Ala-Arg-Arg-Ile-Arg-Gly-Glu-Arg-Ala		

b)

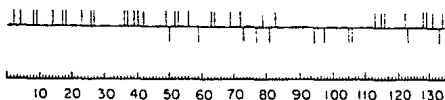


Fig. 6. (a) Secuencia de H3 de ternera. (b) Distribución de los diferentes tipos de residuos de H3 de ternera. Ver la Fig. 5 para el significado de los símbolos (47).

tral están altamente conservadas, mientras la región N-terminal -- está pobremente conservada. La Fig. 7a muestra las secuencias de histonas H2B cuya estructura primaria se conoce. Las alineaciones en el extremo amino son un poco arbitrarias (47).

D La Histona H2A

Todavía no se conoce mucho sobre las regiones variables y -- constantes de H2A. Los datos en la Fig. 8 son de H2A's de anima-- les exclusivamente: ninguna otra ha sido secuenciada todavía. Sin embargo, se sabe que la H2A de guisantes difiere de la H2A de ma-- míferos en su movilidad en gel y en su composición de aminoácidos y sería interesante tener secuencias de H2A de éstas, o de otras especies distintas a las animales (47).

E La Histona H1

La histona H1 es la más variable de las histonas. El número de subfracciones varía de un tejido a otro entre especies dadas y de un tejido dado, varía de una especie a otra. El peso molecular varía del mismo modo que la secuencia. También a H1 se le conside-- ra un híbrido evolutivo (47).

La Fig. 9 muestra que hay tres, o quizás más, dominios dis-- tintos, estructuralmente hablando, en H1. Alrededor de los prime-- ros 40 residuos constituyen una región variable muy básica y rica en alaninas y prolinas. Seguida por una región de alrededor de 75 residuos con características un poco diferentes. El patrón de -- distribución de los residuos es típico de las proteínas globula-- res y la región tiene largas extensiones de secuencias que son i-

SECUENCIA DE LA HISTONA H2B

a)	10	20
1	Pro-Ser-Gln-Lys-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser	
2	Pro-Lys-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser	
3	Pro-Glu-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Ala-Pro-Lys	
4	Pro-Glu-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Lys	
5	Pro-Pro-Lys-Thr-Ser-Gly-Lys-Ala-Ala-Lys	
	30	40
1	Pro-Gln-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys-Ala	
2	Pro-Ser-Arg-Lys-Ala-Ser-Pro-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-Ala-Gly-Lys-Gly	
3	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys	
4	Lys-Gly-Ser-Lys-Lys	
5	Lys-Ala-Gly-Lys-Ala	
	50	60
1	Gly-Lys-Arg-Arg-Arg-Gly-Val-Gln-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	
2	Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Val-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	
3	Ala-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg	
4	Ala-Val-Thr-Lys-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg	
5	Gln-Lys-Asn-Ile-Thr-Lys-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg	
	70	80
1	Glu-Ser-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly	
2	Glu-Ser-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly	
3	Lys-Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly	
4	Lys-Glu-Ser-Tyr-Ala-Ile-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly	
5	Lys-Glu-Ser-Tyr-Ala-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly	
	90	100
1	Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile	
2	Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile	
3	Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile	
4	Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile	
5	Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Ser-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile	
	110	120
1	Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Arg-Leu-Thr-Thr-Tyr-Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu	
2	Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Thr-Ser-Ala-Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu	
3	Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu	
4	Ala-Gly-Glu-Ser-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu	
5	Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu	
	130	140
1	Val-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu	
2	Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu	
3	Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu	
4	Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu	
5	Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu	
	150	b)
1	Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Thr-Ser-Arg	
2	Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Thr-Ser-Arg	
3	Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Lys	
4	Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Ser-Lys	
5	Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Ser-X	

Fig. 7. (a) Línea 1: secuencia de H2B de erizo de mar; Línea 2: secuencia de erizo de mar; línea 3: secuencia de temera; línea 4: secuencia de trucha; línea 5: secuencia de *Drosophylla*. (b) La parte superior indica la distribución de residuos para erizo de mar. Ver la Fig. 5b para el significado de los símbolos. La parte inferior indica los residuos idénticos para las cinco especies, los espacios indican deleciones en la secuencia (47).

SECUENCIAS DE LA HISTONA H1

- a)
- 10
- 1 Ac-Ser-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Thr-Ala-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Glu-Lys-Ser-Pro-Ala-
 2 Ac-Ala-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Val-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala-Pro-Ala-Ala-
- 20 30
- 1 Lys-Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Gly-Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-
 2 Lys-Ala-Pro-Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Lys-Ala-Gly-
- 40 50
- 1 Arg-Lys-Ala-Ala-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu-Leu-Ile-Thr-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-
 2 Gly-Pro-Ala-Val-Gly-Glu-Leu-Ile-Gly-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-
- 60 70
- 1 Ser-Lys-Glu-Arg-Asn-Gly-Leu-Ser-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-
 2 Ser-Lys-Glu-Arg-Ser-Gly-Val-Ser-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ser-Leu-Ala-Ala-
- 80 90
- 1 Gly-Gly-Tyr-Asp-Val-Glu-Lys-Asn-Asn-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Gly-Leu-Lys-Ser-
 2 Gly-Gly-Tyr-Asp-Val-Glu-Lys-Asn-Asn-Ser-Arg-Val-Lys-Ile-Ala-Val-Lys-Ser-
- 100
- 1 Leu-Val-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Val-Glu-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-
 2 Leu-Val-Thr-Lys-Gly-Thr-Leu-Val-Glu-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-
- 110 120
- 1 Phe-Lys-Leu-Asn-Lys-Lys-Ala-Ala-Ser-Gly-Glu-Ala-Lys-Pro-Lys-Pro-Lys-
 2 Phe-Lys-Leu-Asn-Lys-Lys-Ala-Val-Glu-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-Lys-
- 130 140
- 1 Lys-Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Lys-Pro-Ala-Gly-Ala-Thr-Pro-
 2 Lys-Ala-Ala-Ala-Pro-Lys-Ala-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-Ala-Ala-
- 150 160
- 1 Lys-Lys-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Lys-Thr-
 2 Lys-Lys-Pro-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-Ser-
- 170 180
- 1 Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Val-Ala-Lys-Pro-
 2 Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala-Lys-Pro-Ala-Lys-
- 190
- 1 Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Val-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Ala-Val-Lys-
 2 Thr-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Thr-Lys-Ala-Ala-Lys-
- 200 210
- 1 Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Ala-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Ala-
 2 Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Val-Lys-
- 225
- 1 Lys-Lys-Thr-Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-
 2 Lys-Pro-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys

b)

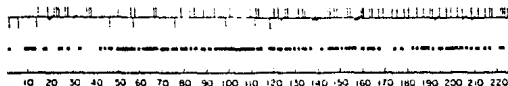


Fig. 9. (a) Secuencias de H1 de timo de conejo¹ y de trucha². (b) Distribución de los tipos de residuos de la H1 de timo de conejo de 9a y su identidad de los residuos entre esta H1 y la de trucha. Ver la fig. 6b para el significado de los símbolos (47).

dénticas en las proteínas de trucha y de conejo. El resto de la molécula muestra un alto grado de variabilidad. El extremo C-terminal de H1 es altamente básico; contiene solamente pocos aminoácidos, principalmente lisina, alanina, prolina y es posible, además, que algunas de las pequeñas extensiones de homología sean accidentales (47).

H1 comparte esto con H2B. Las regiones con distribuciones de residuos que existen en proteínas globulares son los únicos que están altamente conservados. Los otros con importantes excepciones, son variables (47).

En aves, se ha encontrado una variación de la histona H1, la cual se ha denominado histona H5, proteína que también es rica en lisina (4).

Recientemente, se ha encontrado una subfracción de la histona H1 de hígado de ternera, $H1^0$, que se ha considerado como un intermediario entre la H1 de timo de ternera y la H5 de eritrocitos de aves. La $H1^0$ es muy semejante a la H1, principalmente en su contenido de aminoácidos y posee amplia homología con la H5 de eritrocitos de aves. Las secuencias de las moléculas de H1 de erizo de mar muestran mayor homología con las H5's particularmente en el dominio central, que con las H1's de vertebrados. El dominio central de las histonas H1 y H5 es la región más hidrófoba de la molécula y asimismo la región más resistente a la digestión por tripsina. Sin embargo, la conservación de este dominio central es menor que para cualquiera de las histonas del 'core'. En la Fig. 10 se muestra de manera muy esquemática la comparación entre la histona H1 y H5 (4,87)

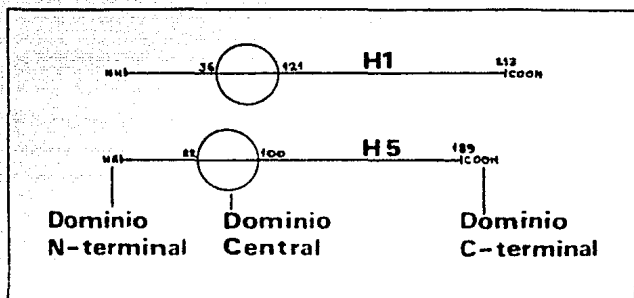


Fig. 10 (4)

2 FUNCION Y LOCALIZACION

Con base en las características intrínsecas de la histona H1, la función que desempeña en la cromatina es compleja. A H1 se le atribuye la función de condensación de la cromatina y se ha propuesto que el primer sitio de enlace de H1 se encuentre entre los pares de bases 146 y 168, en la región del 'linker' del nucleosoma. El dominio globular de las histonas ricas en lisina (aproximadamente unos 80 residuos) está protegido contra la digestión por tripsina en el núcleo, y este dominio por sí sólo puede proteger los aproximadamente 20 pares de bases extra del ADN presentes en el cromosoma. La compactación de la cromatina por la histona H1 requiere de la molécula intacta. Si 146 pares de bases representan $1 \frac{3}{4}$ de vuelta del ADN superhelicoidal, entonces 168 pares de bases representan dos vueltas completas; el dominio globular parece ser capaz de cerrar la segunda vuelta del ADN. La distancia de la partícula 'core' al siguiente cromosoma es simétrica, aproximadamente 10 pares de bases, en ambos extremos, y esto implica que se ubique de manera simétrica el dominio globular sobre el eje de la partícula. El dominio globular de la histona H1 es una partícula esférica con un diámetro de aproximadamente 28 \AA (4,20).

H1 descansa, entonces, sobre la superficie del 'core' del nucleosoma, cerca de las histonas H2A y H3. La histona H2A se encuentra unida a H2B por un enlace de la prolina 26 de H2A a la tirosina 40 de H2B. Mientras que los residuos de cisteína de H3 se acoplan a otra molécula de H3. Parece ser que la histona H4 se encuentra orillada hacia uno de los extremos del octámero de histo-

nas entre las dos moléculas de H3 (Figs. 11 y 12) (3,11,4).

El largo del ADN del 'linker' puede diferir entre genes en el mismo tejido, así como entre especies, de un mínimo de 0 pares de bases para las levaduras hasta un máximo de 100 pares de bases en el esperma de erizo marino. Por lo tanto, el contenido de histonas en la región del 'linker' puede variar de 0 para las levaduras, 1 molécula por nucleosoma para la mayoría de las especies investigadas, hasta 2 moléculas por nucleosoma en los eritrocitos de pollo. En un tejido dado, La cantidad de histonas del 'linker' parece estar relacionada con la velocidad de división celular, -- mientras la naturaleza de las mismas parece ser función de la diferenciación celular. Por lo tanto resulta razonable suponer que esté relacionada de alguna manera con la expresión génica. Observaciones recientes indican que H1 enlazada a la cromatina puede tener consecuencias importantes en la transcripción, alterando el acceso al ADN por enzimas (3,102,21).

El complejo papel que desempeña H1 in vivo involucra también la formación de puentes intermoleculares con dominios específicos de la cromatina mientras sufre reparación del ADN o replicación, -- mediante la formación de dímeros de H1 unidos por una cadena de poli-ADP-ribosa, gracias a la transferencia del NAD por acción de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (99).

La estabilidad de la estructura de la cromatina, debida en gran parte a H1, es de interés ya que se ha propuesto que el rearrreglo de los nucleosomas puede ser una fuente de información epigenética durante el desarrollo.

La histona H1 está distribuída irregularmente en la cromati-

MODELO PROPUESTO PARA LA LOCALIZACION DEL DOMINIO GLOBULAR DE LAS HISTONAS RICAS EN LISINA (H1)

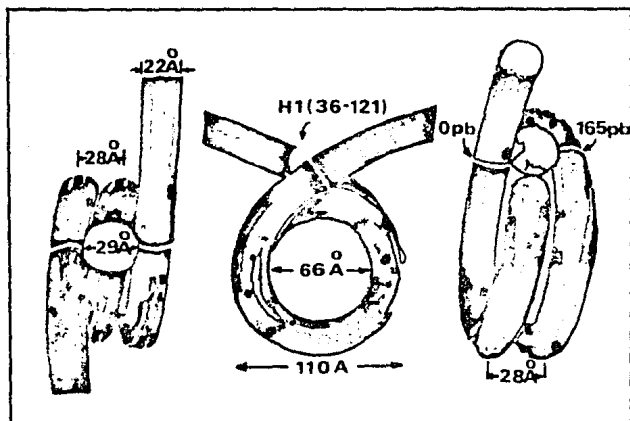


Fig.11. pb, Pares de bases
(4)

MODELO DEL CROMATOSOMA DEL NUCLEOSOMA

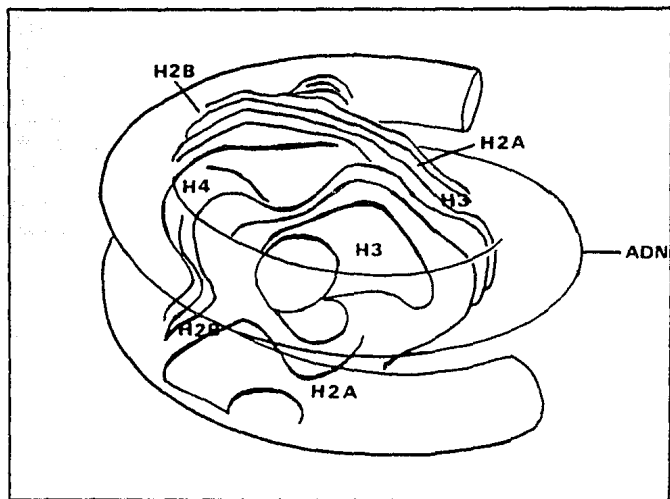


Fig.12 Construido enrollando un tubo que simula la superhélice del ADN sobre un modelo del octámero de histonas, deducido a partir de un mapa tridimensional obtenido de micrografías electrónicas del octámero de histonas(4).

na (generalmente la que es propensa a la agregación contiene más-H1), pero en patrones estables. La reproducción de un patrón particular de condensación de la cromatina y su relación con la expresión genética puede ser parte de la obligación que tiene la célula a llegar a su estado diferenciado correspondiente (46,50).

Una proteína similar a H1, como se mencionó antes, la histona H5, también se encuentra en la región del 'linker', pero solamente en las células rojas nucleadas de aves. La función de H5 se ha sugerido que pudiera ser la supresión de la transcripción. Se sostiene que cuando se presenta la histona H5, ésta reemplaza a la histona H1, pero otros investigadores opinan que H5 está presente además de la fracción normal de H1 (27).

La función de la proteína H1⁰ está relacionada probablemente con la diferenciación celular, envejecimiento celular, y con la supresión de la replicación celular o de la síntesis de ADN. La H1⁰ puede reemplazar a la histona H1 en su posición de la región del 'linker', y puede proteger igual o más que H1 al ADN. El reemplazo de H1 puede ser extensivo, de tal manera que para el hígado o riñón de ratones viejos se ha estimado que el ratio H1⁰/H1 = 0.4 es decir del 40% (27,19).

Como la histona H5, H1⁰ puede proteger más eficientemente al ADN contra el ataque por nucleasas que la histona H1, ya que se ha observado que a mayor contenido de H1⁰, mayor es la capacidad para formar estructuras compactas cuando se incrementa la fuerza iónica y menor es el acceso al ADN por la nucleasa micrococcal. Sin embargo, se ha observado que el efecto de H1⁰ sobre la estructura de la cromatina debe originarse de la interacción de esta histona

con otros componentes en la cromatina, entre los cuales las demás subfracciones de la histona H1 son buenas candidatas (principalmente la histona H1-1) (81,87).

Las funciones de las histonas del 'core' se detallarán más a delante, cuando se hable de los procesos postsintéticos característicos que sufren las histonas: acetilación, fosforilación y metilación.

3 BIOSINTESIS

La mayoría de los productos génicos eucarióticos se sintetizan durante todo el ciclo celular. Por contraste, la biosíntesis de histonas está ampliamente restringida a la fase S, concurrente con el periodo de síntesis del ADN y con la replicación cromosómica (8,49,63). En las células HeLa, por ejemplo, el grueso de la síntesis de histonas comienza cuando la célula pasa de la fase G1 tardía a la fase S, y la velocidad de síntesis aumenta hasta 10 veces durante el curso de la duplicación cromosómica. Las proteínas histonas son sintetizadas por pequeños polisomas utilizando ARNm's histónicos, cuyas concentraciones muestran dependencia también del ciclo celular. Los núcleos y cromatina aislados de células en fase S demuestran la transcripción del gen histónico, mientras preparaciones similares de otros periodos del ciclo celular no muestran tal capacidad. Resultados similares, si bien menos extensos se han reportado para un número de líneas celulares transformadas de mamíferos, indicando que la síntesis de histona que coincide con la replicación cromosómica es una característica común del ciclo celular de mamíferos. Además, si la replicación del ADN en tales células se inhibe, la velocidad de síntesis de histonas se deprime de una manera rápida, proporcionada y reversible. La síntesis de histonas y de ADN se consideran, por lo tanto, -- que están acopladas, sugiriendo que los mecanismos para la regulación génica histónica están esencialmente ligados con la replicación del ADN (65).

Sin embargo, dentro de la misma fase S, no todas las histonas se sintetizan a la misma velocidad, pues se ha observado que

la histona H1 es sintetizada por las células de dos a tres veces más rápido que las histonas H2A y H2B y que los subtipos de la -- histona H1 se sintetizan y recambian a diferentes velocidades. La diferencia en la velocidad de síntesis entre los subtipos elimina la posibilidad de que la síntesis se deba a una disminución en el nivel de replicación del ADN. Incluso, se ha observado que en la síntesis de los subtipos de H1, unos se sintetizan preferencialmente de manera temprana, mientras que otros lo hacen de forma -- tardía (12,78). Por lo tanto, la síntesis de los subtipos de H1 -- se ha considerado que depende de la etapa de desarrollo embriónico o de diferenciación terminal en que se encuentren las células así como de los efectos hormonales que reciba (50).

Además de la síntesis de histonas en la fase S, una baja producción de histonas puede detectarse en otros momentos del ciclo celular y tal síntesis no se ve afectada por inhibidores de la replicación del ADN (1,30,38,39,49,99); lo que indica que además de la síntesis acoplada, una cantidad basal de expresión génica histónica puede mantenerse a lo largo del ciclo celular. Se piensa -- que las histonas basales pueden estar codificadas por un subconjunto de genes histónicos activos a lo largo del ciclo celular o pueden ser consecuencia del mecanismo de acoplamiento que confina la mayoría de la expresión génica de las histonas a la fase S --- (65).

Es importante mencionar que se ha notado que la síntesis de la histona H1⁰ es mayor en las células IMP-90-VA-13 y HeLa inhibidas por Hidroxiurea (HU) y/o Arabinósido de Citosina (Ara C) con bajo índice de proliferación que en las mismas células en creci--

miento, por lo que la síntesis de H1^o se considera independiente de la replicación del ADN (22). Otros estudios opinan que el contenido de H1^o es inversamente proporcional a la velocidad de síntesis del ADN, realizados en células CHO bloqueadas en fase G1 con Butirato de Sodio (17), en células de neuroblastoma (23,78) y en células rojas de aves con la histona H5 (78).

El acoplamiento de la síntesis de histonas con la replicación del ADN parece conseguirse por regulación de las concentraciones de ARNm's histónicos. El incremento rápido en las concentraciones de ARNm's histónicos al inicio de la fase S en células HeLa resulta en un incremento de la velocidad de síntesis y de una prolongación del tiempo de vida medio del mensajero histónico. De manera similar, los estudios cinéticos han mostrado que el declive rápido de las reservas del ARNm histónico total y polisomal consecutivo a la inhibición de la replicación del ADN tiene dos componentes: la velocidad de síntesis del ARNm histónico disminuye a niveles basales y los ARNm's histónicos son rápidamente degradados. Al principio de la fase S, la vida media de los mensajes histónicos se ha estimado de 40-60 minutos, pero el tratamiento con inhibidores de la síntesis de ADN reduce este valor aproximadamente a la quinta parte. Este cambio en la estabilidad del mensaje es dependiente de la síntesis continua de protefna; tratamientos similares de cultivos de células HeLa en fase S sincrónicos con inhibidores de la síntesis del ADN y protefnas resulta en la estabilización del ARNm histónico en polisomas previamente activos (65).

El mecanismo que regula la expresión génica histónica perma-

nece sin identificarse, pero un número de sus características son ahora evidentes. Es iniciado por el comienzo de la síntesis de -- ADN y eleva la transcripción génica histónica; las transcripcio-- nes son relativamente estables, permitiendo la rápida acumulación de las proteínas histonas; y la terminación o inhibición de la -- síntesis del ADN reprime la transcripción génica histónica y causa una caída, dependiente de la síntesis de proteínas, en la vida media del mensajero histónico. Un modelo simple incluyendo todas esas características propone que las histonas regulan su propia - síntesis a través de una retroalimentación negativa. Los genes -- histónicos pueden resultar transcripcionalmente activos como consecuencia de cambios estructurales concomitantes con la replica-- ción del ADN. El ensamble de la cromatina podría entonces asegurar que la concentración de histonas libres permaneciera baja, -- permitiendo una transcripción continua del gen histónico. Si la - síntesis del ADN estuviera inhibida, el almacén histónico podría incrementarse y la proteína podría reprimir una posterior trans-- cripción génica histónica. Bajo tales circunstancias, la inhibi-- ción de la síntesis de proteínas podría prevenir el incremento en las histonas libres y permitir una síntesis continua del ARNm hig-- tónico. Tal modelo requiere de una adición posterior que explique el declive precipitado de la estabilidad del ARNm histónico al fi-- nal de la fase S, cuyas bases moleculares permanecen obscuras --- (65).

La organización del gen que codifica para histona ha sido analizada en una amplia variedad de organismos. La técnica de clonación molecular ha revelado que los genes histónicos frecuente-

mente están agrupados en el genoma pero no exhiben ninguna topología sencilla conservada. Variando desde arreglos al azar, grupos dispersados altamente regulares hasta quintetos repetitivos, las topologías de los genes histónicos pueden ser las más variables - de cualquier familia génica. Desde luego, el número de copias y - el arreglo génico difiere tanto aún entre los organismos íntimamente relacionados que ha sido la dificultad para detectar cualquier tendencia en la evolución de la organización de los genes - histónicos (65). Sin embargo las histonas están consideradas entre las proteínas evolutivamente más conservadas (47).

En general, los genomas de los eucariotes superiores incluyen desde docenas hasta cientos de genes histónicos arreglados en grupos cuya organización puede ser regular, es decir, el ADN codificador de proteína y el 'espaciador intergenético' organizado en unidades prácticamente idénticas repetidas en grupos muchas veces (por ejemplo, en la mosca y en los genes de histonas tempranas -- del erizo de mar); ó su arreglo puede ser irregular, los genes exhibiendo variabilidad en el orden, relativa polaridad en la transcripción, dimensiones particulares del ADN 'espaciador intergenético' y secuencia primaria (por ejemplo, en ratón, pollo y humano) (65).

Los genes histónicos de los mamíferos se encuentran repetidos aproximadamente 10 veces por genoma y están arreglados variablemente en grupos. Un número de clones de genes histónicos se han obtenido de ADN humano y de ratón. Las topologías de los segmentos genómicos clonados varían en orden, espacio e identidad para las regiones codificadoras de histonas localizadas en ellos. En

tonces, en ninguna especie los genes histónicos están organizados de una manera altamente ordenada. Los genes histónicos de mamíferos son heterogéneos en su secuencia primaria; hay por lo menos - siete especies electroforéticamente distintas de ARNm para H4 en cultivos celulares humanos. Los experimentos de protección de S1 usando genes histónicos humanos clonados han mostrado que de estos siete, por lo menos tres están codificados por genes diferentes (65).

Se sabe actualmente de la inserción de transposones dentro o cerca de los genes histónicos para Drosophyla. Los transposones de Drosophyla, todos miembros de la familia Copia, se insertan a parentemente específicamente en las cajas TATA de los genes de la histona H3. El transposón para el erizo de mar designado TU 1, se inserta en el gen de H2B en la posición del aminoácido 57. El elemento TU 1 es miembro de una clase heterogénea descubierta de --- transposones del erizo de mar caracterizados por secuencias repetitivas invertidas terminales de largo variable. No se sabe si estas inserciones inactivan o afectan la actividad de los genes histónicos, pero se sabe que la inserción de transposones próximos a genes puede influenciar profundamente la expresión génica. Es importante mencionar que la inversión de la secuencia de ADN con -- puntos de ruptura cerca de las cajas TATA se ha encontrado entre dos genes en una unidad repetitiva histónica del erizo de mar; este resultado, junto con la transposición aparentemente específica dentro de la región correspondiente de secuencias repetidas de -- histonas de Drosophyla, sugiere que la secuencia del ADN cercana al elemento TATA puede estar sujeta a rearrreglos frecuentes (65).

Parece ser que los bloques de muchas secuencias evolutivamente conservadas que codifican para histonas participan en los procesos de iniciación y terminación de su transcripción. Existe una conservación entre las especies de las secuencias en las regiones directoras de los ARNm's histónicos. Los genes histónicos de las levaduras comparten una homología degenerada rica en A inmediatamente ascendente a partir del iniciador AUG. Esta secuencia está descrita por el consenso $\left\{ \text{PyT(A)}_m \right\}_n$. La región análoga en los erizos marinos exhibe una composición básica divergente, estando G fuertemente sub-representado. En la mayoría de los genes histónicos, esta secuencia termina con (Cor A)APyCATAG, como lo hace en muchos otros genes eucarióticos (65).

El extremo 5' terminal de la mayoría de los ARNm's histónicos está localizado dentro de una secuencia conservada, PyCATTC-Pu, referida como el sitio del 'cap'. Este elemento ha sido identificado por análisis directo de los híbridos ADN-ARN como el sitio de iniciación de la transcripción de los genes que codifican para las histonas tempranas del erizo de mar de los genes para -- histonas tardías del erizo de mar, así como de los genes para his tonas de pollo y de ratón. La función de la secuencia del 'cap' -- ha sido estudiada por análisis de los productos de transcripción de los genes que codifican para la histona H2A del erizo de mar, así como de sus análogos mutantes después de microinyectarlos dentro de las vesículas germinales de X. leavis. Los productos de -- transcripción del gen tipo libre (no manipulado) se inicia en la localización propia en la posición -77. La delección de la secuencia del 'cap' crea otras 60 bases terminales de manera descendente

te. Este resultado sugiere que la secuencia 'cap' debe estar involucrada en la selección del sitio de inicio (65).

Muchos bloques de secuencias conservadas están localizados ascendentes a partir del sitio del 'cap'. Entre éstas se encuentran el elemento TATA y, en el erizo de mar, la secuencia GATTC - 11 pares de bases ascendentes de la secuencia TATA. La región TATA que mostró ser parte del promotor de la ARN polimerasa II, es ubicua en eucariotes. Los genes histónicos en una variedad de organismos (desde levaduras hasta el hombre) están flanqueados por una caja TATA localizada aproximadamente a 20-30 bases del extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción (o sitio 'cap'). Tal distribución extensa refleja una conservación extrema del mecanismo básico de transcripción de los genes polimerasa II. Cuando los elementos TATA y GATTC sufren delección del gen que codifica H2A del erizo de mar aparecen muchos falsos sitios de iniciación. Además, la expresión de este gen está regulada por el descenso en la concentración, si bien no tanto como ocurre cuando otras secuencias son eliminadas. Entonces, parece que la principal función de la secuencia TATA es controlar la especificidad del sitio de iniciación de la transcripción más que la velocidad de iniciación (65).

Las regiones 3' que flanquean los genes histónicos muestran una sorprendente homología entre las especies. Quizás lo más importante -de su rigurosa conservación entre diversos grupos- son los 12 pares de bases, repetidos, invertidos y separados por guiones, localizados en el extremo 3' del ARNm. La proximidad de las secuencias invertidas repetidas al extremo 3' del ARNm sugiere --

que la repetición puede desempeñar un papel en la terminación de la transcripción (65).

4 INTERCAMBIO

Se ha encontrado que las moléculas de la histona H1 intercambian su posición en la cromatina, pero este intercambio no es extenso, se limita únicamente entre las regiones Θ de la cromatina (resistentes a la agregación) y entre las regiones II (promotoras de agregación) pero nunca entre las regiones Θ y II. Los mecanismos para tal restricción no están claros aún. Puede ser que el intercambio de H1 ocurra directamente de fibra a fibra sin la liberación transitoria de H1 en la solución. Si H1 pudiera vagar libremente a lo largo de toda la cromatina, entonces no sería razonable postular que las diferencias entre las variantes de H1 son fisiológicamente significativas. Por lo tanto, es importante que se haya encontrado que el intercambio de H1 está restringido a -- clases particulares de la cromatina y que esas clases están, por lo menos en parte, relacionadas con propiedades de agregación. Es posible entonces, que las características de los subtipos de H1 -- refuercen las variaciones entre los subtipos en sus capacidades -- para condensación del ADN y pueden ser aprovechadas para mantener regiones de la cromatina que difieren in vivo con respecto a la agregación (heterocromatización). La cromatina debe verse como un mosaico de regiones que difieren en propiedades de agregación --- (50).

5 RECAMBIO

Las histonas de las células no proliferativas, terminalmente diferenciadas sufren un reemplazo continuo. Además, el proceso de incorporación intranuclear de las histonas en ausencia de síntesis replicativa y su integración posterior a la cromatina procede con extraordinaria demora. Las histonas del 'core' no participan en el recambio como simples unidades sino como un mosaico proteico en donde cada elemento de una pareja tiene su propia velocidad de remoción. Los nucleosomas intactos toman parte en el reemplazo, pero la proporción relativa de los que se involucran, debe estar limitada. Las histonas no nucleosomales, H1A y H1° sufren un recambio más rápido que las histonas del 'core'. El recambio de histonas no está asociado con procesos reparativos del ADN (23).

El recambio de H1, como de H2A y H2B, sucede tanto dentro como fuera del nucleosoma, in vitro e in vivo. Además, todas las histonas recambian más rápido que el ADN. H1 recambia más rápidamente que el par H2A/H2B y éste, a su vez, más rápido que H3/H4. Esto implica un proceso de reemplazo de las histonas diferencial pero continuo. Posiblemente, las histonas recambian exclusivamente dentro de regiones de cromatina transcripcionalmente activa. Alternativamente, la mayoría de las moléculas de H1 pueden asociarse permanentemente a la cromatina durante la mayor parte de la interfase y después sufrir una extensa redistribución después de la mitosis (60,102).

Parece ser que las histonas de todos los sistemas celulares sufren un reemplazo no como excepción, sino como regla y de forma continua. Está generalmente aceptado que el recambio proteico es

extensivo y que una de sus principales funciones es la eliminación de polipéptidos anormales y potencialmente dañinos resultado de mutaciones, errores biosintéticos o desnaturalizaciones espontáneas. Entonces no hay razón para excluir a las histonas de esta regularidad biológica. Si bien las histonas son proteínas estructurales primarias, no constituyen el esqueleto de la cromatina en forma estática. Se ha observado un alto grado de microheterogeneidad en forma de modificaciones postsintéticas o variantes cuya aparición se relaciona con la actividad transcripcional de la cromatina o con estados de desarrollo. Las histonas podrían realizar fácilmente tal papel dinámico a través de un recambio apropiado. La reparación 'natural' podría ser una posible razón para el reemplazo de histonas (23).

El recambio de histonas no es regular. Un conjunto de conclusiones surgen del recambio irregular de las histonas: (1) las histonas del 'core' no se degradan como una simple unidad, ni en forma de dímeros, ni en forma de tetrámeros, como podría suponerse basándose en los resultados de los experimentos de reconstitución, de 'cross-linking', ó experimentos de disociación de histonas por sales. Similar al patrón de degradación como 'mosaico' del complejo proteínico de los monómeros 40S conteniendo ARNhn, el reemplazo de cada molécula de histona individual sigue su propia ruta. Esta conclusión hace surgir dos preguntas: ¿Cuál es el mecanismo de reemplazo de las histonas? ¿Cuál es el estado conformacional de los nucleosomas que sufren un reemplazo de sus histonas? No hay duda de que un cambio de conformación apropiado puede brindar mejores condiciones para que ocurra un recambio. Por esta razón, una

relación de nucleosomas con alguna clase de modificación de histonas parece razonable. (2) Las histonas de la clase H1 son también metabólicamente heterogéneas. (3) Se sabe que las diferentes especies de histonas poseen distintos grados de conservación evolutiva en relación con su estructura primaria. Parece que el recambio de las cinco principales histonas está inversamente relacionado con el grado de conservación evolutiva (a mayor conservación evolutiva menor velocidad metabólica) (23).

6 PROCESOS POSTSINTETICOS

Se necesitó un gran esfuerzo para elucidar los elementos que modulan la estructura nucleosomal básica de la cromatina con el objeto de explicar la organización diferencial y la expresión del ADN genómico durante la diferenciación y desarrollo. Los elementos potenciales pueden agruparse en tres clases principales: (1) modificación del ADN (metilación, etc.); (2) interacción con proteínas no histónicas; y (3) modificación de las histonas. Tales modificaciones se ven como buenas candidatas para el control (o por lo menos están involucradas) de la función y estructuración de la cromatina en la diferenciación. Estas actividades de modificación y de desmodificación que sufren las histonas están asociadas con la cromatina. Las histonas son modificadas en sus residuos internos después de que entran en el núcleo y no en el momento de su síntesis en los polisomas. Son tres las principales modificaciones reversibles de las histonas: acetilación de las lisinas en las histonas del 'core' H2A, H2B, H3 y H4; fosforilación de las serinas y treoninas en la H1 y en menor cantidad en las --

histonas H2A, H3 y H4; y metilación de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (76,58).

A Acetilación

La acetilación convierte un residuo básico de lisina en una acetil-lisina neutra y reduce la carga positiva neta de la región de la cadena polipeptídica que contiene el residuo modificado. Existen cuatro sitios de acetilación en las histonas del 'core' -- H2b, H3 y H4 y un sitio, la lisina número 5, en H2A. La selección de un pequeño número de residuos de lisina para tal modificación indica que la reacción es altamente específica y que las enzimas pueden actuar sobre diferentes histonas. Todos estos sitios de acetilación están confinados a la región básica N-terminal, específicamente después del residuo 25, para todas las histonas del 'core'. En la histona H4 los sitios de acetilación son las lisinas 5, 8, 12 y 16 (en este caso, todas las lisinas en los 16 primeros residuos están tetraacetiladas (Ac_4H_4) reduciendo la carga positiva total de esta región de +5 a +1. Entonces, mientras que la región N-terminal está sujeta a acetilación, las regiones central y C-terminal de las histonas del 'core' son los sitios de interacción con el ADN dentro de la partícula 'core' de la cromatina (76,25,-95).

Se piensa que la acetilación, al ser una modificación química reversible de las histonas, es un mecanismo implicado en la modulación de las interacciones de las histonas, en la acumulación de las mismas recientemente sintetizadas sobre el ADN nuevo, en la remoción de histonas para que el ADN se asocie con protaminas,

y en la alteración de la estructura de la cromatina en respuesta a funciones y eventos celulares (activación génica para el procesamiento del ADN: transcripción, replicación del ADN; condensación del cromosoma) (43,95). Generalmente, un nivel elevado en la acetilación está asociado con cromatina transcripcionalmente activa, es decir, la fracción soluble de la cromatina está enriquecida en las formas acetiladas de las histonas H4, H3 y H2A, que contienen más genes activos que la cromatina insoluble. Además, la acetilación de las histonas tiene un poderoso efecto sobre la capacidad de la cromatina aislada para realizar la síntesis del ADN dependiente del ARN y tal modificación parece alterar el número de sitios de iniciación de la cadena de ARN sobre la cromatina y facilitar el movimiento de la ARN polimerasa a lo largo de las fibras de la cromatina. Posiblemente la acetilación actúa a nivel de estructuración de la cromatina antes de que se forme el nucleosoma con el fin de que la estructura extendida de la cromatina sea capaz de procesarse. Además, la acetilación vuelve al ADN en estas estructuras más accesible al ataque por nucleasas, lo que se piensa es la causa de la heterogeneidad que despliega la histona H4 (13,25,85).

El contenido de acetato de la histona H4 no es constante, varía durante el ciclo celular. Durante la fase G2 la proporción de Ac_1H_4 se incrementa hasta aproximadamente un 62% y luego decrece hasta aproximadamente un 55%. Este descenso ocurre durante la mitad de la fase G2 pero hay un incremento complementario en la fracción de Ac_2H_4 (16-23%) y en la de Ac_3H_4 (2.5-4.3%) y en la de Ac_4H_4 (1-3%). Los datos implican un incremento total en la acetilación

lación durante la mitad de la fase G2. La fase G2 tardía se caracteriza por una marcada disminución en Ac_4H_4 (3-1%) seguido en profase temprana por una caída de Ac_3H_4 (4-2%). Ac_2H_4 disminuye a través de la fase G2 tardía y profase (23-11%). En profase temprana la proporción total de H_4 altamente acetilada (2-4 acetatos/molécula) se encuentra en su valor mínimo (13.5%). Durante la mitosis tardía y la fase S temprana el incremento en la proporción de H_4 altamente acetilada está balanceado por decrementos en las formas no- y monoacetiladas de H_4 , de tal manera que para la mitad de la fase S la proporción de H_4 altamente acetilada alcanza su máximo (33.6%). En la fase S tardía la proporción de H_4 altamente acetilada cae a un nivel constante de aproximadamente 26% antes de llegar a un nivel mínimo de 19.4% en la fase G2 temprana. Los cambios más dramáticos en H_4 ocurren en la fracción Ac_4H_4 . Existe un mínimo (0.4%) en la profase temprana y un máximo (3.6%) en la mitad de la fase S y un segundo máximo (más de 3%) en la mitad de la fase G2 (76). Además parece ser que no existen diferencias en la velocidad de acetilación y de desacetilación de la Histona H_4 en relación con la edad en Fibroblastos Diploides Humanos (FDH) - (25).

El incremento en la acetilación está relacionado, en varios tipos celulares, con la transcripción de grandes regiones del genoma. Las diferencias en los niveles de acetato de H_4 pueden estar relacionadas con diferencias en la cantidad que ha sido expresada del genoma. En los núcleos del mohó Physarum se ha observado que la cantidad de Ac_1H_4 es una medida directa de la proporción del genoma que es activo. Parece que la transcripción está asocia

da con altos niveles de acetilación de H4, incluso Ac₄H4 que re-- cambia muy rápido. Entonces, los incrementos en Ac₁H4 y en Ac₂H4 reflejan un incremento total en la acetilación neta que puede a-- acompañar la activación de una gran proporción del genoma. La de-- pendencia de la acetilación de H4 con el ciclo celular muestra -- que el nivel total de la actividad de la enzima desacetilasa no - cambia lo suficiente para explicar los cambios en los niveles de acetilación. Estos cambios pueden deberse a cambios totales en la actividad acetiltransferasa o a cambios en la accesibilidad a la histona H4 (como sustrato). Los resultados encontrados son con-- sistentes con la sugerencia que regiones locales de la cromatina tienen una estructura o composición que estimula la acetilación, así como una inhibición local de la desacetilasa por las proteí-- nas no histónicas del grupo de alta movilidad (HMG) 14 y 17 (43).

El uso de la enzima desoxiribonucleasa I (DNasa I) ha provis-- to también evidencia en favor de la acoplación del proceso de ace-- tilación de H4 ligado con la transcripción. En Physarum, el pa-- trón de transcripción bifásico está íntimamente relacionado con - el patrón de Ac₄H4. Esto también apoya la relación que existe en-- tre el proceso de acetilación de las histonas y la transcripción. Además, se ha observado que la cantidad de Ac₄H4 en profase está relacionada inversamente con la fosforilación de la histona H1 - (76,25).

En estudios que han tomado como modelo a los FDH, se ha ob-- servado que tanto las células senescentes como las jóvenes, con-- tienen un tipo de histona H4 que se acetila y desacetila rápida-- mente, en comparación con el resto de histonas del 'core', con la

misma cinética y por lo tanto en los FDH no existen diferencias significativas con la edad en el proceso de acetilación (25).

Con otros modelos y otros tipos de histonas no sucede lo mismo. La acetilación de las histonas en núcleos neuronales de rata se incrementa directamente con la edad hasta llegar a un valor elevado constante a los 30 días de edad (excepto H2A y H4), cuando ocurren los cambios más remarcables durante todo el desarrollo postnatal.

La acetilación de las histonas H2A y H2B se presenta solamente cuando se activa la síntesis de estas histonas. La acetilación de H3 y H4 toma lugar probablemente vía diferentes mecanismos, lo que sugiere que ellas juegan un papel diferente en la estructura y función de la cromatina. Las investigaciones proponen que la acetilación de H3 puede estar implicada en la regulación de la actividad génica durante la embriogénesis en Drosophyla hydei. Las alteraciones en el nivel de acetilación de la histona, que parecen estar relacionadas con cambios en la actividad transcripcional, pueden estar controladas al nivel de su actividad desacetilativa o acetilativa (o en ambas). Hay una alta actividad de la enzima acetil-transferasa que es responsable del nivel elevado de incorporación del acetato durante la etapa de gastrulación. Se puede especular que diferentes enzimas están involucradas en la acetilación de H3 y H4, que la actividad de la acetilasa específica de la histona H3 cambia durante el desarrollo embrionario, o que el acceso de H3 hacia la enzima varía durante las etapas examinadas de la embriogénesis (43).

El proceso de acetilación, al ser un proceso enzimático, de-

be encontrarse regulado de alguna manera. Esta regulación puede - deberse a alteraciones en el nivel estable de la acetilación de las histonas que afecten la velocidad de acetilación y/o desacetilación a través del control de la actividad de la enzima desacetilasa, enzima estable cuya síntesis parece estar restringida a la fase G2. En el caso de H4 parece que los cambios en el contenido acetilo o en la velocidad de recambio, están localizados en regiones de la cromatina que han sufrido un recambio estructural y por lo tanto la función de acetilación es la de completar la transición estructural y/o estabilizar o mantener la conformación alterada (13,95).

El proceso de acetilación de las histonas puede representar un mecanismo enzimático para modular la interacción entre las histonas y el ADN (85,5).

Si bien se cree que el proceso de acetilación modifica en -- cierta medida la estructura de la cromatina, este efecto es poco apreciable, quizás por falta de resolución de los métodos empleados. Una idea razonable es que las interacciones de las regiones N-terminales básicas de las histonas del 'core' están involucradas en la generación del superenrollamiento de 34 nm de diámetro de los nucleosomas y entonces la acetilación de las histonas acc--túa a este nivel de estructuración de la cromatina. El esquema -- que se ha propuesto (Fig. 13), está basado en la asunción de que la forma estructural básica de la cromatina inactiva es el superenrollamiento de 34 nm. Todas las estructuras de la cromatina de orden superior son también genéticamente inactivas. La transición de la cromatina inactiva a activa involucra la desestabilización

MODELO REPRESENTANDO LAS PRINCIPALES TRANSICIONES ESTRUCTURALES DE LA CROMATINA

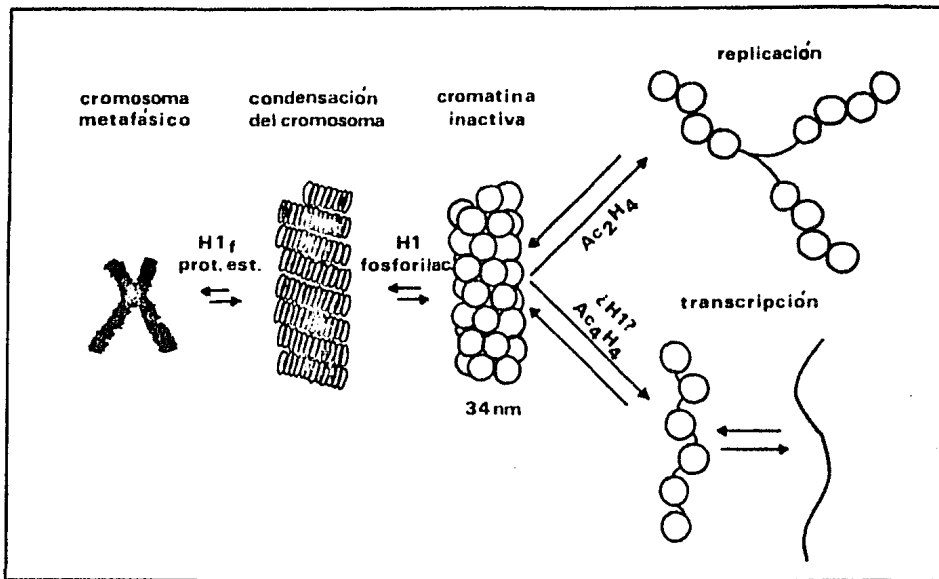


Fig.13 Los diferentes estados estructurales se muestran en forma diagramática.(76).

de este superenrollamiento y su transición a una serie de nucleosomas. Este proceso requiere la acetilación de las regiones N-terminales de las histonas del 'core' y el posible desplazamiento de la histona H1. No está claro en esta etapa si la transición de la cromatina activa requiera del completo desdoblamiento del ADN a su forma lineal o si la RNA-polimerasa pueda esquivar o utilizar nucleosomas en el momento de la lectura del ADN. La conservación de la secuencia rígida de las histonas H3 y H4 puede requerirse para aspectos funcionales de los cromosomas además de sus papeles estructurales más obvios. La condensación del cromosoma está controlada por la fosforilación de H1 y pueden estar involucradas -- también proteínas de 'sostén' en la estructura del cromosoma metafásico. Sobre todo, el esquema provee explicaciones para diversas observaciones sobre el comportamiento estructural de la cromatina, coordinando tanto la fósforilación como la acetilación y sus efectos sobre la estructura del cromosoma (76,5).

B Fosforilación

La fosforilación de la partícula H1 ocurre en múltiples sitios. Si bien esta fosforilación es menos dependiente de hormonas (cuya regulación es independiente del ciclo celular), casi toda la fosforilación de H1 está relacionada con el ciclo celular. La principal fosforilación de H1 se ha observado durante la fase S, cuando la replicación del ADN y casi toda la síntesis de H1 se -- presentan, así como durante la fase G2 tardía, inmediatamente antes del inicio de la metafase. En células que se dividen, la fosforilación en fase G2 responde principalmente a las fosforilacio-

nes en las moléculas de la histona H1, pero la fosforilación en fase S es sólo una fracción substancial. Una modesta cantidad de fosforilación ocurre en la fase G1 tardía. Ya que todavía no se entiende el papel exacto de la fosforilación, se ha propuesto que la fosforilación de la histona H1 en la fase G2 tardía está relacionada con la condensación del cromosoma y con la iniciación de la mitosis por coincidencia de los dos eventos. La fosforilación de la histona H1 se ha observado en la fase S, de manera que coincide con la síntesis de histonas. Incluso se ha observado que el depósito de la histona H5 sobre la cromatina de eritrocitos de pollo está ligado a su fosforilación previa. La fosforilación puede modular las interacciones de la histona y el ADN mientras la cromatina que ha sido recientemente sintetizada se fortalece para originar su estructura natural. Debido a que el nivel general de fosforilación es mucho mayor en G2, el hecho de que los mismos sitios parecen fosforilarse tanto en la fase G2 como en la fase S, provoca que las diferencias fundamentales en los papeles de la fosforilación parezcan menos probables (40,85,58).

Se ha observado que la incorporación de grupos fosfato a las histonas provoca que éstas sean menos efectivas como represoras de la transcripción del ADN. Los experimentos de reconstitución de la cromatina sugieren un importante papel de la fosforilación en la regulación específica de la transcripción génica. La cromatina reconstituida con histonas fosforiladas resulta ser mejor -- plantilla que la reconstituida con histonas no fosforiladas (85).

Parece que la fosforilación, en el caso de la histona H1, es una respuesta a una señal extracromosomal y que ésta inicia enton

ces una transición estructural de la cromatina (condensación del cromosoma), por acción de la histona-cinasa en la fase G2 (95).

Por lo menos una fosforilación está relacionada con la activación génica. En poblaciones celulares en reposo provenientes -- del hígado de rata, se presenta en respuesta a estímulos hormonales, conocidos por activar genes específicos que involucran solamente una porción muy pequeña de moléculas de H1. Las fosforilaciones en otros sitios intramoleculares ocurren en una gran proporción en las moléculas de H1 en células que se encuentran atravesando el ciclo celular, y se ha sugerido que tales fosforilaciones producen cambios en la configuración cromosomal, como los necesarios para la replicación del ADN y para la mitosis (2,64). -- Tal relación entre la fosforilación y la conformación de la cromatina puede ser importante para el control de la organización cromosomal. Si los diversos subtipos de H1 dentro de una célula difirieran respecto al número ó sitios intramoleculares de fosforilación entonces las cinasas específicas para diferentes sitios de fosforilación podrían utilizarse para el control regional selectivo sobre la conformación del cromosoma, provisto de subtipos de la histona H1 que no están distribuidos al azar en la cromatina. Esas diferencias en la capacidad de fosforilarse existen entre -- subtipos de la histona H1, indicado por la observación de que uno de los subtipos de la histona H1 en timo de conejo carece del residuo serilo que es el blanco para la enzima cinasa dependiente -- de AMPc preparada del hígado de rata. Sin embargo no se sabe si este subtipo está contenido en las mismas células como los subtipos fosforilables. En las células HeLa S-3, los niveles más altos

de compactación de la cromatina durante la mitosis están relacionados con los niveles más altos de fosforilación de la histona H1; H1A y H1B contienen más grupos fosfato por molécula e incorporan más P^{32} que en otros periodos del ciclo celular. La mayoría de -- las moléculas de H1 parecen tener de tres a cinco grupos fosfato además de aquéllos presentes en la fase S tardía, y pocos si no -- es que ninguno, se encuentran defosforilados. Entre ambas, H1B se encuentra considerablemente más fosforilada que H1A, juzgada por su velocidad de incorporación de P^{32} y por su movilidad electrofo -- rética; lo que significa que está fosforilada en más sitios, o -- que mayor cantidad de sus sitios están ocupados simultáneamente -- en una molécula, o ambas cosas. En la fase G1 tardía los estados de fosforilación de H1 están en sus niveles más bajos, pero por -- lo menos las moléculas de H1 tienen un grupo fosfato. La mayoría de éstos no pueden tener una vida muy corta, lo que sugiere que -- su influencia sobre la cromatina en este momento es sobre todo -- mantener los estados estructurales más que evocar cambios. Por -- lo tanto, los grupos fosfato en algunos sitios de la molécula de la histona H1 pueden servir para mantener gran parte de la cromatina en conformaciones incompatibles con la transcripción (2,28). Si los subtipos de la histona H1 no están dispuestos al azar en -- la cromatina, tales fosforilaciones subtipo-específicas pueden -- proporcionar explicación del control fino de la organización cromosomal como se requiere para la regulación génica, es decir, una replicación cromosómica y una condensación cromosomal ordenada en la mitosis. Sin embargo, se ha observado que la defosforilación -- posterior no es necesaria para la descondensación postmitótica de

los cromosomas (2).

Sin embargo, no todas las subfracciones de la histona H1 sufren el proceso de fosforilación de la misma manera. En células que no se dividen (inhibidas por Butirato de Sodio), la histona H1° se sintetiza y se deposita sobre la cromatina sin fosforilarse. En cierta medida, el mecanismo y quizá el papel, de la fosforilación de H1° parece diferir de los otros subtipos de histonas H1. Una diferencia en el mecanismo puede representar simplemente enzimas cinasas independientes, o puede reflejar diferencias entre H1° y las otras histonas en la manera en que ellas son transportadas y depositadas sobre la cromatina. El depósito de H1 sobre la cromatina ocurre mientras la histona está en el estado fosforilado. El enmascaramiento parcial de la superficie catiónica de la histona H1 por grupos fosforilo puede permitir un fortalecimiento de la cromatina en una posición apropiada y después la defosforilación puede estabilizar el complejo; mientras tal mecanismo puede tomarse en consideración para las otras histonas H1 en células que se dividen y que no se dividen, es obvio que no puede aplicarse al depósito de la histona H1° sobre la cromatina en células que no se dividen (40).

En células en proliferación, todos los subtipos de la histona H1 están fosforilados en la interfase. Algunos tienen sólo 1 grupo fosfato, otros tienen más de tres. Pero sólo el subtipo H1A tiene una fosforilación que afecta su movilidad electroforética sobre gel de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), además de dos fosforilaciones que no lo hacen. La presencia de subtipos de la histona H1 selectivamente fosforilables en los arreglos celulares espe

cíficos de la cromatina pueden ser importantes para la producción de diferencias entre células y en la organización y función de la cromatina. Sin embargo, ya que la histona H1 de tejidos adultos - se encuentra poco o nada fosforilada, la fosforilación no puede - ser responsable del mantenimiento de la diversidad de la cromatina en células que no se dividen (57).

Sin embargo, los subtipos de la histona H1 no son los únicos que sufren la fosforilación de algunos de sus residuos. Las histonas H2A y H2B se fosforilan en las serinas cercanas al extremo N-terminal. Tanto H1, como H2A, en células cultivadas in vitro, comienzan a ganar grupos fosfato al final de la fase G1; y esta fosforilación de las histonas parece estar ligada al ciclo celular. En fase estacionaria solamente H1, H2A y H2B son las únicas que - ganan grupos fosfato. Por lo tanto la fosforilación depende tanto de la fase de crecimiento celular como de la división de las células (76,36).

Además, la fosforilación de las histonas, al igual que la acetilación, muestra un incremento gradual dentro de los núcleos - de las células neuronales y gliales de rata, relacionado con la edad, sobre todo en las histonas H2B y H3 (85).

El mecanismo más probable de la participación de la fosforilación con el ADN es quizás que el efecto de la fosforilación provoque el debilitamiento del enlace entre la histona H1 y el ADN internucleosomal, permitiendo la formación de interacciones cooperativas nuevas y débiles. También puede provocar un cambio en las interacciones del tipo H1-H1. Estas modificaciones pueden afectar el empaquetamiento de los nucleosomas y promover, por lo tanto, -

la condensación de la cromatina (28).

La fosforilación de las histonas puede ser estimulada químicamente por el 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) conocido como potente promotor de tumores en piel de ratón; el mecanismo molecular de acción del TPA parece radicar en que se enlaza a un receptor de la superficie celular de alta afinidad, saturable que ha sido identificado tentativamente como proteína cinasa C. El TPA ha mostrado activar a las proteínas cinasas dependientes de AMPc tanto en células de ovario de hamster chino (CHO) como de hepatoma H35 (10).

C Metilación

La metilación de las histonas alcanza el pk del grupo epsilon amino, resultando en un incremento en la basicidad de las histonas. La incorporación de los grupos metilo dentro de ciertas histonas está implicada también en el proceso de desarrollo.

La metilación de las histonas, particularmente de H3 y H4 declina gradualmente con el incremento de la edad en ratas. La metilación de las histonas en neuronas de rata joven puede ser el resultado de una división neuronal rápida. La división neuronal se detiene después del desarrollo temprano y concomitantemente con el recambio de las histonas. Entonces la metilación observada después del desarrollo temprano puede presentarse en sitios nuevos. Ya que los grupos metilo sobre las histonas no recambian, el número actual de los residuos lisil-metilados puede incrementarse con la edad, aunque la incorporación de los grupos H_3C^{14} muestre un decremento. La metilación de H3 y H4 que se sabe son las formas -

dominantes de las histonas metiladas es superior en las células inmaduras y decrece significativamente con la edad. La metilación de otras histonas es menor que la de H3 y H4, no varía con la edad. El calcio estimula la metilación de H3 y el estradiol la de H2B. Tales efectos estimulativos distintos por dos efectores diferentes pueden ser de consecuencias distintas sobre la expresión genética (89).

Si bien se ha demostrado que todas las histonas nucleares están sujetas a modificaciones postsintéticas, el significado funcional de tales alteraciones en la estructura de la histona no se ha establecido definitivamente, pero pueden jugar un papel muy importante en la organización de la cromatina durante la replicación del ADN y en la modulación de la estructura del cromosoma en los momentos de la activación de un gen para la síntesis del ARN (85).

**IV EL PAPEL QUE DESEMPEÑAN LAS HISTONAS
DENTRO DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR**

Se piensa que la célula eucariótica es capaz de ejercer control sobre las funciones de su cromatina durante el transcurso de toda su vida. Este grado de control de sus necesidades funcionales provoca: (1) pérdida del alto grado de compactación de los genes activos en la interfase, requerida para el mantenimiento del gen eucariótico dentro de enlaces físicos razonables; (2) un plan preciso de desempacamiento de los segmentos genómicos para propósitos de replicación y después de que la replicación se ha completado; (3) la compactación reproducible en una variedad de estructuras ordenadas de cromosomas mitóticos. Un elemento principal en el control de la organización de la cromatina es la histona uno (H1), que interviene en gran medida en la superestructuración de la fibra de cromatina elemental. Hay múltiples tipos de moléculas de H1. Estas varían en su proporción en los diferentes tejidos y estados de diferenciación de los mismos. Por lo tanto, los subtipos son sintetizados en las diferentes etapas del desarrollo y -- después de la terminación de su síntesis, los subtipos tempranos son retenidos en los cromosomas de las generaciones celulares subsecuentes. En vista de la evidencia que durante la replicación, -- las moléculas de histona preexistentes y recientemente sintetizadas no se mezclan al azar en la cromatina replicada, se ha propuesto que la replicación del ADN ocurre durante este periodo, resultando patrones de distribución de subtipos de histonas en la cromatina difiriendo de una célula a otra; esto puede ser importante en el establecimiento de fenotipos celulares (10).

Por lo tanto, las asociaciones ADN-histonas pueden alterar -- el acceso al ADN por enzimas, así como influenciar su actividad --

transcripcional. Se ha observado que ocurren durante la senescencia relaciones alteradas ADN-histonas y se ha sugerido que estas alteraciones desempeñan un papel en el fenómeno de envejecimiento. Estudios realizados con sistemas animales han demostrado incrementos relacionados con la edad en la desnaturalización térmica de la cromatina, mismos que se han atribuido a un aumento en los enlaces ADN-histonas. En animales viejos, el incremento en los enlaces de histonas está inversamente relacionado con la actividad transcripcional y directamente con los procesos de acetilación y fosforilación de las histonas. También se han observado alteraciones de histonas, relacionadas con la edad, en células semejantes a fibroblastos diploides humanos (FDH). En las FDH, la acetilación de las histonas declina con el aumento de la edad in vitro; los patrones de acetilación/desacetilación de las histonas están alterados en células senescentes y el contenido de por lo menos una especie de histonas disminuye conforme aumenta la edad in vitro. Es posible que las histonas impongan ciertas restricciones sobre el ADN en poblaciones celulares viejas, limitando su acceso y su actividad funcional, ya que se ha observado una reducción en la actividad transcripcional al final de la vida celular (21).

En modelos animales se ha propuesto que los cambios en H1 y en las histonas del 'core', así como sus subsecuentes asociaciones, resulten en la formación de complejos nucleosomales muy fuertes (21).

Tanto las regiones del ADN transcripcionalmente activas como las inactivas están complejadas con histonas en los nucleosomas, pero se han encontrado diferencias estructurales y funcionales en

en ambas regiones. En particular, se han reportado diferencias en el enlace de las subfracciones de histonas a genes activos o reprimidos. Cambios en los subtipos de histonas y cierto grado de fosforilación de las mismas se han observado durante el desarrollo (10).

Debido a la especificidad que muestran las histonas, las variaciones en los niveles de las mismas durante las diferentes etapas de desarrollo entre tejidos de un mismo individuo, deben ser analizadas de una manera individual para las especies que han sido estudiadas:

1 DISMINUCION EN LA FRACCION DE LA HISTONA H1 RELACIONADA CON LA EDAD EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS

El tiempo de vida finito de fibroblastos diploides humanos (FDH) cultivados in vitro es una manifestación del envejecimiento a nivel celular: la relación inversa entre la edad del donador humano y el tiempo de vida in vitro de fibroblastos de piel confirma la validez de usar a los FDH como modelo para el estudio del envejecimiento celular humano (44,71).

Se han sugerido cambios tanto en factores nucleares como citoplásmicos involucrados en el control de la senescencia in vitro, usando técnicas de hibridación citoplásmica. Se han reportado alteraciones en la estructura, actividad enzimática y acetilación de las proteínas cromosomales, pero se sabe poco de los cambios relacionados con la edad en la composición de las proteínas nucleares en los FDH (71,73).

La Hidroxiurea (HU), un inhibidor de la síntesis de ADN cau-

sa acumulación de proteínas nucleares e induce un incremento en el volumen celular de los FDH (71).

Mientras la relación histonas totales/ADN en los FDH permanece sin cambio, se observa un decremento relacionado con la edad en la histona H1 y un incremento en la H4. Si bien no está claro aún cual componente de las proteínas nucleares en los FDH senescentes está relacionado primariamente con el retraso en la síntesis de ADN y/o un fenotipo alterado con el envejecimiento, no se debe subestimar el significado del decremento de H1 durante el envejecimiento celular, ya que existen reportes que demuestran un decremento en la cantidad de H1 acompañado de una alteración en la actividad génica y en la capacidad proliferativa de las células (71,83).

Se ha sugerido que las histonas desempeñan un papel como proteínas elongadoras de la cadena de cromatina eucariótica y que la velocidad de síntesis reducida podría ser una consecuencia de la disponibilidad solamente de las histonas madres y no de las histonas recientemente sintetizadas (71).

La disminución relacionada con la edad en el contenido de H1 en los FDH se debe principalmente a un decremento in vitro en la biosíntesis de H1 con la edad. Pero es posible que H1 sea reemplazada por otra histona o por otra proteína semejante a esta histona (en un estudio posterior, los autores observaron una acumulación de H1° en las mismas células senescentes). Sin duda, la carencia de H1 en la cromatina puede cambiar la expresión de los genes de los FDH y/o del ADN 'linker' adyacente a los nucleosomas -- susceptible de degradación por nucleasas, dando por resultado una

ruptura de la cadena del ADN (71,83).

2 ACUMULACION DE HISTONA H1° EN CELULAS TRANSFORMADAS INDUCIDAS QUIMICAMENTE A ENTRAR A UN ESTADO DIFERENCIADO Y PERDIDA DE H1 EN CELULAS BLOQUEADAS QUIMICAMENTE EN FASE S POR DROGAS

Las células de neuroblastoma de ratón N2n muestran normalmente una morfología de células redondas pobremente diferenciadas. - El tratamiento de estas células creciendo en cultivo celular con agentes como el Butirato de Sodio, Dimetilsulfóxido (Me_2SO), Bis-acetamida de Hexametileno ó 1,6-Dibutiril Adenosina 3;5'-Monofosfato ($\text{Bt}^2\text{-AMPc}$), provoca la inhibición de la división celular, la diferenciación morfológica y una variedad de cambios bioquímicos y biofísicos que vuelven a estas células similares a las neuronas cultivadas in vitro. Entre dichos cambios se encuentra la acumulación de H1°, durante el periodo donde se estanca la síntesis del ADN y cuando las células se acumulan en el estado de reposo de la fase G1. Por lo tanto, la inhibición del crecimiento de estas células parece ser una condición que está acompañada por una acumulación de H1°. Además el bloqueo en la síntesis de ADN inducida por el Butirato de Sodio puede revertirse transfiriendo las células a un medio de cultivo sin inductor, siendo automática la disminución del nivel de H1°. Esto indica que la acumulación de este tipo de histona probablemente desempeñe un papel crucial en la diferenciación celular (77,79,41).

Los mecanismos de acumulación de H1° en las células de neuroblastoma de ratón difieren con cada inductor de inhibición de la síntesis del ADN. El Butirato de Sodio es el doble de efectivo --

que el Me_2SO para alcanzar los niveles de H1° . El Butirato de Sodio aumenta la síntesis de H1° y disminuye la velocidad de degradación así como su recambio y acelera la degradación de la fracción Hlab . El Me_2SO aumenta ligeramente la síntesis de H1° y modestamente el recambio de H1° y también acelera la degradación de Hlab . El cese en la síntesis de ADN es posiblemente la señal o mecanismo de modulación para que H1° empiece a acumularse. Entonces el mecanismo de acción de los inductores es mediante la modulación de las fases sintética y degenerativa del recambio de H1° -- (mediante proteólisis a diferentes velocidades basadas en determinantes específicos en los substratos, o mediante una proteólisis no específica en la accesibilidad de las proteínas del substrato) (41).

En la línea celular humana HeLa también se ha encontrado que las histonas H1 contienen varias especies moleculares y que la combinación de estas subfracciones varía de acuerdo al estado de crecimiento en que se encuentren dentro del cultivo celular. H1 se presenta en niveles que están relacionados inversamente con la velocidad de división celular. por lo que se piensa que suprime la replicación génica. Sin embargo, el contenido de H1° no es una característica de ciertas células estáticas que resultan estar incrementándose dentro de tejidos mitóticamente inactivos, pero los cambios en los niveles de H1° están asociados con una variación funcional en las células individuales (77).

En las células de eritroleucemia Friend transformadas por virus (FL), aparece una proteína cromosomal llamada IP 25 (nombre dado a las proteínas que en este sistema resultan incrementarse -

cuando las células se estimulan para diferenciarse con inhibidores de la síntesis del ADN. Si bien la IP 25 y H1° de todas las especies pueden no ser idénticas se sugiere que IP 25 y H1° pertenecen a la misma familia de proteínas) en la fase temprana de diferenciación y parece estar asociada con las regiones de la cromatina que no se transcriben. Sin embargo parece inverosímil que esté desempeñando un papel en la regulación de la actividad génica específica, más bien, dada su localización en las regiones internucleosomales de la cromatina que no se transcribe, parece que desempeña un papel en la estructura secundaria de la cromatina o en el apagado de genes que no se requieren para las etapas postreplicativas finales de la diferenciación eritroide (17,52).

En las líneas celulares de mamífero: de eritroleucemia de ratón de linfoma el-4 y de linfoma S-49, se ha encontrado que la adición de H1 en concentración de 10 mcg/ml incrementa el número de células en cultivo y estimula la división celular (también la histona H2A), mientras que la concentración de 100 mcg/ml provoca una inhibición de la división celular. Parece entonces que a niveles bajos de H1 la síntesis de ADN se estimula en virtud de la creación de sitios adicionales de iniciación de la replicación -- que origina replicones de tamaño promedio pequeño. Esto significa que H1 estimula la síntesis de ADN en células individuales y que el aumento en el nivel de síntesis de ADN en las células tratadas con H1, en comparación a las no tratadas, no se debe meramente a una mayor proporción de tales células en la fase S. Pero no debe argüirse que la H1 promueva la permeabilidad de la célula a nutrientes y a factores de crecimiento presentes en el medio, por--

que las histonas ricas en lisina que promueven la división celular no son efectivas en promover la captura de proteínas. No transcurre un largo periodo de tiempo antes de que H1 afecte la división celular sugiriendo que H1 no actúa simplemente afectando el nivel de pérdida de algún material en el medio de cultivo en un periodo prolongado de cultivo (53).

En la línea celular de ovario de hamster chino (CHO) sincronizada en fase S, también se ha observado que la cromatina sufre cambios estructurales substanciales durante el bloqueo en fase S temprana por HU o por falta de isoleucina. Ya que H1 es degradada fácilmente por proteasas y no hay evidencia de algún almacén citoplásmico de H1, parece ser que la histona H1 es degradada en la célula. Durante el tiempo en que la histona H1 se va perdiendo, la cromatina parece sufrir una reorganización estructural. Después de 10 horas de permanecer bloqueada la síntesis de ADN con HU, la nueva cromatina que se sintetiza durante este periodo origina nucleosomas con una longitud repetitiva menor (es decir los "core"s están más próximos) que antes de efectuar el bloqueo con HU y esta cromatina resulta ser más resistente al ataque por nucleasa micrococcal. La disminución en el nivel de la histona H1 se debe posiblemente a una síntesis de reemplazo muy pobre de esta histona después de haber sido degradada por proteasas. Un estimado indica que hay una molécula de histona H1 por cada 2.8 nucleosomas en las células inhibidas en fase S temprana por HU, mientras que en células creciendo exponencialmente la relación es de 1 por cada dos nucleosomas. Además, otras evidencias indirectas sugieren que la histona H1 se pierde primero en aquellas regiones de la cromatina

tina que contienen ADN nuevo (de tal manera que la cromatina nueva contiene menos o una molécula de histona H1 por cada siete a diez nucleosomas): (1) la longitud repetitiva de la nueva cromatina es menor de lo normal después de 10 horas con HU, pero como la histona H1 se pierde, casi toda la cromatina se organiza con una longitud repetitiva más pequeña; (2) el promedio de esta longitud nucleosomal de la nueva cromatina en las células bloqueadas con HU por 10 horas es menor o igual al normal (166-168 pares de bases) requerido para la estabilidad del platisoma, que contiene H1 e histonas del 'core'. Además, como la pérdida de la histona H1 en células bloqueadas con HU excedió por mucho a la síntesis de ADN nuevo, parece ser que durante las etapas tempranas de iniciación de la replicación (o antes de que pase la horquilla de replicación), la histona H1 se disocia (por cualquier mecanismo) de las unidades de replicones iniciadas en la cromatina, y que la H1 no se reasocia con la cromatina recientemente replicada de una manera concertada hasta que la horquilla de replicación ha pasado (posiblemente el equivalente de 40 a 80 nucleosomas) o hasta que el replicón completo ha sido replicado. La replicación en células eucarióticas está acompañada por la iniciación bidireccional de conjuntos de unidades replicativas llamadas replicones. Se ha estimado que por lo menos 25 conjuntos de replicones iniciados en secuencia son necesarios para mantener una velocidad de síntesis continua del ADN durante la fase S en células de mamífero. Si la histona H1 se pierde de la cromatina durante la iniciación de un replicón, se puede observar una pérdida inicial de la histona H1 de aproximadamente el 4% que puede incrementarse hasta aproximada

mente el 8% en células perfectamente sincronizadas donde la histona H1 no se reasocia con el ADN hasta que la replicación del replicón está terminada. Si otro conjunto de replicones fueran a encenderse a aproximadamente el mismo tiempo que la primera se completa, su H1 disociada y la histona H1 sintetizada de novo pueden ser capaces de reasociarse con el replicón que se ha terminado -- (18,19,16).

El mecanismo de acción de la HU consiste en inhibir a la enzima ribonucleótido-reductasa. Sin embargo, la HU no es el único inhibidor de la síntesis del ADN. También se observa una disminución del contenido de la histona H1 y cambios en la estructura de la cromatina en células CHO con tratamientos similares a la HU, efectuados con 5-Fluorodesoxiuridina (5-FdU) y Afidicolina (APC). La 5-FdU interfiere con la metilación del desoxiuridilato en la biosíntesis del Timidilato y la APC inhibiendo a la enzima ADN-polimerasa alfa. No obstante de los diferentes mecanismos de acción que utilizan estas drogas, los cambios en la estructura de la cromatina y el proceso de disociación-asociación de la histona H1 -- son factores críticos en los procesos de amplificación de genes e intercambio de cromátidas hermanas (16,15).

3 DISMINUCION EN EL CONTENIDO DE LA HISTONA H1 EN ANFIBIOS Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE GENES ESPECIFICOS

Las histonas en la forma de nucleosomas juegan un papel en la represión de los genes del ovocito (que codifican para el ARN 5S ribosomal) de Xenopus leavis, en la cromatina celular somática

ya que cualquier perturbación de la cromatina que remueve o degrada a la histona H1 provoca que los genes del ovocito sean más accesibles a ser activados por factores de transcripción adicionales. Estos resultados conducen a la siguiente interpretación del estado de los genes para el ARN 5S en la cromatina celular somática. Los genes para el ARN 5S somáticos están en complejos con --- transcripción activa que asemejan a aquéllos formados in vitro -- con extractos crudos. Los genes del ovocito no están complejados con esos factores (unas proteínas de 40 Kd). Están representados por moléculas (histonas en una conformación nucleosomal) que previenen que factores adicionados se asocien con estos genes. Los genes que transcriben para el ARN 5S del ovocito pueden activarse por perturbación de la cromatina, son estables pero no están reprimidos irreversiblemente. Un gen para el ARN 5S es programado en un complejo de transcripción activo y es relativamente resistente a la adición de histonas, mientras que un gen reprimido no se activa por la adición de factores de transcripción. En otras palabras, los estados reprimido y activado de los genes para el ARN 5S no están en equilibrio in vitro. En conclusión, los factores para una transcripción positiva interactúan específicamente con genes para activarlos, mientras otros genes son 'apagados' -- por la acción de represores generales, posiblemente histonas en forma de nucleosomas. Este modelo sugiere que los nucleosomas pueden complejar al ADN, incluyendo las regiones de control de ciertos genes, que no están programadas activamente en los complejos de transcripción. Además, cuando se compleja con histonas, casi todo el ADN de las células eucarióticas se vuelve 'invisible' a --

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

la ARN-polimerasa eucariótica y por lo tanto, la transcripción es específica y diferencial de un núcleo eucariótico tomaría lugar mediante la reducción del número de sitios de enlace disponibles -- (lo que se llama nivel de ruido) para la polimerasa en un núcleo, a la vez que importantes genes específicos se marcan para la transcripción (9).

4 LA HISTONA H5 Y SU CAPACIDAD DE REPRESION GENICA EN CELULAS ERITROIDES DE AVES

Se sabe que la histona H5 reemplaza parcialmente a la histona H1 en eritrocitos maduros de aves y que este proceso coincide con la heterocromatización del núcleo, por lo que se ha sugerido que la histona H5 (que guarda una homología estructural con H1^o) pueda ser un fuerte inhibidor de la transcripción (un 'superrepressor') más que la histona H1 en aves. La remoción de la histona H5 de la cromatina provoca un aumento en la actividad de plantilla de la misma, siendo considerablemente mayor que cuando se extrae la histona H1. La histona H5 inhibe la transcripción de la cromatina reconstituída de una manera más poderosa que la histona H1 cuando se agrega en una cantidad equimolar. Sin embargo, se ha demostrado que la histona H5 está presente en grandes cantidades en células eritroides inmaduras donde la síntesis de ARN es intensiva. Puede concluirse entonces que las propiedades represoras de la histona H5 difieren entre células maduras e inmaduras. Se ha sugerido que la presencia de la histona H5 en las células eritroides inmaduras está de algún modo 'enmascarada' de tal manera que

no exhibe su capacidad potencial para restringir la transcripción de la cromatina. Además, la histona H5 proveniente de eritroblastos inhibe la transcripción en la misma magnitud que la histona H1, mientras que la H5 de eritrocitos maduros es un inhibidor más potente. Las diferencias observadas en las propiedades inhibitorias de la histona H5 de células eritroides maduras e inmaduras pueden explicarse por la diferencia en sus grados de fosforilación. Se ha mostrado que la histona H5 de eritrocitos maduros está menos fosforilada que la de las células inmaduras. La fracción más fosforilada de la histona H5 es un inhibidor débil de la transcripción, en comparación con la menos fosforilada. Lo anterior muestra que la capacidad como represor de la histona H5 depende del grado de fosforilación y éste a su vez depende del estado de maduración de las células eritroides. Entonces, la histona H5 debe ser vista como un factor cromosomal que desempeña un papel importante en la inactivación masiva del genoma en los eritrocitos de aves que se encuentran en proceso de maduración. Es posible que este mecanismo de acción de las histonas ricas en lisina sea a través de la agregación de los filamentos de cromatina y el funcionamiento de las histonas sería en dos pasos: (1) acumulación en los eritroblastos tempranos de la histona menos activa (fosforilada), permitiendo a la cromatina que permanezca relativamente difusa para que proceda la síntesis de ARN, y; (2) defosforilación de la histona H5 que provoca una rápida agregación de la cromatina y un decremento progresivo de su transcripción en el eritrocito conforme madura (33,91).

5 CAMBIOS EN LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 RELACIONADOS CON LA EDAD EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATON

Desde hace tiempo se sabe que ocurren cambios significativos en función de la edad en las propiedades fisicoquímicas y en la composición de la cromatina de ratón, por lo menos en tejidos que esencialmente no se regeneran como el cerebro. Entre los tipos de cambios que se han reportado están: (1) aumento de la estabilidad térmica de la cromatina con la edad; (2) disminución dependiente de la edad en el contenido relativo de las proteínas no histónicas y del ARN; y (3) formación de enlaces más poderosos, relacionados con la edad, entre las histonas y el ADN. Además, hay evidencia de una represión general, relacionada con la edad en la transcripción. En consecuencia, si la estructura y función de la cromatina están alteradas con la edad, las implicaciones para la célula y por lo tanto para el organismo, son potencialmente enormes (34).

A Incremento en la fracción de la histona H1° en función de la edad en cerebro de ratón

La cantidad de la histona H1° se incrementa aproximadamente en un 20% en tejidos cerebrales viejos en comparación con los mismos tejidos provenientes de ratones jóvenes (34).

B Niveles de la histona H1 y de H1° dependientes de la edad en el hígado de ratón

En el hígado de ratón, dos de los principales subtipos de la histona H1 que se encuentran presentes una semana después del nacimiento, H1A y H1B, declinan hasta niveles casi indetectables entre las ocho y 16 semanas de vida, y un tercer subtipo, H1D también disminuye. Los niveles de los dos subtipos de H1, H1E y H1°, se incrementan marcadamente al igual que el nivel de H1C. La desaparición de la histona H1A es casi completa alrededor de la cuarta semana, mientras que el declive en H1B ocurre marcadamente entre las cuatro y 16 semanas, cuando casi todas las células no se dividen (56).

La histona H1° no se sintetiza en el hígado embrionario de ratón, pero después del nacimiento, se ha observado la presencia de esta actividad (82,75).

Para investigar si la histona H1° puede desempeñar un papel en el control génico o del desarrollo, Roche y cols., aislaron -- del tejido hepático de ratón adulto el gen que codifica para la alfa-fetoproteína (que se expresa en el tejido embrionario pero es rápidamente reprimido después del nacimiento) y encontraron que se asocia preferencialmente con la histona H1° para originar nucleosomas. También realizaron el mismo procedimiento para el gen que codifica para la Albúmina (proteína que es expresada en el tejido embrionario y en el adulto) y encontraron que éste no se asocia a la histona H1°. Estas observaciones apoyan el papel de la histona H1° en el control de la expresión génica durante el desarrollo. Además, durante la maduración, la represión que sufre el gen que codifica para la alfa-fetoproteína, ocurre concomitantemente con el aumento en el contenido de la histona H1°; mientras -

que el nivel de la histona H1 se mantiene constante solamente --- cuando la cromatina está activa (82,20).

Se sabe que el hígado es un órgano con células altamente diferenciadas, por lo que manifiestan poca actividad proliferativa sino es que nula, una vez que ha madurado. Pero cuando se les obliga a dividirse por una hepatectomía parcial, se ha observado que la presencia de la histona H1° está regulada durante la regeneración de este tejido, pues la fracción de H1° disminuye aproximadamente una tercera parte de su nivel original cuando el tejido empieza a dividirse, en comparación al mismo tejido en reposo y continúa disminuyendo conforme aumenta la proliferación, sugiriendo que la regulación de la histona H1° durante la regeneración está asociada con eventos postreplicativos (terminación del proceso de diferenciación ó mantenimiento de un estado diferenciado) más que con la regulación de la proliferación. El mecanismo por el cual se pierde la histona H1° del tejido en regeneración posiblemente ocurra mediante una dilución de la proteína en las células hijas debida a la proliferación celular (35).

Es posible que el hígado al ser un órgano tan complejo pierda capacidad funcional por la acumulación de la histona H1° con la edad, en la cromatina de sus células. La histona H1° puede ocasionar que el ADN de los nucleosomas esté reprimido y no pueda ser transcrito. Pero esta represión selectiva (y progresiva) a nivel de la cromatina puede ser una característica común de una inactivación postmitótica debida al desarrollo del núcleo celular durante el envejecimiento (68,75).

C Cambios en la cantidad de la histona H1° en glándulas de ratón

En las glándulas que requieren hormonas específicas para su mantenimiento y actividad, se ha observado que la histona H1° se pierde cuando se les priva de su hormona correspondiente y reaparece después de que la hormona se les inyecta a los ratones otra vez. Esta regulación ocurre en ausencia de proliferación, pues la división celular es dependiente de hormonas. Entonces, debe existir un mecanismo activo para la remoción de la histona H1°, o puede ser que la histona H1° recambie continuamente en las células, con una síntesis dependiente del nivel de la hormona (35).

D Incremento en la subfracción de la histona H1° relacionado con la edad en el bazo de ratón

Si bien la histona H1° se acumula en la cromatina del bazo de ratones viejos, este proceso no es tan evidente como en el hígado. Esto muestra que la histona H1° tiene un patrón específico para cada tejido (68).

El hecho de que las células provenientes del bazo presenten muy poca cantidad de histona H1° o carezcan de ella puede deberse a que sus células son altamente proliferativas, pero la fracción de la histona H1 permanece invariable con la edad. Sin embargo, en la cepa de ratón MRL/MPJ -lpr/lpr, que desarrolla cambios funcionales en el sistema inmune con la edad, se ha observado un incremento en la subfracción H1A y un decremento concomitante en la de H1B, lo que implica la existencia en esta cepa de una conexión directa con cambios funcionales (75).

E Niveles de histona H1 y de H1° en corazón de ratón y su relación con la edad

La histona H1° en el corazón murino aumenta con la edad mientras la subfracción H1A disminuye, del mismo modo que en el cerebro e hígado de la misma especie (75).

F Niveles de las subfracciones de la histona H1 en pulmón de ratón

Las histonas H1A y H1B presentes una semana después del nacimiento, declinan a cerca de niveles no detectables entre la octava y 16a semana de vida, la histona H1D también disminuye. Las cantidades de los otros dos subtipos de la histona H1, H1E y H1° se incrementan marcadamente y H1C más levemente. H1A disminuye cuando se cultivan células que originalmente estaban en reposo (56).

6 CAMBIOS DEPENDIENTES DE LA EDAD EN LOS NIVELES DE HISTONAS
PROVENIENTES DE DIFERENTES TEJIDOS DE RATA

A Acumulación de la histona H1° sobre la cromatina durante el desarrollo de hígado de rata

El bien conocido patrón de desarrollo del crecimiento proliferativo y la maduración del hígado de rata proveen un buen modelo para el delineamiento de la relación de las histonas sobre todo de la H1° con la replicación celular y con la diferenciación. Además, el crecimiento proliferativo del hígado de ratas neonata-

les puede detenerse prematuramente in vivo con drogas (Arabinósido de Citosina, etc.) u hormonas (Dexametasona, etc.) que tienen efectos diferentes sobre la maduración del hígado (54).

Las histonas totales extraídas de la cromatina del hígado -- tanto de ratas jóvenes como de las viejas no muestran ninguna diferencia detectable relacionada con la edad. Sin embargo, cuando se extrae a la histona H1 por separado se observan diferencias en los patrones electroforéticos de las subfracciones entre la histona H1 proveniente del tejido joven en comparación con las provenientes del hígado de ratas viejas. Estas diferencias se caracterizan por un incremento en la cantidad de histona H1° así como de otra subfracción que es rica en metionina, llamada H1°° (F1°° según la nomenclatura anterior). De acuerdo a estos resultados, se ha inferido que la histona H1° es más importante para mantener la estructura condensada de la cromatina que para desempeñar un papel directo en la represión génica. Sin embargo, las subfracciones de la histona H1 que son específicas de cada tejido pueden -- ser también funcionalmente específicas. Si la subfracción de la histona H1° está realmente relacionada con la inhibición celular entonces el incremento en la proporción de las células que no se dividen en tejidos viejos puede ser responsable de un incremento en la proporción de la histona H1° y viceversa (67,94).

La acumulación de la histona H1° sobre la cromatina durante el desarrollo del hígado de rata parece ser que está condicionada al crecimiento y al proceso de diferenciación. La histona H1° surge cuando el hígado termina su actividad proliferativa basal, durante la primera o segunda semana postnatales, de cualquier mane-

ra alcanza entonces solamente el 35% del nivel adulto y su acumulación ocurre principalmente durante las fases finales de la cito diferenciación del hígado. En hígado de rata en desarrollo, la -- terminación de la división celular activa, quizás provoque la acu mulación de la histona H1°, pero otro proceso de desarrollo es so breimpuesto para la acumulación de la histona H1° en el nivel a-- dulto. El hecho que la histona H1° se acumule principalmente des-- pués de que ha cesado el crecimiento proliferativo, parece suge-- rir también que la inducción de la histona H1° sigue, más que pre cede, al paro de la replicación del ADN. La histona H1° no se in-- crementa progresivamente con el paso del tiempo; hay momentos en que muestra mesetas constantes, estos momentos se presentan duran te la proliferación celular hepática intensa y al principio de la mitosis acitocinética originando la binucleación; sugiriendo que la síntesis de ADN disminuye la acumulación de la histona H1° en relación a otras histonas. Esto podría deberse a un decremento en la velocidad de síntesis de la proteína, a un depósito más lento sobre la cromatina, ó a un incremento en la velocidad de recambio. Además, puede reflejar un incremento selectivo en otras histonas durante las fases de crecimiento proliferativo (54).

Cuando se ocupan agentes citostáticos como el Arabinósido de Citosina (Ara C) o inhibidores de la síntesis del ADN hepático co mo la hormona glucocorticosteroide Dexametasona, se ha observado que ambas drogas suprimen la replicación del ADN e inducen la acu mulación de la histona H1° en núcleos hepáticos. Lo anterior mues tra que el cese de la replicación del ADN per se activa la acumu lación relativa de la histona H1° en el hígado en desarrollo , --

que la inducción de la histona H1° sigue más que precede la inhibición de la síntesis de ADN, por lo tanto, es una consecuencia - más no una causa del cese de la replicación del ADN. La acumulación de la histona H1° inducida por drogas permanece mucho más abajo que en los niveles adultos, lo que apoya la hipótesis de que el proceso de desarrollo está sobrepuesto al cese de la replicación del ADN para la acumulación máxima de la histona H1°. La Dexametasona no es tan capaz como el Ara C para inducir la acumulación de la histona H1°, lo que indica que este proceso de desarrollo difiere de los mediados por hormonas. El patrón de desarrollo de la histona H1° en el crecimiento del hígado de rata y su respuesta a agentes inhibidores del crecimiento es consistente con la actividad de síntesis del ADN, condicionando en parte la acumulación de la histona H1° sobre la cromatina hepática. Sin embargo, es probable que otros procesos involucrados en la expresión de la histona H1° sean activados cerca del momento de la supresión de la división celular activa del hígado y procedan principalmente a través de las fases terminales de citodiferenciación. Por lo tanto, se favorece más un papel de la histona H1° en el mantenimiento más que en la inducción de un estado reprimido. Al final de cuentas la histona H1° puede ser vista como una variante de la histona H1 que se encuentra regulada para el desarrollo como otros productos génicos, que responden tanto a estímulos del crecimiento como de diferenciación. Pero permanece atractivo pensar -- que la histona H1° pueda ser parte importante en las funciones especializadas de restricción al acceso al ADN para la transcripción o replicación (52).

De manera similar que para el ratón, los estudios de hepatectomía parcial en rata dan como resultado un marcado incremento en la cantidad de la histona H1 junto con un decremento de aproximadamente el 50% en la cantidad de la histona H1°. Pero además, se ha observado un incremento en la histona H3 y en la H4 en respuesta a la hepatectomía parcial. Lo que apoya las observaciones anteriores en donde H1° disminuye en tejidos replicándose activamente (32).

B Cambios relacionados con la edad en el patrón de la histona H1° de la cromatina de bazo de rata

La histona H1° proveniente de la cromatina de bazo de ratas Sprague-Dawley muestra un aumento, comparando las ratas viejas -- con las jóvenes (67).

C Acumulación de la histona H1° en páncreas de rata

La histona H1° se acumula en el páncreas de rata durante el desarrollo postnatal y disminuye en cantidad durante la regeneración siguiente a una pancreatectomía parcial (79).

D Acumulación de la histona H1° en núcleos de células completamente diferenciadas de miocardio de rata

El desarrollo postnatal del miocardio de mamífero ofrece un excelente modelo para el estudio de un tipo celular particular bajo ciertas condiciones: cuando está activo en la división celular y más tarde en el desarrollo cuando está completamente diferenciado y mitóticamente inactivo. La síntesis del ADN y la prolifera--

ción de las células del miocardio declinan rápidamente y cesan -- cerca de la tercera semana de desarrollo postnatal. Se ha observado que la cantidad de las cuatro histonas del 'core' y de H1 permanece invariable con la edad de la rata. Sin embargo, el contenido de la histona H1° se incrementa cerca de dos veces en el adulto. El incremento de la histona H1° se observa también en los núcleos de cardiocitos aislados por un procedimiento no enzimático. Este incremento está relacionado con una drástica disminución de la actividad sintética, lo que sugiere que la histona H1° puede -- contribuir a la condensación relacionada con la edad de la cromatina del miocardio, provocando en la rata adulta un cese de la -- síntesis del ADN, así como la proliferación celular (48).

E Variación en los niveles de la histona H1° en células de cerebro de rata en desarrollo

El cerebro de rata en desarrollo es un órgano compuesto por varios tipos celulares con diferentes morfologías y diferentes -- tiempos de diferenciación y de cese mitótico. Esto le hace ser un modelo apropiado para el estudio de cambios cuantitativos en los niveles de la histona H1° en diferentes células en desarrollo. Se ha observado que cuando diferenciadas, las células gliales y las neuronas, contienen histona H1°. Mientras los oligodendrocitos de ratas de 10 días no presentan dicha histona, ésta se encuentra -- presente siempre en las células neuronales de rata de la misma edad. Esta diferencia entre ambos tipos celulares puede relacionarse con el hecho de que las células neuronales están completamente diferenciadas poco después del nacimiento, mientras que en ese mo

mento, los oligodendrocitos permanecen proliferando y adquieren - su estado diferenciado terminal más tarde. Este dato sugiere que la aparición de la histona H1° está conectada de alguna manera -- con el estado de reposo en el cual las células son capaces de expresar sus funciones diferenciadas. La presencia de la histona -- H1° en las células neuronales y gliales después del décimo día -- postnatal muestra cambios con el desarrollo, en células de cere-- bro no fraccionadas, interpretándose como cambios cuantitativos - en la proteína más que cambios en la proporción de tipos celula-- res diferentes en el tejido cerebral. El nivel de la histona H1° relacionado al total de la histona H1 o al de las histonas del co-- re es extremadamente bajo en la etapa embriogénica y después del nacimiento se incrementa gradualmente, alcanzando su máximo nivel después del día postnatal 45^{to}. Por lo tanto, parece ser que las células carecen de histona H1° en la etapa proliferativa embriona-- ria temprana y que la histona H1° aparece cuando las células em-- piezan a cumplir funciones diferenciadas y entran en estado de re-- poso (88).

7 CAMBIOS EN LAS FRACCIONES DE HISTONAS DURANTE LA ONTOGENIA BOVINA

La histona H1 hepática (H1A + H1B + H1C) casi se duplica du-- rante el período prenatal bovino y sigue incrementándose durante toda la ontogenia. La histona H1° casi duplica su cantidad duran-- te los periodos prenatal tardío y postnatal. La histona H1° apare-- ce a la altura del octavo mes prenatal y de ahí en adelante aumen

ta su concentración, hasta alcanzar su valor máximo en la vejez. Se piensa que las histonas H1 regulan la actividad génica interactuando con el ADN cromosomal. La expresión génica puede involucrar modificación de las histonas, resultando en un empobrecimiento de su enlace para asociarse al ADN. Esto posibilita una transcripción para originar la síntesis de proteínas dependiente del gen. El incremento en la cantidad de la histona H1 durante el periodo prenatal bovino y la aparición de la histona H1 durante el mismo periodo, reflejan una condensación relacionada con la edad de la cromatina asociada a una reducción relacionada con la edad de la síntesis del ADN y de la actividad como plantilla del mismo. Consecuentemente, la actividad como plantilla puede ser mayor si la etapa de desarrollo es menor. Entonces, las pequeñas partes -- transcripcionalmente activas de la cromatina pueden ser responsables de la expresión específica de las células y éstas pueden ser los sitios para el enlace con las variantes de la histona H1 (80, 92,93).

8 DISTRIBUCION CUANTITATIVA DE LAS FRACCIONES DE HISTONAS EN PLANTAS

Fambrough y Bonner (1966) fueron unos de los primeros investigadores en estudiar las histonas en plantas. Utilizando como modelo los brotes de la planta del guisante, encontraron que dicha planta al igual que el timo de ternera cuenta con tres importantes fracciones cromatográficas: la histona H1, rica en lisina; -- histona del grupo II, rica en lisina pero en menor concentración

que la del grupo I; y las histonas del grupo III-IV, ricas en arginina. Las correspondientes fracciones de histonas de guisantes y de timo de ternera son muy similares en su composición de aminoácidos, tienen idénticos grupos N-terminales y desarrollan propiedades similares cuando se sujetan a electroforesis en geles de poli-acrilamida. Debido a lo anterior, se piensa que las histonas desempeñen funciones idénticas de una manera virtualmente igual -- en todas las creaturas que las contienen. Tales funciones serían la regulación de la expresión génica y consecuentemente la regulación del desarrollo de la planta (25).

Las histonas de la planta del guisante se distribuyen de una manera relativamente diferente a lo largo de sus distintos órganos. La histona H1 es el componente que muestra mayor variación, junto con la histona H2A y la Histona H4. La histona H3 y H2B no muestran variación significativa. Lo que sugiere que histonas específicas regulan genes específicos, esto es, las mismas fracciones de histonas pueden reprimir genes diferentes en células diferentes. Algunas propiedades biológicas de las cromatinas de diferentes órganos del guisante muestran una relación interesante con la distribución cuantitativa de las histonas (27).

Un bajo contenido de H1 en cotiledones de guisante ocurre paralelamente con un radio relativamente bajo histona:ADN de 0.76 y con una elevada actividad de plantilla. Los brotes del guisante, que poseen un contenido de H1 relativamente elevado, también poseen un radio elevado de histonas:ADN (1.30) y una baja actividad como plantilla (6%) (27).

V DISCUSION

El proceso de envejecimiento celular, considerado como el incremento gradual de la incapacidad de la célula a mantener la homeóstasis, debe ser visto, como un evento que abarca el periodo comprendido desde la diferenciación celular hasta la misma senescencia.

Existen varias teorías que pretenden explicar el proceso de envejecimiento celular, unas con más fundamentos que otras, pero todas siempre válidas. Compararlas para elegir la mejor, según -- nuestras convicciones, no resuelve el problema o el objetivo para el cual fueron planteadas; resulta más funcional el tratar de integrarlas en un modelo, si bien sencillo todavía, que muestre relacionados algunos de los aspectos que contribuyen a la pérdida -- progresiva de la homeóstasis celular:

La bien conocida paulatina heterocromatización que sufre el ADN con el transcurso del tiempo, es posible que vuelva más difícil el acceso a las enzimas reparadoras de este material genético, por lo que provocaría que genes con errores fueran transcritos -- produciéndose proteínas alteradas que no tendrían la misma capacidad para el desempeño de sus funciones específicas a tal grado -- que la muerte celular podría sobrevenir por desorganización funcional (Teoría del error catastrófico). Si estos genes fueran redundantes, es probable entonces que copia a copia fueran ocupándose (como forma de amortiguar mutaciones) pero finalmente la última copia del gen podría estar sujeta a los eventos deletéreos anteriores (Teoría del mensaje redundante). Es muy probable que el proceso de heterocromatización se encuentre codificado exactamente en el ADN de eucariotes, por lo que es factible pensar que los

'genes de la muerte' pudieran ser los que expresan a las histonas H1° y/o H5 (teoría de los genes suicidas).

La teoría que goza de más adeptos es la que centra en el material genético la causa del envejecimiento celular debido a una 'programación' extraordinariamente exacta de todos los eventos -- por los que atravesará la célula durante su vida. Dicha programación celular incluye un sistema muy complejo de regulación de estos genes que todavía se desconoce para eucariotes; entonces, parece ser más importante la regulación, que los mismos genes que codifican para cambios específicos en una determinada etapa de la vida celular. Quizás, las histonas sean las que probablemente repriman de un modo inespecífico conjuntos de genes, en el momento de la diferenciación celular, permitiendo la expresión solamente de los necesarios para desarrollar su fenotipo y además, es posible que al ser causantes de la heterocromatización progresiva de la cromatina produzcan el 'apagado' de genes transcripcionalmente activos. Lo que hasta la actualidad han podido comprobar un conjunto de investigadores es que la cantidad de la histona H1° es directamente proporcional a la etapa de desarrollo de los organismos que la poseen y que reprime la transcripción de ciertos genes específicos (32), pero se desconoce el mecanismo de represión inespecífica o específica que pudiera tener si actuara sobre el genoma total de una célula. Sin embargo, dada su localización (4) y debido a que se encuentra involucrada en la organización estructural del ADN de la cromatina, resulta lógico pensar en la histona H1° y en las demás histonas del 'linker' como buenas candidatas para la regulación génica. Además, se sabe que provocan que el ac

ceso al ADN esté más restringido para las enzimas y que la estructura de alto orden está alterada en la cromatina transcripcionalmente activa (42). El desenrollamiento de la cromatina activa puede implicar una disociación selectiva de las histonas del 'linker' según análisis de cromatina fraccionada (42). La disociación de las histonas del linker no se cree que sea un evento primario, sino más bien, que sea uno de los eventos para la activación génica (42). No debe pensarse que la histona H1 cubra directamente los sitios de enlace a la enzima ARN-polimerasa, sino más bien, que la cadena de polinucleosomas puede contraerse ligeramente en función de la concentración de histonas del 'linker', cubriéndose los sitios de enlace a la enzima entre los nucleosomas (42). Entonces, la restricción de los sitios de iniciación sería consecuencia secundaria del efecto de las histonas del 'linker' al cambiar los sitios superficiales periódicos en la estructura parcialmente condensada. Dicho mecanismo de supresión utilizado por las células eucarióticas debe ser extremadamente efectivo y aparentemente único de las mismas. Y puede ser responsable, por lo menos en parte de la supresión génica específica de cada tejido.

Debe existir una estructura supranucleosomal que sea responsable del empaquetamiento de genes que no se expresan específicos de cada tejido; dicha estructura puede ser la base de la supresión o expresión de esos genes en tipos celulares no apropiados. Se ha observado que la histona H1 no se une a genes activos, por lo que se piensa en su actividad como supresora de la transcripción (94).

Estudios de hibridización celular han llegado a la conclu---

sión de que las células que envejecen pueden sintetizar un represor específico o factores senescentes que inhiben la síntesis de ADN y que bloquean a las células en fase G1 del ciclo celular --- (72); es probable que dichos factores que buscan con ahínco sean histonas.

Finalmente, las histonas exhiben una uniformidad (es decir, se encuentran en casi todos los organismos eucarióticos), una relativa carencia de especificidad (dada su conservación evolutiva) (92), una síntesis altamente regulada y una estabilidad de sus genes con la senescencia (ya que no sufren reorganización con la edad) (37), que es probable que participen en el proceso de supresión génica.

A continuación se propone un sencillo modelo que pretende integrar algunos aspectos del envejecimiento celular con la participación de las histonas de la clase I, (Fig. 14).

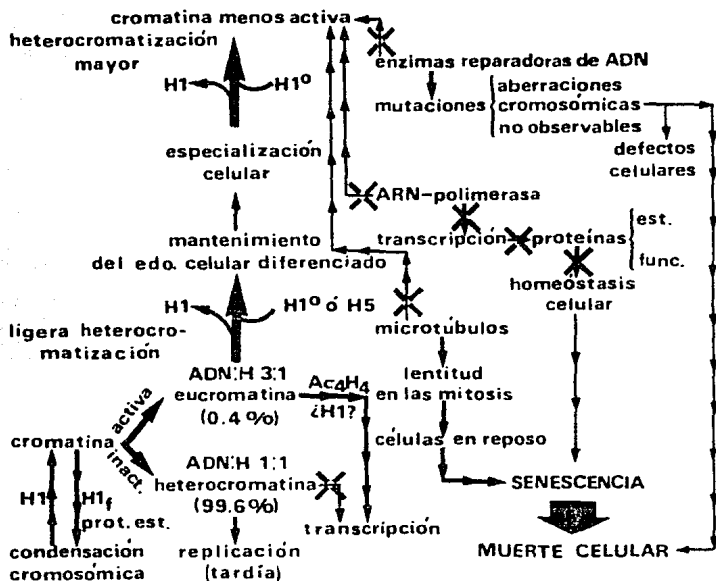


Fig. 14. Esquema que muestra el papel que desempeñan las histonas de la clase I, en el proceso de envejecimiento celular que finalmente conduce a la senescencia y a la muerte celular. El nivel de la histona $H10$ aumenta conforme envejecen las células mientras que el de $H1$ disminuye. Al parecer, estos cambios provocan al principio un mantenimiento del estado celular diferenciado específico, al reprimir genes (todavía no está claro si específica o inespecíficamente) generales y sólo mantener activos los necesarios para que un tipo celular logre su especialización. Pero el aumento paulatino en la concentración de la histona $H10$ puede provocar una heterocromatización progresiva de la eucromatina, lo que originaría en el estado adulto avanzado una pérdida en la capacidad transcripcional de genes necesarios debido a la compactación de la cromatina por el fuerte enlace de la histona $H10$ con el ADN, acarreado como consecuencia una pérdida de la homeostasis celular característica de la senescencia y la muerte celular.

VI CONCLUSIONES

1. El proceso de envejecimiento, entendiendo por el mismo un proceso de desarrollo continuo que se inicia con la concepción y termina con la muerte, es un fenómeno muy complejo y no puede ni debe, ser explicado por una sola teoría reduccionista, sin embargo su estudio, dadas sus características, requiere de -- particularizar primero e integrar después.
2. Las histonas están involucradas en el proceso de envejecimiento celular y sobre todo las histonas de la clase I.
3. La concentración de la histona H1° y de su análoga en aves H5, es directamente proporcional a la edad celular, según muchos investigadores (33,79,80,92,93).

VII BIBLIOGRAFIA

1. Adamson, E.D., Woodland, H.R. "Changes in the rate of histone synthesis during oocyte maturation and very early development of Xenopus leavis". Dev. Biol. 57/136-149 (1977)
2. Ajiro, K., Borun, T.W., Cohen, L.H. "Phosphorylation states - of different histone 1 subtypes and their relationship to --- chromatin functions during the HeLa S-3 cell cycle". Bioch. - 20/1445-1454 (1981)
3. Allan, J., Cowling, C.J., Harborne, N., Cattini, P., Craigie, R., Could, H. "Regulations of the higher-order structure of -- chromatin by histones H1 and H5". J. Cell Biol. 90/279-288 -- (1981)
4. Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C., Avilés, F.X. -- "The structure of histone H1 and its location in chromatin". Nature 288/18/675-679 (1980)
5. Annunziato, A.T., Seale, R.L. "Histone deacetylation is requi red for the maturation of newly replicated chromatin". J. --- Biol. Chem. 258/20/12675-12684 (1983)
6. Baer, B.W., Rhodes, D. "Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes". Nature 301/482-488 (1983).
7. Beaulaton, J., Locksoshin, R.A. "The relation of programmed - cell death to development and reproduction: comparative stu- dies and an attempt at classification". Int. Rev. Cytol. 79/ 215-235 (1982)
8. Brock, W.A., Trostle-Weige, P.K., Williams, M., Meistrich, M. L. "Histone and DNA synthesis in differentiating and rapidly proliferating cells in vivo and in vitro". Cell Differ. 12/47

9. Brown, D.N. "The role of stable complexes that repress and activate eucaryotic genes". Cell 37/359-365 (1984)
10. Butler, A.P., Byus, C.V., Slaga, T.J. "Phosphorylation of histones is stimulated by phorbol esters in quiescent reuber H35 hepatoma cells". J. Biol. Chem. 261/20/9421-9425 (1986)
11. Callaway, J.E., De Lange, R.J., Martinson, H.G. "Contact site of histones 2A and 2B in chromatin and in solution". Bioch. - 24/2686-2692 (1985)
12. Cole, R.D. "A mini review of microheterogeneity in H1 histone and its possible significance". Anal. Bioch. 136/24-30 (1984)
13. Chicoine, L.G., Allis, C.D. "Regulation of histone acetylation during macronuclear differentiation in Tetrahymena: evidence for control at the level of acetylation and deacetylation". Dev. Biol. 116/477-485 (1986)
14. Chicoine, L.G., Wenkwerf, D., Richman, R., Wiggins, J.C., --- Allis, C.D. "Modulation of linker histones during development in Tetrahymena: selective elimination of linker histone during the differentiation of new macronuclei". Dev. Biol. 109/1-8 (1985).
15. Chiu, M.L., Irvin, J.L. "Effect of inhibition of DNA synthesis on histone synthesis, turnover, and deposition in the rat testis". Arch. Bioch. Biophys. 236/1/260-265 (1985)
16. D'Anna, J.A., Crissman, H.A., Jackson, P.J., Tobey, R. "Time-dependent changes in H1 content, H1 turnover, DNA elongation, and the survival of cells blocked in early S phase by hydroxy urea, aphidicolin, or 5-Fluorodeoxyuridine". Bioch. 24/5020--

5026 (1985)

17. D'Anna, J.A., Gurley, L.R., Tobey, R.A. "Synthesis and modulations in the chromatin contents of histones H1^o and H1 during G1 and S phases in chinese hamster cells". Bioch. 21/3991----4001 (1982)
18. D'Anna, J.A., Prentice, D.A. "Chromatin structural changes in synchronized cells blocked in early S phase by secuencial use of isoleucine deprivation and hydroxyurea blockade". Bioch. -22/5631-5640 (1983)
19. D'Anna, J.A., Tobey, R.A. "Changes in histone H1 content and chromatin structure of cells blocked in early S phase by 5---Fluorodeoxyuridine and aphidicolin". Bioch. 23/5024-5029 ----(1984)
20. Delabar, J.M. "Nonrandom location of H1-H1^o histones on chromatin of mouse liver and brain". J. Biol. Chem. 260/23/12622-12628 (1985)
21. Dell'Orco, R.T., Whittle, W.L., Duncan, M.R., Robinson, M.J. "The effects of histones, in vitro age, and culture state on the digestion of DNA by micrococcal nuclease and deoxyribonuclease I". Mech. Ageing Dev. 21/273-282 (1983)
22. D'Incalci, M., Allavena, P. Wu, R.S., Bonner, W.M. "H1 variant synthesis in proliferating and quiescent human cells". --Eur. J. Biol. Chem. 154/273-279 (1986)
23. Djondjurov, L.P., Yancheva, N.Y., Ivanova, E.C. "Histones of terminally differentiated cells undergo continuous turnover". Bioch. 22/4095-4102 (1983)
24. Drescher-Lincoln, C.K., Smith, J.R. "Inhibition of DNA synthe-

- sis in proliferating human diploid fibroblasts by fusion with senescent cytoplasts". Exp. Cell. Res. 144/455-462 (1983)
25. Duncan, M.R., Robinson, M.J., Dell'Orco, R.T. "Histone acetylation and deacetylation in senescent human diploid fibroblasts". Mech. Ageing Dev. 27/173-182 (1984)
26. Fambrough, D.M., Bonner, J. "On the similarity of plant and animal histones". Bioch. 5/8/2563-2569
27. Fambrough, D.M., Fujimura, F., Bonner, J. "Quantitative distribution of histone components in the pea plant". Bioch. 7/575-584 (1968)
28. Fisher, S.G., Laemmli, U.K. "Cell cycle changes in Physarum polycephalum histone H1 phosphate: relationship to deoxyribonucleic acid binding and chromosome condensation". Bioch. 19/2240-2246 (1980)
29. Fleming, J.E., Quattrocki, E., Latter, G., Miquel, J., Marcuson, R., Zuckerkandt, E., Bensch, K.G. "Age-dependent changes in proteins of Drosophila melanogaster". Science 231/1157-1159 (1986)
30. Flynn, J.M., Woodland, H.R. "The synthesis of histone H1 during early amphibian development". Dev. Biol. 75/222-230 (1980)
31. García, J.J., Avalos, M.H. "Biología del envejecimiento". Rev. Mex. Gerontol. 1/9-12 (1984)
32. Garrard, W., Bonner, J. "Changes in chromatin proteins during liver regeneration". J. Biol. Chem. 249/17/5570-5579 (1974)
33. Gasaryan, K.G., Andreeva, N.B., Vishnevskaya, T.Y. "Existence of differences in repressor properties between serine-rich his

- tones (H5, F2c) from immature and mature pigeon erthroid ---- cells". Differ. 10/123-127 (1978)
34. Gaubatz, J., Ellis, M., Chalkley, R. "The structural organization of mouse chromatin as a function of age". Fed. Proc. 38/6/1973-1978 (1979).
35. Gjerset, R., Gorka, C., Hasthorpe, S., Lawrence, J.J., Eisen, H. "developmental and hormonal regulation of protein H1° in - rodents". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79/2333-2337 (1982)
36. Green, G.R., Poccia, D.L. "Phosphorylation of sea urchin ---- sperm H1 and H2B histones precedes chromatin condensation and H1 exchange during pronuclear formation". Dev. Biol. 108/235-245 (1985)
37. Green, L. Whittle, W., Dell"orco, R., Stein, G., Stein, J. -- "Histone gene stability during cellular senescence". Mech. -- Ageing Dev. 36/211-215 (1986)
38. Groppi, V.E., Coffino, P. "G1 and S phase mammalian cells synthesize histones at equivalent rates". Cell 21/195-204 (1980)
39. Gurley, L.R., Walters, R.A., Tobey, R.A. "The metabolism of - histone fractions. Synthesis of histones during the G1 phase of the mammalian life cycle". Arch. Biochem. Biophys. 148/633-641 (1972)
40. Hall, J.M., Cole, R.D. "In nondividing cells, histone H1° is synthesized and deposited onto chromatin without accompanying phosphorylation". Bioch. 25/491-495 (1986)
41. Hall, J.M., Cole, D. "Mechanisms of H1° accumulation in mouse neuroblastoma cells differ with different treatments". J. --- Biol. Chem. 261/11/5168-5174 (1986)

42. Hannon, R., Bateman, E., Allan, J., Harborne, N., Gould, H.,
"Control of RNA polimerase binding to chromatin by variations
in linker histone composition". J. Mol. Biol. 180/1/131-149 -
(1984)
43. Harisanova, N.T., Ralchev, K.H. "Histones and histone acetyla
tion during the embryonic development of Drosophila hydei". -
Cell Differ. 19/115-124 (1986)
44. Hayflick, L. "Biología celular del envejecimiento humano". --
Inv. y Ciencia 42/24-32 (1980)
45. Holliday, R. "The aging process is a key problem in medical -
research". Lancet 2/8416/1386-1387 (1984)
46. Huang, H., Cole, D. "The distribution of H1 histone is nonuni
form in chromatin and correlates with different degrees of --
condensation". J. Biol. Chem. 259/22/14237-14242 (1984)
47. Isenberg, I. "Histones". Ann. Rev. Bioch. 48/159-191 (1979)
48. Jackowski, G. Liew, C.C. "Accumulation of histone H1^o in fully
differentiated myocardial cell nuclei". Cell Biol. Int. Rep.
6/9/867-873 (1982)
49. Jackson, V., Chalckley, R. "Histone synthesis and deposition
in the G1 and S phases of hepatoma tissue culture cells".
Bioch. 24/6921-6930 (1985)
50. Jin, Y., Cole, D. "H1 exchange is limited to particular re---
gions of chromatin that differ in aggregation properties". --
J. Biol. Chem. 261/7/3420-3427 (1986)
51. Jones, R.B., Lumpkin, C.K., Smith, J.R. "A stochastic model -
for cellular senescence. Part I. Theoretical considerations".
J. Theor. Biol. 86/581-592 (1980)

52. Keppel, F., Allet, B., Eisen, H. "Biochemical properties and localization of the chromosomal protein IP25". Eur. J. Bioch. 96/477-482 (1979)
53. Kundahl, E., Richman, R., Flinckinger, R.A. "The effect of added H1 histone and polylysine on DNA-synthesis and cell division of cultured mammalian cells". J. Cell Physiol. 108/291-298 (1981)
54. LaRue, H., Bissonnette, E., Bélanger, L. "Histone H1^o expression during developmental growth of rat liver". Can. J. Biochem. Cell Biol. 61/1197-1200 (1983)
55. Lehninger, A. BIOQUIMICA. LAS BASES MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION CELULAR. 2a. Edición. Ed. Omega, S.A. Barcelona (1982)
56. Lennox, R., Cohen, L.H. "The histone H1 complements of dividing and non-dividing cells of the mouse". J. Biol. Chem. 258/1/262-268 (1983)
57. Lennox, R.W., Oshima, R., Cohen, L.H. "Histone H1 subtypes and their phosphorylated states in non-differentiated and differentiated mouse teratocarcinoma cells and adult tissues". J. Cell. Biol. 91/66a (1981)
58. Lewin, B. GENE EXPRESSION. Vol. 2. Eucaryotic Chromosomes. -- John Wiley & Sons Inc. London (1974)
59. Lezhava, T. A. "Heterocromatization as a key factor in aging". Mech. Ageing Dev. 28/279-297 (1984)
60. Louters, L., Chalkley, R. "Exchange of histones H1, H2A, and H2B in vivo". Bioch. 24/3080-3085 (1985)
61. Macieira-Coelho, A., Azzarone, B. "Aging of human fibroblasts

- is a succession of subtle changes in the cell cycle and has a final short stage with abrupt events". Exp. Cell Res. 141/325 332 (1982)
62. Makrides, S.C. "Protein synthesis and degradation during ---- aging and senescence". Biol. Rev. 58/343-422 (1983)
 63. Marashi, F., Baumbach, L. Rickles, R. Sierra, F., Stein, J.L., Stein, G.S. "Histone proteins in HeLa S3 cells are synthesi-- zed in a cell cycle stage specific manner". Science 215/683--685 (1982)
 64. Matsumoto, Y., Yasuda, H., Mita, S., Marunouchi, Y., Yamada, M. "Evidence for the involvement of H1 histone phosphoryla--- tion in chromosome condensation". Nature 284/181-183 (1980)
 65. Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L. Mohun, T. "Expression and organization of histone genes". Ann. Rev. Genet. 17/239-277 --- (1983)
 66. Medvedev, Z. "Age changes of chromatin. A review". Mech. Ageing Dev. 28/139-154 (1984)
 67. Medvedev, Z.A., Medvedeva, M.N., Huschtscha, L.I. "Age changes of the pattern of F1 histone subfractions in rat liver -- and spleen chromatin". Gerontol. 23/334-341 (1977)
 68. Medvedev, Z.A., Medvedeva, M.N., Robson, L. "Tissue specifici ty and age changes of the pattern of the H1 group of histones in chromatin from mouse tissues". Gerontol. 24/286-292 (1978)
 69. Miquel, J. "Ciencia y ficción". Mundo Científico 1/794-804 -- (1981)
 70. Mithieux, G., Alquier, C., Roux, B., Rousset, B. "Interaction of tubulin with chromatin proteins".-J. Biol. Chem. 259/15523

15531 (1984)

71. Mitsui, Y. Sakagami, H., Murota, S., Yamada, M. "Age-related decline in histone H1 fraction in human diploid fibroblasts - cultures". Exp. Cell Res. 126/289-298 (1980)
72. Murray, M.A., Balcavage, W.X. "Changes in mitochondrial DNA -- during aging". Mech. Ageing Dev. 20/233-241 (1982)
73. Nette, E.G., Sit, H.L., King, D.W. "Reactivation of DNA synthesis in aging diploid human skin fibroblasts by fusion with mouse L karyoplasts, cytoplasts and whole L cells". Mech. Ageing Dev. 18/75-87 (1982)
74. Nicola, P. GERIATRIA. 1a. Edición. Ed. El manual moderno, S.A. de C.V. México, D.F. (1985)
75. Niedzwiecki, A., Lewis, P.N., Cinader, B. "Changes of histone H1 subtypes with aging in strains of mice that possess different immunological characteristics". J. Gerontol. 40/6/695-699 (1985)
76. Padilla, G.M., McCarty, K.S. (eds). GENETIC EXPRESSION IN THE CELL CYCLE. 1st. Edition. Academic Press. N.Y. (1982)
77. Pehrson, J., Cole, D. "Histone H1^o accumulates in growth-inhibited cultured cells". Nature 285/42-43 (1980)
78. Pehrson, J.R., Cole, R.D. "Histone H1 subfractions and H1^o -- turnover at different rates in nondividing cells". Bioch. 21/456-460 (1982)
79. Pieler, C., Adolf, G.R., Swetly, P. "Accumulation of histone H1^o during chemically induced differentiation of murine neuroblastoma cells". Eur. J. Biochem. 115/329-333 (1981)
80. Piha, R.S., Valkonen, K.H. "Changes in liver nuclear histones

- during bovine ontogeny". FEBS Letters. 108/326-329 (1979)
81. Roche, J. Girardet, J., Gorka, C., Lawrence, J. "The involvement of histone H1^o in chromatin structure". Nucleic Acids -- Res. 13/8/2843-2853 (1985)
 82. Roche, J., Gorka, C., Goeltz, P., Lawrence, J.J. "Association of histone H1^o with a gene repressed during liver development" Nature 314/197-198 (1985)
 83. Sakagami, H., Mitsui, Y. Murota, S., Yamada, M. "Effect of -- growth stage on histone H1 metabolism in human diploid fibroblasts". J. Cell Physiol. 110/213-218 (1982)
 84. Schadé, J.P., Ford, D.H. NEUROLOGIA BASICA. la Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. México, D.F. (1976)
 85. Serra, I. Avola, R., Condorelli, D.F., Surrentino, S., Renis, M., Kamiyama, M. Hashim, C.A., Giuffrida, A.M. "Acetylation - and phosphorylation of histones and nonhistone chromosomal -- proteins in neuronal and glial nuclei purified from cerebral hemispheres of developing rat brain". J. Neurochem. 46/1881--1887 (1986)
 86. Smith, B.J., Harris, M.R., Sigournay, C.M., Mayes, B.L.V., -- Bustin, M. "A survey of H1^o-and H5-like protein structure and distribution in higher and lower eukaryotes". Eur. J. Biochem. 138/309-317 (1984)
 87. Smith, B.J., Johns, E. "Histone H1^o: its location in chroma-- tin". Nucleic Acids Res. 8/24/6069-6079 (1980)
 88. Stambolova, M., Simeona, V., Srebrevna, L., Zlatanova, J., --- Tsanev, R. "Histone H1^o in developing rat brain cells". ----- Differ. 28/191-194 (1984)

89. Thakur, M.K., Kanungo, H.S. "Methylation of chromosomal proteins and DNA of rat brain and its modulations by estradiol and calcium during aging". Exp. Gerontol. 16/4/331-336 (1981)
90. Umansky, S.R. "The genetic program of cell death, hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing". J. Theor. Biol. 97/591-602 (1982)
91. Urban, M.K., Neelin, J.M., Betz, T.W. "Correlation of chromatin composition with metabolic changes in nuclei of primitive erytroid cells from chicken embryos". Can. J. Biochem. 58/726-731 (1980)
92. Valkonen, K.H. "Developmental changes in H1 histones from bovine liver". Life Sci. 27/1217-1224 (1980)
93. Valkonen, K.H., Piha, R.S. "Macromolecular relationship of liver nuclei and aminoacid composition of total histones during bovine ontogeny". Comp. Bioch. Physiol. 78A/4/681-685 (1984)
94. Wagner, A.P., Iordachel, M.C., Wagner, L.P. "Age changes in the H1 group of histones from rat liver". Exp. Gerontol. 17/173-177 (1982)
95. Waterborg, J.H., Mathews, H.R. "Control of histone acetylation. Cell-cycle dependence of deacetylase activity in Physarum nuclei". Exp. Cell Res. 138/462-466 (1982)
96. Weintraub, H. "Histone-H1-dependent chromatin superstructures and the supression of gene activity". Cell 38/17-27 (1984)
97. Witten, M. "A return to time, cells, systems and aging: rethinking the concept of senescence in mammalian organisms". Mech. Ageing Dev. 21/69-81 (1983)
98. Witten, M. "A return to time, cells, systems and aging: II.--

- Relational and reliability theoretic approaches to the study of senescence in living systems". Mech. Ageing Dev. 27/323-340 (1984).
99. Wong, M., Allan, J., Smulson, M. "The mechanisms of histone H1 cross-linking by poly (ADP-ribosylation)". J. Biol. Chem. 259/7963-7969 (1984)
100. Wright, B.E., Davison, P.F. "Mechanisms of development and --aging". Mech. Ageing Dev. 12/213-219 (1980)
101. Wu, R.S., Bonner, W.M. "Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells". Cell 27/321-330 (1981)
102. Wu, L.H., Kuehl, L., Reichsteiner, M. "Dynamic Behavior of histone H1 microinjected into HeLa cells". J. Cell Biol. 103/465-474 (1986)