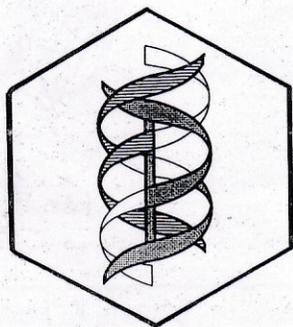


BEB 99

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**ASOCIACIÓN MEXICANA DE
PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C**

Publicación incluida por el Centro de Información
Científica y Humanística de la Universidad Nacional
Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA**
(Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

EDITORES

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO

Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

MARÍA TERESA ELIZABETH FLORES RODRÍGUEZ

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

MARINA GAVILANES RUIZ

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

JAIME MAS OLIVA

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

ELISA SALLES MORA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

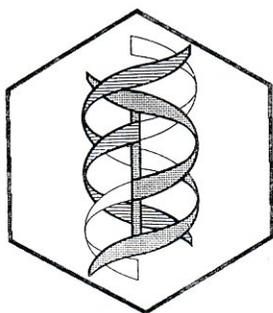
CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS

Unidad de Toxicología Experimental y
Facultad de Ciencias Médicas.
Instituto Superior de Ciencias Médicas
de Villa Clara, Cuba

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

Biotecnología Marina
Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo
de Sonora



Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
UNAM



Facultad de Medicina,
UNAM

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510 México, D.F. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,300 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP-DF-026 1098; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

EDITORIAL

SE INICIAN Y SE REINICIAN SECCIONES EN EL BEB

Con agrado y entusiasmo les informamos que la integración de nuevos miembros al Comité Editorial del BEB empieza a dar los frutos esperados, debido a que hay una evidente ganancia en la diversidad de ideas, orientaciones y temas de interés que los integrantes manejan, lo cual facilita una mejor revisión de los trabajos y puntos de vista muy críticos, permite un contraste muy interesante en el manejo de la información que les transmitimos, aunado a la importante participación que todos ellos tienen en la educación en general, en la educación de la bioquímica y en sus áreas afines en particular. Todo lo cual permite un avance, fortaleciendo las tareas emprendidas por el BEB, creando nuevos horizontes y renovando esfuerzos ya emprendidos por los que nos antecedieron en el proyecto llamado Boletín de Educación Bioquímica.

En el presente número ustedes encontrarán que una nueva sección iniciará, propuesta por el Dr Rafael Moreno Sánchez y a reserva de que el Dr Moreno realice una presentación más completa y dirigida, nosotros podemos adelantar que esta sección cumple con uno de los objetivos más importantes del BEB “apoyar a los profesores de la bioquímica y áreas afines en el proceso enseñanza-aprendizaje”. En esta sección, el profesor de bioquímica encontrará una serie de problemas enmarcados en algún tópico de la bioquímica, con una introducción y la resolución del problema, además de una breve pero concisa discusión de la respuesta, todo ello con alguna bibliografía de apoyo; en donde el profesor podrá tener un sistema para discutir, fundamentar y analizar un tema de la

bioquímica en un contexto diferente y a su vez, el alumno tendrá un reto que superar, donde poner a prueba sus conocimientos y adentrarse en el mundo de la bioquímica.

También en este número encontrarán que retomamos la sección “Del buen decir...” sección que apareció hace varios años y que fue promovida y sostenida por un tiempo por los doctores Homero Hernández, Wilhelm Hansberg y Alberto Huberman, donde de manera sencilla se aclara el uso de diferentes términos que por los problemas de traducción, siempre tenemos que actualizar y adaptar a nuestro idioma, con un compromiso no sólo del buen decir en el idioma español, sino respetando las reglas de las diferentes instituciones que se encargan de la nomenclatura. Esta sección es continuada por el actual Comité Editorial, encabezada por el Dr Marco Antonio Juárez Oropeza, iniciando una tarea que esperamos seguir cultivando con las colaboraciones de todos aquellos interesados, precisamente en el buen decir.

Finalmente, un objetivo que la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A. C. ha tenido durante mucho tiempo, es el apoyar a los profesores de instituciones de provincia en la actualización, sirviendo de catalizador o contacto con especialistas de gran nivel, que impartan pláticas, talleres o conferencias, dentro de los programas de actualización que cada institución contempla. En esta ocasión el Dr Fernando Montiel Aguirre asistió a la Universidad Autónoma de Sinaloa, en la Facultad de Ciencias Químico

Biológicas, invitado por la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C. para impartir una conferencia sobre Clonación.

Esperamos poder continuar con estas importantes tareas, lo cual nos acerca cada vez más a sentirnos satisfechos por la tarea que emprendimos y que queremos continuar, todo

ello para participar en la educación bioquímica en nuestro país, tarea que aún está muy lejana en su conclusión, pero en la cual trabajamos con entusiasmo.

José Víctor Calderón Salinas
Alejandro Zentella Dehesa

FUNCIÓN Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS G

Angeles Rangel Serrano. Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 14-740, México, D F, 07000, MÉXICO.

RESUMEN

El complejo receptor-proteína G-efector es uno de los mecanismos de transducción que permite a las células comunicarse entre ellas y responder al medio ambiente. En este complejo, las proteínas G actúan como transductores de la información extracelular de receptores activados en señales intracelulares que finalmente regulan las funciones celulares de manera específica. En este trabajo se revisa la interacción de las proteínas G con diferentes efectores, sus propiedades bioquímicas y sus posibles formas de regulación.

PALABRAS CLAVE: proteínas G heterotriméricas, proteínas que unen nucleótidos de guanina, regulación de fosfolipasa C, regulación de adenilato ciclasa, regulación de canales iónicos.

ABSTRACT

The receptor-G protein-effector complex is one of the transduction mechanisms that allow cells to communicate among themselves and to respond to the environment. G proteins in these complex transduces extracellular information into intracellular functions in a highly specific manner. This review is focus on the G protein interactions with different effectors, their biochemical properties and posible forms of regulation.

KEY WORDS: heterotrimeric G proteins, guanine nucleotide binding proteins, phospholipase C regulation, adenylate cyclase regulation, ionic channel regulation.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) desempeñan un papel importante en la transducción de señales de las células de eucariotes, a través de regular la generación de segundos mensajeros como nucleótidos cíclicos, lípidos y movilización de Ca^{2+} . Estas proteínas acoplan a más de 100 receptores dis-

tintos para diversos ligandos con efectores intracelulares como la adenilato ciclasa (ADC), la fosfolipasa C (PLC), la guanilato ciclasa y algunos tipos de canales iónicos (1-3). Las proteínas G están conformadas por tres subunidades: α , β y γ . En mamíferos, se han identificado varias isoformas de cada una de las subunidades (Tablas I y II), 21 diferentes para la $G\alpha$, 5 para la $G\beta$ y 11 para la $G\gamma$ (4-7).

Cuando un agonista se une a su receptor, este receptor adquiere una conformación que le permite interactuar con una determinada proteína G que se encuentra en su estado inactivo y se produce un complejo transitorio: (receptor activado $\cdot G\alpha(GDP) \cdot G\beta\gamma$). El acoplamiento del receptor activado con la región carboxilo terminal de $G\alpha$ induce a su vez cambios conformacionales en la $G\alpha$, que conducen a la liberación de GDP de la proteína G y a la unión de GTP. La unión de GTP a $G\alpha$ disminuye la afinidad de esta subunidad por el dímero $\beta\gamma$ y por el receptor, lo que resulta en la disociación del complejo en: receptor activado, $G\alpha(GTP)$ y $G\beta\gamma$. A su vez, el receptor también disminuye su afinidad por el agonista, liberándolo.

Tanto la proteína $G\alpha$ activada (unida a GTP) como el dímero $\beta\gamma$, o ambos (1, 3, 8) pueden interactuar con efectores específicos para modular la producción de los segundos mensajeros. La proteína $G\alpha$ posee una actividad intrínseca de GTPasa, la cual hidroliza el GTP a $GDP + P_i$, con lo cual finaliza la primera fase de la señal de transducción y el ciclo se completa con la reasociación de las tres subunidades (Fig 1).

Las proteínas G pueden ser activadas irreversiblemente por análogos no hidrolizables del GTP tales como $GTP\gamma S$ y $Gpp[NH]p$ (5'-guanilimidobisfosfato). También pueden ser activadas por el fluoroaluminato (AlF_4^-), el cual al unirse

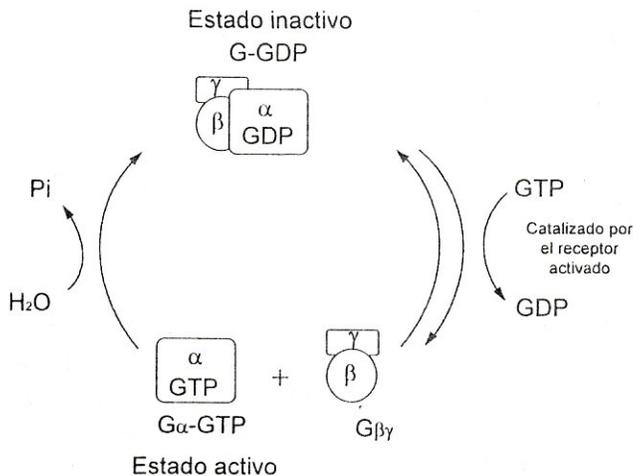


Figura 1. Activación de las proteínas G. La activación del receptor acoplado a las proteínas G provoca el intercambio GDP-GTP en la subunidad α ocasionando la disociación de $G\alpha$ (GTP) (estado activo) de $G\beta\gamma$. La actividad intrínseca de GTPasa hidroliza el GTP llevando a la $G\alpha$ a su estado inactivo. El ciclo es impulsado por el potencial del grupo fosforilo del GTP.

con $G\alpha \cdot GDP$ forma un complejo ($G\alpha(GDP) AIF_4$) que mimetiza el efecto del GTP (9).

CLASIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES $G\alpha$ Y EFECTORES QUE REGULAN

Las proteínas G heterotriméricas se clasifican de acuerdo a la identidad de su subunidad $G\alpha$ en cuatro familias: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ (Tabla I). Las regiones involucradas en la unión al nucleótido y su hidrólisis se encuentran altamente conservadas y las diferencias que se presentan entre las familias de las subunidades α probablemente les confieren propiedades distintas para el intercambio de nucleótido e hidrólisis (1, 2).

Los integrantes de la familia $G\alpha_s$ estimulan a la ADC y por tanto la síntesis de AMPc. El término Gs significó originalmente "G-stimulatory" por su capacidad para estimular la actividad de ADC. Por otro lado, las propiedades de la familia $G\alpha_{i/o}$ son diversas. El nombre de la proteína $G\alpha_i$ provino inicialmente de "G-inhibitory", por su habilidad para inhibir algunas formas de ADC; sin embargo, ahora se conoce que también puede activar canales de potasio. $G\alpha_o$, nombrada originalmente "G-other", porque no se conocía su función, inhibe canales de calcio en neuronas. La proteína $G\alpha_t$, "transduce" las señales visuales a través de la regulación de la GMPc fosfodiesterasa. La proteína $G\alpha_z$ participa en la regulación de ca-

nales de potasio. Por su parte, los miembros de la familia $G\alpha_{q/11}$ que activan la hidrólisis específica de fosfoinosítidos a través de las isoformas β de la PLC, también activan indirectamente los canales de calcio dependientes de voltaje y sensibles a dihidropiridinas, en células pituitarias, vía que involucra a la proteína cinasa C (PKC). Los miembros de la familia $G\alpha_{12/13}$ modulan indirectamente la actividad del intercambiador Na^+/H^+ subtipo NHE1 por diferentes vías (1, 2, 10, 11).

MODIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G POR DIFERENTES TOXINAS

Las subunidades $G\alpha$ contienen un sitio que puede ser ADP-ribosilado, reacción catalizada por la toxina del cólera (CTX) o la toxina pertussis (PTX), por lo que estas toxinas han sido utilizadas como herramientas en la identificación de las proteínas G involucradas en los diferentes sistemas de transducción. La CTX (proteína de 87 kDa producida por la bacteria *Vibrio cholerae*) cataliza la transferencia de un grupo ADP-ribosa desde el NAD^+ a un residuo de arginina de $G\alpha$. El complejo estable formado por (ADP-ribosa- $G\alpha$ (GTP)) inhibe la actividad de GTPasa y la interacción de $G\alpha$ con el dímero $G\beta\gamma$, por lo que al perturbar el mecanismo de desactivación, la proteína G se mantiene en su forma activa; como consecuencia, se mantiene activada la vía de la ADC.

A pesar de que sólo los integrantes de la familia $G\alpha_s$ y $G\alpha_t$ son sustratos de CTX (Tabla I), el residuo de arginina que es ADP-ribosilado por CTX se encuentra altamente conservado entre todas las subunidades $G\alpha$. Posiblemente, en las $G\alpha$ que no son sensibles a la toxina este sitio no sea accesible a CTX (1, 2). Se ha sugerido que los residuos de arginina que son ADP-ribosilados por la CTX pueden ser Arg 187 en $G\alpha_s$, Arg 179 en $G\alpha_{i-2}$ y Arg 178 en $G\alpha_{i-3}$.

La PTX es una proteína de 76 kDa producida por *Bordetella pertussis* (bacteria responsable de la tosferina), que cataliza la ADP-ribosilación específica de $G\alpha$ en un residuo de cisteína que se encuentra en la posición 347 en la $G\alpha_t$, y en Cys 351 en $G\alpha_o$ de la región carboxilo terminal. La ADP-ribosilación de $G\alpha$ inhibe el acoplamiento entre el receptor y las proteínas G, por lo que no se lleva a cabo el intercambio GDP por GTP y se

TABLA I

PROPIEDADES DE LAS SUBUNIDADES α DE MAMÍFEROS				
SUBUNIDAD α	PM (kDa)	DISTRIBUCIÓN	EFECTOR	MODIFICACIÓN POR LÍPIDOS
Familia $G\alpha_s$				
$G\alpha_{s-1}$	52	ubicua	↑ ADC	P ^{a c}
$G\alpha_{s-2}$	52	ubicua	↑ ADC	P ^{a c}
$G\alpha_{s-3}$	45	ubicua	↑ ADC	P ^a
$G\alpha_{s-4}$	45	ubicua	↑ ADC	P ^{a c}
$G\alpha_{olf}$	45	neuronas olfatorias	↑ ADC	P ^a
Familia $G\alpha_{i/o}$				
$G\alpha_{gust}$	41	papilas gustativas	↑ PDE	?
$G\alpha_{i-1}$	39	retina (células en bastón)	↑ cGMP-PDE	M ^{♦ a b c}
$G\alpha_{i-2}$	40	retina (células en cono)		? ^{a b c}
$G\alpha_{i-1}$	41	casi ubicua	↓ ADC	P, M ^{b c}
$G\alpha_{i-2}$	40	ubicua		P, M ^{b c}
$G\alpha_{i-3}$	41	casi ubicua		P, M ^b
$G\alpha_{o-1}$	39	cerebro	↓ Canales de Ca ²⁺	P, M ^{b c}
$G\alpha_{o-2}$	39	cerebro		P, M
$G\alpha_z$	41	cerebro, plaquetas, células de glándulas suprarrenales	↓ Canales de K ⁺	P, M ^d
Familia $G\alpha_{q/11}$				
$G\alpha_q$	41	ubicua	↑ PLC- β	P
$G\alpha_{11}$	41	ubicua	↑ PLC- β	P
$G\alpha_{14}$	42	células de bazo, pulmón, riñón, testículos	↑ PLC- β	P
$G\alpha_{15}$	43	linfocitos B	↑ PLC- β	P
$G\alpha_{16}$	43	monocitos y células T	↑ PLC- β	P
Familia $G\alpha_{12/13}$				
$G\alpha_{12}$	44	ubicua	?*	P ^d
$G\alpha_{13}$	44	ubicua	?*	P ^c

ADC, adenilato ciclasa; PDE, fosfodiesterasa; PLC, fosfolipasa C; PKC, proteína cinasa C; *, participación en crecimiento y diferenciación celular; P, palmitoilación; M, miristoilación; ♦, otras cadenas de ácidos grasos diferentes al palmítico pueden unirse por enlaces tioéster; a, sustrato de la toxina del cólera; b, sustrato de la toxina pertussis; c, sustrato pobre de PKC; d, sustrato muy bueno de PKC.

estabiliza la forma inactiva de $G\alpha$, lo que impide la inhibición de la ADC. Las subunidades $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ y $G\alpha_z$, de la familia $G\alpha_{i/o}$, son inactivadas por PTX (Tabla I) (1, 2).

PROTEÍNAS G RESISTENTES A LAS TOXINAS BACTERIANAS

En este grupo de proteínas G se encuentran aquellas $G\alpha$ que no son susceptibles de ser ADP-ribosiladas e incluye a las familias $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$, así como a la $G\alpha_z$, perteneciente a la familia $G\alpha_{i/o}$. Las proteínas $G\alpha$ resistentes a la PTX se expresan ubicuamente en los tejidos, a excepción de $G\alpha_z$, que se expresa en plaquetas y cerebro, $G\alpha_{14}$,

en bazo, pulmón, riñón y testículos, $G\alpha_{15}$ en linfocitos B y $G\alpha_{16}$ en monocitos y células T (Tabla I). Estas proteínas G resistentes a la PTX muestran un menor intercambio GDP-GTP, así como una actividad intrínseca de GTPasa menor a la de otras proteínas G, por lo que se piensa que deben existir proteínas que aceleren la actividad hidrolítica (GAPs). Por ejemplo, se ha observado que los efectores de algunas proteínas G resistentes a la PTX presentan actividad de GAP, como la PLC β (2).

FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS G

Otra propiedad bioquímica importante de las proteínas $G\alpha$ es la capacidad de ser fosforila-

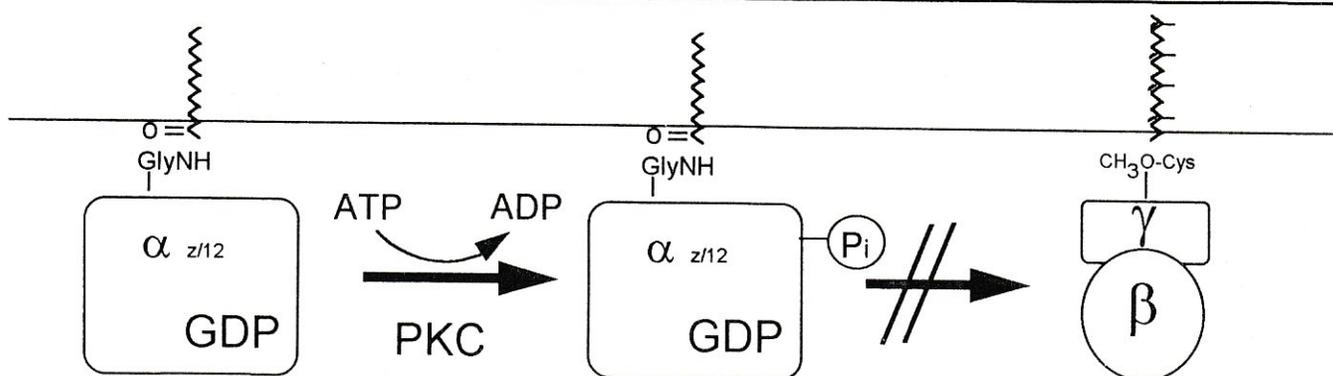


Figura 2. Fosforilación de $G\alpha_z$ y $G\alpha_{12}$ por la proteína cinasa C (PKC). Una vez disociadas las $G\alpha_z$ y $G\alpha_{12}$ pueden ser fosforiladas por la proteína cinasa C, impidiendo la resociación de estas subunidades con $G\beta\gamma$ y la subsecuente interacción con el receptor. Esto podría resultar tanto en la atenuación de la actividad como en la potencialización de la señal al crear una poza de $G\beta\gamma$ libres.

das. $G\alpha_{12}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{s4}$, $G\alpha_z$ y $G\alpha_{12}$ son sustratos de PKC (Tabla I) y aun cuando se desconoce la relevancia fisiológica que pueda tener su fosforilación, se ha demostrado que la fosforilación en un segmento de 53 residuos de la región amino terminal, bloquea la interacción de $G\alpha_z$ y $G\alpha_{12}$ con el dímero $G\beta\gamma$ (Fig 2). En la $G\alpha_z$ la fosforilación ocurre en la Ser 27 mientras que en la $G\alpha_{12}$ ésta ocurre en la Ser 38, residuos que caen en la región implicada en la interacción de $G\alpha$ con $G\beta\gamma$. Por esta razón se ha sugerido a la fosforilación como un mecanismo de modulación de la señal a través de las subunidades $G\alpha$, al prevenir su reasociación con $G\beta\gamma$ (2, 12).

MODIFICACIONES POR LÍPIDOS DE LAS PROTEÍNAS G

La forma de regulación más estudiada en las proteínas G es el intercambio GDP-GTP, catalizado por la unión del agonista-receptor (activado) y la hidrólisis del GTP unido a $G\alpha$ (desactivado). Sin embargo, las modificaciones covalentes de las proteínas G heterotriméricas por lípidos representan otras formas de regulación.

Miristoilación y Palmitoilación de las subunidades α

Todas las subunidades α de las proteínas G pueden ser modificadas covalentemente por la unión de ácidos grasos como el palmitato y/o el miristato (8). La N-miristoilación es el resultado de una adición co-traduccional de un grupo miristoilo en un residuo de glicina (Fig 3) de la región amino terminal, después de remover la

metionina inicial de la subunidad α . Esta unión con el miristato es covalente e irreversible. Todas las subunidades $G\alpha$ de la familia $G\alpha_{i/o}$ son susceptibles de ser miristoiladas (Tabla I) (13).

El palmitato por su parte, puede unirse a uno o más residuos de cisteína (Fig 3) cercanos a la región amino terminal a través de un enlace tioéster. Este tipo de asociación es reversible y puede ser regulada. Todas las subunidades $G\alpha$ contienen ácido palmítico, excepto por $G\alpha_i$ (Tabla I) (13).

Para las proteínas G, al igual que para otras proteínas modificadas por lípidos, las moléculas unidas son esenciales para que interactúen tanto con los lípidos de la membrana como con otras proteínas. Así, por ejemplo, la miristoilación de la $G\alpha_i$ es esencial para la inhibición de la ADC. La modificación por lípidos es crítica para la localización subcelular específica de las proteínas G, además de que aumenta la afinidad de $G\alpha$ por las subunidades $G\beta\gamma$, por lo que tiene un papel importante en la regulación de la formación del heterotrímero (13).

Varias subunidades $G\alpha$ pueden estar derivatizadas con palmitato y miristato, aun cuando la presencia de ambos ácidos grasos en la misma molécula de proteína G no se ha demostrado directamente. Sin embargo, la mutación de la glicina por la alanina, en las subunidades $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ o $G\alpha_z$ previene la miristoilación y la palmitoilación. Un requerimiento similar se ha observado para varias cinasas de tirosina que no son receptores, las cua-

MIRISTOILACIÓN Y PALMITOILACIÓN

$G\alpha_s$	M⊙C□L G N S K T E D Q R N E — P
$G\alpha_{i-1}$	M⊙C□T L S A E D K A A V E R — M,P
$G\alpha_t$	M⊙A G A S A E E K H S R E L — M
$G\alpha_q$	M T L E S I M A □□ L S E E A K A R R I N — P

PRENILACIÓN

$G\gamma_1$	— K G I P E D K N P F K E L K G G C V I S	F
$G\gamma_2$	— T P V P A S E N P F R E K K F F C A I L	GG

Figura 3. Sitios en las proteínas G modificados por lípidos. Los residuos de glicina que contienen miristato se indican con un círculo en las subunidades α_{i-1} y α_t . En la subunidad α_s la glicina no es miristoilada debido probablemente a otros residuos, como la Arg 6, que reduce la afinidad de la N-miristoiltransferasa. Todas las $G\alpha$ contienen palmitato en un residuo de cisteína indicado con un cuadro, cercano a la región amino terminal. Todas las subunidades γ son preniladas en un residuo de cisteína indicado con una flecha, de la región carboxilo terminal. M, miristoilación; P, palmitoilación; F, farnesilación; G, geranilgeranilación.

les también se miristoilan antes de ser palmitoildadas. De esto se deduce que la secuencia M-G-C en la región amino terminal puede representar un sitio de doble acilación en las subunidades $G\alpha$. No obstante, $G\alpha_s$ no requiere de la miristoilación para poder ser palmitoildada, aun cuando tiene esta secuencia (13).

Prenilación de las subunidades $G\gamma$

Las subunidades $G\gamma$ de las proteínas G también pueden ser modificadas covalentemente por una unidad geranilgeranilo (C20) o farnesilo (C15) en un residuo de cisteína del extremo carboxilo (Fig 3) mediante un enlace tioéter (Tabla II). La subunidad $G\gamma$ termina con un motivo CXXX, donde C=Cys y X= cualquier aminoácido. La prenilación es seguida de la eliminación de los tres

aminoácidos de la región carboxilo terminal y la carboximetilación de la nueva región carboxilo terminal. Aunque la geranilgeranilación o la farnesilación de la subunidad γ no se requiere para la formación del dímero $\beta\gamma$, la prenilación es necesaria para la función normal del dímero $\beta\gamma$ y su interacción con $G\alpha$, receptores y efectores. Por ejemplo, la subunidad $G\gamma_1$ farnesilada inhibe la interacción $\alpha_i\beta_1\gamma_1$ con su receptor, por lo que constituye otra manera de regular la interacción del dímero con otras proteínas. Hasta ahora no se conoce que las subunidades β de las proteínas G sean modificadas por la acilación de algún residuo con lípidos (4, 7, 13).

Una de las funciones de la acilación de las proteínas G es actuar como una ancla hidrofóbica que

TABLA II

PROPIEDADES DE LAS SUBUNIDADES β y γ DE MAMÍFEROS

SUBUNIDAD	PM (kDa)	DISTRIBUCIÓN	MODIFICACIÓN POR LÍPIDOS
β_1	36	ubicua	—
β_2	35	ubicua	—
β_3	36	cono fotoreceptor	—
β_4	37	ubicua	—
β_5	39	cerebro	—
γ_1	8	retina (células en bastón)	farnesilación
γ_2	6	cerebro, suprarrenales	geranilgeranilación
γ_3	7	cerebro	geranilgeranilación
γ_4	6.5	ubicua	geranilgeranilación
γ_5	7	ubicua	geranilgeranilación
γ_6	7	cerebro	geranilgeranilación
γ_7	7	ubicua principalmente en cerebro	geranilgeranilación
γ_{8olf}	7	neuronas olfatorias	farnesilación
γ_{8c}	7	retina (células en cono)	geranilgeranilación
γ_{10}	6.5	cerebro, corazón, placenta, pulmones, riñones, hígado, páncreas y músculo esquelético	geranilgeranilación
γ_{11}	6.5	*	farnesilación

El dímero $G\beta\gamma$ participa en la regulación de la fosfolipasa C- β , de la adenilato ciclasa y de los canales de K^+ ; * el RNA de la subunidad γ_{11} se expresa en varios tejidos, sin embargo la expresión de la proteína aún no se ha determinado.

interactúa con la membrana. Tanto la palmitoilación como la miristoilación contribuyen a la asociación con la membrana. El mecanismo por el cual la modificación lipídica aumenta la asociación con la membrana de las proteínas G no se conoce. La explicación más simple es que los ácidos grasos o los grupos preniles se insertan directamente en la empalizada lipídica de la membrana y de esta manera anclan la proteína a la membrana. La asociación membranal de las subunidades de las proteínas G es un proceso complejo que involucra múltiples interacciones. Las distintas modificaciones lipídicas de las diferentes proteínas G afectan las interacciones específicas proteína-proteína, esenciales para la unión a membrana y la función de las proteínas G (13).

SUBUNIDADES $\beta\gamma$ DE PROTEÍNAS G Y SU FUNCIÓN

Históricamente sólo la subunidad $G\alpha$ se consideraba como el único componente capaz de interactuar con efectores, ya que sólo esta subunidad puede unir los nucleótidos de guanina, así como interactuar con el receptor. Sin embargo, se ha demostrado que $G\beta\gamma$ también puede regular diversos efectores, como fosfolipasas, adenilato

ciclasas, canales iónicos, receptores con actividad de cinasas acoplados a proteínas G y fosfoinosítido 3-cinasas. Las subunidades $\beta\gamma$ pueden actuar a todos los subtipos de la PLC β , pero las PLC- β_2 y - β_3 son más sensibles que la PLC- β_1 y la PLC- β_4 . $G\beta\gamma$ se asocia con la PLC β en la región amino terminal, mientras que $G\alpha$ se asocia a la PLC β en la región carboxilo terminal. Los canales de K^+ que se activan a través de receptores muscarínicos para acetilcolina (I_{KACH}) también son regulados por $G\beta\gamma$. El dímero $\beta\gamma$ también regula canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q, así como a la ADC tipo II y IV (1, 3, 8).

Las diferentes subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ pueden formar varias combinaciones de dímeros; sin embargo, no todos son funcionales. Las $G\gamma$ interactúan específicamente con cada subtipo de $G\beta$. Por ejemplo, la $G\gamma_1$ interactúa con $G\beta_1$ pero no con $G\beta_2$ o $G\beta_3$, la $G\gamma_3$ interactúa con todas las $G\beta$. Por su parte, la $G\gamma_2$ interactúa especialmente bien con $G\beta_5$, $G\beta_1$ y $G\beta_2$. Así mismo, la $G\gamma_4$ interactúa con $G\beta_5$, $G\beta_2$ y $G\beta_1$. Todas las $G\gamma$ conocidas interactúan con $G\beta_1$. El dímero $G\beta\gamma$ formado puede interactuar específicamente con los diferentes efectores (4, 14).

$G\alpha$ -GDP puede competir con los efectores activados por $G\beta\gamma$, desactivando la señal dependiente de $G\beta\gamma$, lo que sugiere que $G\beta\gamma$ utiliza sitios de unión comunes para la interacción con $G\alpha$ y para su unión con los diversos efectores. Por análisis de mutación de la región que comprende los residuos de $G\beta$ que van del 55 al 332, que incluyen los puntos de contacto con $G\alpha$ -GDP, se determinaron los diferentes sitios de interacción de $G\beta$ para los distintos efectores. Los aminoácidos 55, 98, 99, 101, 117, 119, 143, 180, 89, 186, 228 y 332 interaccionan con la $PLC\beta_2$; 119, 117, 101, 99, 55, 78, 89, 332, 57, 228, 189 con la ADC_2 ; 99, 228, 78, 180, 55, 89, 119, 101, 186, 180, y 55 con los canales de K^+ (15).

Aunque para la mayor parte de las familias de proteínas G se ha demostrado su participación en las diferentes vías de señalización, aún falta por demostrar los efectores sobre los cuales actúan $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ y $G\alpha_z$. Así mismo, falta por establecer los mecanismos que contribuyen a la especificidad de la vía de la señal, ya que existen cientos de receptores que participan en la transducción de señales y sólo un número relativamente limitado de proteínas G heterotriméricas, por lo que se piensa que deben de existir diferentes mecanismos que contribuyan a la especificidad en la interacción de receptores-proteínas G.

REFERENCIAS

1. Wickman K y Clapham D E (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 75: 865-885.
2. Fields T A y Casey P J (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 321: 561-571.
3. Rangel-Serrano A (1995) Regulación diferencial de las isoformas de fosfolipasa C. *Bol Educ Bioq* 14: 103-108.
4. Ray K, Kunsh C, Bonner L M y Robishaw J D (1995) Isolation of cDNA encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11. *J Biol Chem* 270: 21765-21771.
5. Ong O C, Yamane H K, Phan K B, Fong H K, Bok D, Lee R H y Fung B K (1995) Molecular cloning and characterization of the G protein gamma subunit of cone photoreceptors. *J Biol Chem* 270: 8495-8500.
6. Morishita R, Nakayama H, Isobe T, Matsuda T, Hashimoto Y, Okano T, Fukada Y, Mizuno K, Ohno S, Kosawa O, Kato K, y Asano T (1995) Primary structure of a γ subunit of G protein, γ_{12} , and its phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem* 270: 29469-29475.
7. Hildebrandt, J D (1997) Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* 54: 325-339.
8. Clapham D E y Neer E J (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 167-203.
9. Blackmore P F, Bocckino S B, Waynick L E y Exton J H (1985) Role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of hepatocyte-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. *J Biol Chem* 260: 18206-18216.
10. Raymond J R (1995) Multiple mechanisms or receptor-G protein signaling specificity. *Am J Physiol* 269: F141-F158.
11. Voyno-Yasenetskaya T, Conklin B R, Gilbert R L, Hooley R, Bourne H R y Barber D L (1994) $G\alpha_{13}$ Stimulates Na-H exchange. *J Biol Chem* 269: 4721-4724.
12. Pyne N J, Freissmuth M y Palmer S (1992) Phosphorylation of the sliced variant forms of the recombinant stimulatory guanine-nucleotide binding regulatory protein ($G\alpha_s$) by protein kinase C. *Biochem J* 285: 333-338.
13. Wedegaertner P B, Wilson P T y Bourne H R (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem* 270: 503-506.
14. Yan K., Kalyanaraman V y Gautam N (1996) Different ability to form the G protein beta gamma complex among members of the beta and gamma subunits families. *J Biol Chem* 271: 7141-7146.
15. Ford C E, Skiba N P, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter L R, Rosal R, Weng G, Yang C-S, Iyengar R, Miller R J, Jan L Y, Lefkowitz R J y Hamm, H E (1998) Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science* 280: 1271-1274.

LA CLONALIDAD DE *TRYPANOSOMA CRUZI* Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Marco Antonio Becerril Flores. Depto de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, México, D F, MÉXICO. Fax: 5623-2468.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito que presenta una estructura poblacional de tipo clonal. En la naturaleza se han reconocido innumerables clonas que difieren marcadamente en virulencia las cuales se han identificado mediante técnicas isoenzimáticas, esquizodémicas, por RFLP y RAPD; cada una de ellas ocasiona diferente patología en los huéspedes vertebrados. Si varias clonas infectan simultáneamente a un mismo huésped, el resultado será una diversidad de manifestaciones clínicas, un rasgo característico de la enfermedad de Chagas; por tanto, la principal causa de la diversidad clínica en esta infección parasitaria es la variabilidad de clonas de *T. cruzi*.

PALABRAS CLAVE: Clonalidad, *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, virulencia, ácido siálico, transialidasa.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas' disease, is a parasite with a clonal population structure. In nature, many clones with marked differences in virulence have been identified by means of isoenzymatic, schizodemic, RFLP and RAPD techniques. Each one produces different pathology to vertebrate hosts. If several clones infect the same host simultaneously, the outcome of infection will be a diversity in clinical manifestations, a feature characteristic of Chagas' disease. Therefore, the major cause of clinical diversity in this parasitic infection is the variability in clones of *T. cruzi*.

KEY WORDS: Clonality, *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, virulence, transialidase, sialic acid.

INTRODUCCIÓN

Aún en las postrimerías del siglo XX, las enfermedades de origen infeccioso continúan siendo un gran problema de salud pública. Entre ellas, la tripanosomiasis americana, comúnmente conocida como "enfermedad de Chagas" cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el continente americano. La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 20 millones de individuos están infectados y más de 100 se encuentran bajo riesgo de adquirir la infección (1). En México se ha estimado una prevalencia de 1,614,000 casos para una población de 81,250,000 individuos hasta 1990.

En la enfermedad de Chagas, las manifestaciones clínicas que se observan son tan variadas que es imposible predecir cómo resultará afectado un individuo infectado con *T. cruzi*. Puede llegar a presentar signos y síntomas desde las primeras semanas hasta años después del inicio de la infección (2). Atraviesa por una fase aguda, seguida de una indeterminada y otra crónica. La primera dura dos a cuatro meses, la segunda varios años, mientras que la crónica se manifiesta 10 a 30 años después del primer contacto con el microorganismo.

En la tabla I se presentan los signos y síntomas que se observan durante las tres fases de la infección. En fase aguda sólo alrededor del 5% manifiestan sintomatología; de éstos, el 90% son niños. La gente que se encuentra en fase indeterminada es asintomática, pero presenta alteraciones electrocardiográficas. En fase crónica, alrededor del 30% de los parasitados desarrollan sintomatología por daño cardíaco; los megasíndromes de vísceras huecas aparecen sólo en el 10%; la muerte repentina ocurre en el 60-70%

TABLA I

 MANIFESTACIONES CLÍNICAS QUE SE PUEDEN OBSERVAR EN LAS TRES FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Fase aguda

- * Chagoma de inoculación (edema eritematoso, violáceo, indurado e indoloro, en el sitio de la picadura del transmisor).
- * Signo de romaña (edema bipalpebral, generalmente unilateral, periocular o conjuntival con adenopatía).
- * Fiebre
- * Vómito
- * Linfadenopatía local o franca poliadenopatía
- * Parasitemia
- * Hepatoesplenomegalia
- * Diarrea
- * Signos bronquiales
- * Miocarditis
- * Cardiomegalia
- * Alteraciones electrocardiográficas

Fase indeterminada:

- * Asintomatología
- * Alteraciones electrocardiográficas por miocardiopatías

Fase crónica:

- * megasíndromes de vísceras huecas
 - * cardiomegalia
 - * miocardiopatías
-

de los pacientes infectados. Hay que considerar que los infectados pueden presentar algunas, todas o ninguna de las manifestaciones señaladas en la Tabla I.

¿Por qué en la enfermedad de Chagas se observa este cuadro clínico tan amplio y heterogéneo? hasta el momento no hay respuestas completamente claras. No obstante, las investigaciones realizadas hasta ahora señalan que las causas están íntimamente relacionadas con la variabilidad intrapoblacional de *T. cruzi*, su dinámica de transmisión y por supuesto, la susceptibilidad del huésped a las infecciones por el parásito.

DIVERSIDAD INTRAPOBLACIONAL EN *T. CRUZI*

El parásito es un microorganismo polimórfico. Sus tres fases más estudiadas reciben los nombres de **amastigote**, **epimastigote** y **tripomastigote**

(Fig 1). El primero es intracelular, se establece en los tejidos de cualquier mamífero y es uno de los dos estadios reproductivos de *T. cruzi*; el otro es el epimastigote, sobrevive de manera extracelular y sólo se le encuentra en el intestino de insectos reducidos y hematófagos que participan como transmisores del protozoo, a los que se denomina "triatóminos" (3). El tripomastigote es la forma infectiva del parásito, se encuentra transitoriamente en la sangre de mamíferos y en la parte posterior del tubo digestivo de los triatóminos.

Las poblaciones de *T. cruzi* reciben distintos nombres de acuerdo al grado de su caracterización: si se han obtenido recientemente a partir de cualquier huésped se denominan **aislados**; sólo por el hecho de mantenerse durante pases sucesivos en medios de cultivo o animales de experimentación se llaman **stocks**; **cepas**, cuando llegan a caracterizarse biológica o molecularmente por cualquier metodología; por último, aquella pobla-

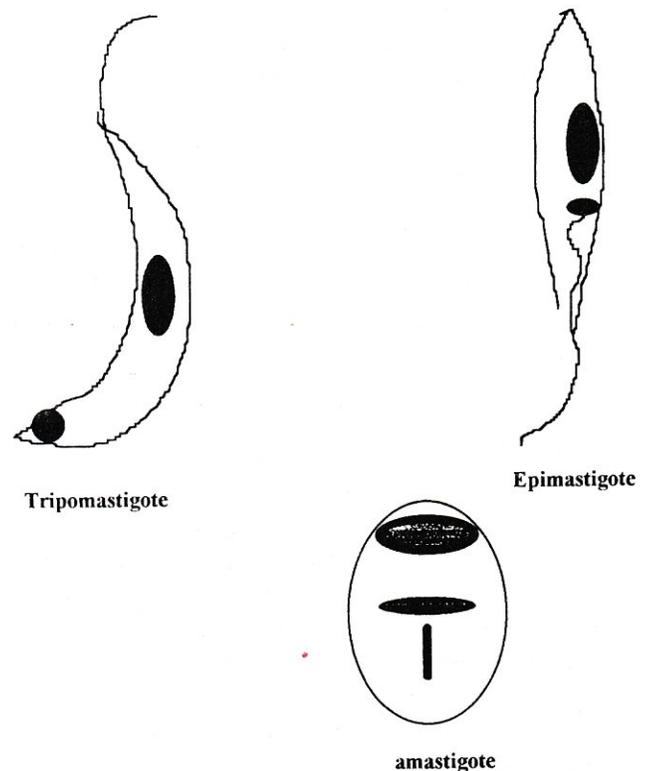


Figura 1. Las tres principales fases de *Trypanosoma cruzi*. Notar que la posición del cinetoplasto es el rasgo más claro que permite diferenciar morfológicamente al tripomastigote del epimastigote; en éstos se observa un flagelo que sale por una extremidad del parásito mientras que en el amastigote no se presenta.

ción de tripanosomas que deriva de un sólo individuo y es genéticamente idéntica recibe el nombre de **clona** (4, 5).

A la fecha se han obtenido innumerables aislados del parásito; cada uno caracterizado en medios de cultivo o animales de experimentación. Para este último caso se han empleado ratones en la mayor parte de las veces. Puesto que *T. cruzi* se puede encontrar tanto en la sangre como en otros tejidos de los mamíferos, incluyendo al humano, el comportamiento de cada una de sus poblaciones se caracteriza registrando la parasitemia, mortalidad que ocasiona a los ratones y desde luego el histotropismo que presenta, pues cada cepa se establece en distintos órganos. Con estos datos se evalúa tanto la virulencia como la infectividad de las poblaciones del parásito.

En diversos estudios se ha demostrado claramente que cada cepa presenta diferente virulencia por cualquiera de las tres variables que se estudian (6, 7). Bioquímicamente existe una clara diferencia entre las poblaciones virulentas y avirulentas de *T. cruzi*: moléculas como el ácido siálico y transialidasa, entre otras, juegan un papel importante en las patogénesis de la enfermedad de Chagas.

PAPEL DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LA VIRULENCIA DE *T. CRUZI*

El parásito no es capaz de sintetizar ácido siálico, sin embargo por diversas investigaciones se ha visto que las formas infectivas de *T. cruzi* presentan en su superficie residuos de dicha molécula y es evidente que participa en el proceso de invasión a la célula huésped. El protozoo adquiere el azúcar a partir de un donador externo a través de la acción enzimática de una transialidasa. Esta enzima es un complejo de moléculas glicoproteicas cuyos pesos moleculares oscilan entre 60 y 250 kDa; es expresada sobre la superficie de tripomastigotes, en donde se ancla a glicofosfatidil inositol. Funciona transfiriendo ácido siálico exógeno a moléculasceptoras presentes también en la superficie del parásito (Fig 2). La prueba de que el ácido siálico participa en la invasión es el uso de anticuerpos monoclonales contra estos azúcares, los cuales bloquean la invasión intracelular (8).

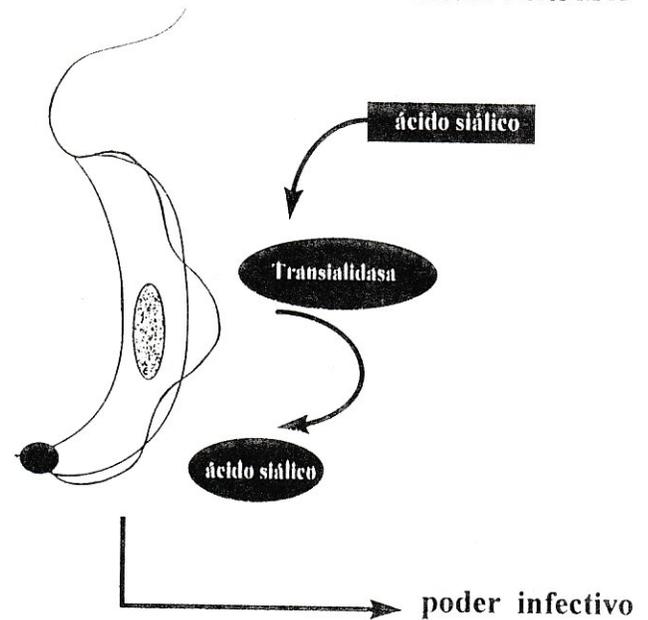


Figura 2. Mecanismos de captación de ácido siálico por *Trypanosoma cruzi*. La transialidasa localizada en la superficie de los tripomastigotes es capaz de unirse a moléculas de ácido siálico del huésped, lo transfieren a una molécula aceptora que también se encuentra sobre la membrana plasmática del parásito para facilitar su penetración a las células del huésped.

Otras moléculas que permiten diferenciar entre poblaciones virulentas y avirulentas del parásito son: neuraminidasa, α -2-macroglobulina, y N-acetil glucosamina en las poco virulentas; contrariamente, las que tiene que ver positivamente en la infección son las lipoproteínas de alta densidad (HDL), ácido siálico y transialidasa. Lo anterior indica que en la naturaleza existe un sinnúmero de poblaciones de *T. cruzi* que difieren en virulencia. Tal variabilidad se ha demostrado *in vivo* e *in vitro*; en este último caso, el comportamiento del protozoo se ha determinado al sembrarlo en medios de cultivo acelulares. Aquí, un fenómeno interesante y frecuentemente observado por diversos investigadores es la atenuación de la virulencia en algunas poblaciones patógenas de este microorganismo cuando son mantenidas durante largo tiempo en medios de cultivo.

¿Por qué ocurre esta atenuación? Aún no hay una respuesta clara, sin embargo, se piensa que en el parásito ocurre una regulación metabólica, la cual modula la expresión de moléculas que intervienen en la infección; por ejemplo, en la superficie de tripomastigotes existe una glicoproteína de

85 kDa (gp-85) que interviene de manera positiva durante el proceso de infección intracelular, actúa como receptor de fibronectina, proteína presente en la superficie de muchas células de mamíferos; en fase de epimastigote no se sintetiza esta molécula, lo que le quita el carácter infectivo (8).

Otra explicación a esta disminución del poder patogénico de *T. cruzi* mantenido en cultivos acelulares, es que el parásito sufre mutaciones que modifican su fisiología y que repercuten en su grado de patogenicidad. La tercera hipótesis, la mejor fundamentada, indica que algunas poblaciones de *T. cruzi* están compuestas por clonas con diferente virulencia y capacidad adaptativa: si las clonas que forman parte de una población se encuentran en un medio donde algunas de ellas no pueden adaptarse, entonces ocurre la eliminación de éstas, y las que sobreviven dan la característica de la población restante. En otras palabras, el ambiente selecciona, exclusivamente, las clonas que logran adaptarse.

Retomando el caso anterior, quizá las clonas virulentas requieren necesariamente la presencia de células huésped para introducirse y desarrollarse, pues, dado su carácter infectivo, están obligadas a realizar un ciclo de reproducción intracelular; en contraste, las clonas avirulentas no requieren de células huésped para reproducirse, lo realizan de manera extracelular cuando permanecen en fase de epimastigote. De esta manera, las clonas virulentas se eliminan en medios acelulares y las que logran sobrevivir son las avirulentas.

Como ya se mencionó, aunque las tres hipótesis se refieren a la atenuación de la virulencia, sólo existen evidencias experimentales que fundamentan la selectividad de clonas por el ambiente donde se encuentran. Deane y cols. (1984) demuestran selectividad cuando se inoculan ratones con dos clonas (9). Carneiro y col. (1990) también encuentran selectividad en cepas de *T. cruzi* después de hacerlas pasar por ratones (10). Respecto a estos dos estudios, es de hacer notar la coexistencia de varias clonas en el mismo medio; si se realiza una técnica de clonación celular y la identificación de marcadores moleculares que ponen de manifiesto el genotipo de cada una, se pueden identificar las distintas clonas dentro de un mismo huésped.

LA BIODIVERSIDAD DE *T. CRUZI* SE DEMUESTRA POR TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES

Tomando en cuenta la definición de clona, se puede decir que para demostrar la existencia de varias clonas dentro de una misma población, se tiene que analizar su composición genética. Las técnicas más utilizadas para dicho fin son: análisis isoenzimático, esquizodémico, determinación de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) y quizá, aunque menos empleada, el análisis de ADN minisatélite o de regiones altamente repetidas del ADN por la técnica denominada huellas digitales "fingerprinting" (11, 12).

El análisis isoenzimático consiste en el corrimiento electroforético de un extracto citoplásmico del parásito, generalmente sobre un gel de acetato de celulosa o almidón; sobre éste se aplica el sustrato de una enzima que se sospecha la contiene el parásito; en el caso de que la presente, se obtiene un producto que es colorido y observable visiblemente como una banda. Si en el gel se observan otras bandas a diferentes alturas de la esperada, significa que el parásito sintetiza otras moléculas con diferente estructura y por tanto peso molecular, pero que realizan la misma función enzimática (isoenzimas).

La observación de distintos patrones de bandedo en el gel indica la existencia de organismos con diferente estructura genética y por consiguiente, la presencia de distintas clonas, pues las enzimas son codificadas genéticamente. Mediante esta técnica se pueden identificar patrones que correlacionen con el cuadro clínico que se presenta en las infecciones por *T. cruzi*.

Para el análisis esquizodémico se trabaja con ADN del parásito que se localiza en una estructura subcelular denominada cinetoplasto (kDNA). Se corta con endonucleasas de restricción; los productos generados se corren electroforéticamente en un gel de agarosa. Los patrones de bandedo se revelan con bromuro de etidio, el cual se une al ADN y es observado con luz ultravioleta. El ADN presente en el gel puede desnaturalizarse y posteriormente transferirse a una membrana de

nitrocelulosa, la cual se hibrida con una sonda de ADN marcado con un isótopo radiactivo (^{32}P); finalmente, la membrana hibridada con la sonda marcada se expone a una placa fotográfica, en donde se revela el patrón de bandeo del ADN del microorganismo; esta técnica corresponde al análisis por RFLP mencionada arriba.

Por cualquiera de las técnicas anteriormente descritas, diversos investigadores han demostrado la coexistencia de varias clonas dentro del mismo huésped. En humanos se demostró la posibilidad de infección simultánea de dos clonas de *T. cruzi* por análisis isoenzimático y esquizodémico (13).

Estas técnicas moleculares también han permitido contribuir al conocimiento evolutivo de *T. cruzi*. Souto y col. (1996) realizaron un análisis filogenético de clonas y cepas de este parásito (14); encontraron dos linajes, a partir de los cuales creen que se derivan todas las poblaciones del protozoo, de esta manera desequilibrando el paradigma de la clonalidad de *T. cruzi*, pues, de acuerdo a la definición de clona, todas las poblaciones del parásito deberían ser idénticas genéticamente, por tanto encontrar un sólo linaje.

¿Por qué ocurre esta multitud clonal? hay dos explicaciones posibles: 1) todas las poblaciones que actualmente existen se han derivado a partir de dos ancestros cuyos descendientes evolucionaron separadamente, pero a través de los años cada linaje sufrió diversas mutaciones originando subpoblaciones que difieren ligeramente en su información genética. 2) La otra posibilidad es que *T. cruzi* no sea clonal: los individuos se reproducen de manera sexual y por tanto intercambian su material genético, lo que origina descendientes que no son idénticos a su progenitor sino que son productos que comparten información genética de la madre y del padre. Los estudios relacionados con la investigación sobre genética de poblaciones de *T. cruzi* apuntan a una estructura de población de tipo clonal.

¿Qué ocurriría en un huésped infectado con varias clonas que difieren en virulencia? ¿Cuál sería el resultado? Debido a que cada clona ocasiona ciertas manifestaciones clínicas ¿sería posible que el huésped infectado por varias de ellas pre-

sentara todas las manifestaciones que cada una produce, o sólo se observarían las que ocasionan las clonas predominantes? ¿Ocurriría sinergismo o inhibición entre ellas? El enigma aún no se descifra, sin embargo, todo parece indicar que una infección mixta de clonas de *T. cruzi* puede ser la causa de la diversidad clínica de la enfermedad de Chagas.

LA HETEROGENEIDAD CLONAL DE *T. CRUZI* CONDUCE A LA VARIABILIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Hemos llegado de nuevo al punto inicial de interés: el por qué de la diversidad de manifestaciones clínicas que se presentan en la enfermedad de Chagas. Una respuesta que contesta las preguntas señaladas arriba dice: aunque es posible que la gente se infecte con diversas clonas que difieren en virulencia, ésta será dada por las predominantes que componen la población infectante; aquéllas que no influyen en la patología del huésped permanecen de manera silenciosa dentro del grupo, lo que sugiere que la población completa presenta un comportamiento resultante de la presencia de aquéllas que lo constituyen. Si un "stock" de *T. cruzi* puede estar formado por diferentes clonas, surge ahora la pregunta ¿cómo es posible que en un huésped puedan existir varias de ellas simultáneamente? La dinámica de transmisión del parásito también permite entender esto.

DINÁMICA DE TRANSMISIÓN

Dado que el metabolismo de los triatominos es lento, hecho que no les permite alimentarse tan seguido, pueden pasar hasta tres meses sin comer desplazándose por varias casas. Tomando en cuenta que pueden vivir hasta por varios años, podemos imaginarnos que las distancias que recorren durante su vida pueden alcanzar hasta varios kilómetros. A lo largo de todo ese tiempo se alimentan por lo menos cinco veces, lo que indica una probabilidad alta de que se alimenten de varios huéspedes y por consiguiente se infecten con varias clonas.

Si al menos cada huésped está infectado por una clona con distinta virulencia y el insecto se alimenta de cada uno de esos huéspedes, llegará a albergar una mezcla de clonas que difieran en gra-

do de patogenicidad. Cuando el triatomino defeca sobre la piel de un nuevo huésped, éste se infectará con todas las clonas presentes en el transmisor. Por supuesto que las manifestaciones clínicas que presente este huésped serán dadas por la presencia de estas clonas y por la susceptibilidad a la infección por cada clona.

CONCLUSIONES

La diversidad clonal de *T. cruzi* tiene implicaciones, no sólo clínicas sino epidemiológicas. Sería de suma importancia conocer la distribución geográfica de las clonas virulentas para estimar los riesgos que corren los habitantes de las regiones donde se encuentran las clonas virulentas; si hay una relación entre las características patogénicas del parásito y la especie de transmisor: en nuestro país sería interesante saber si las diversas especies de transmisores determinan el tipo de clonas existentes, puesto que en México existen 27 especies de triatominos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a las doctoras Irene De Haro Arteaga y Paz María Salazar Schettino por sus acertadas correcciones de redacción y estilo durante la revisión de este manuscrito.

REFERENCIAS

- World Health Organization (1990) Tropical diseases TDR/CTD/HH90.1, WHO, Geneva, 26pp; WHO 1991. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 811. p. 95.
- Andrade S G y Magalhaes J B (1996) Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop 30:27-35.
- Schmidt G D y Roberts L S (1989) Order kinetoplastida: Trypanosomes and their kin. En: Foundations of Parasitology. Editor: David Kendrick B. Times mirror/mosby college publishing, Inc USA pp 55-80.
- Thompson R C A y Lymberry A J (1990) Intraspecific variation in parasites- What is a strain? Parasitol Today 6:345-347.
- Morel C, Chiari F, Camargo E P, Mattei D M, Romanha A J y Simpson L (1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA 77:6810-6814.
- Bice D B y Zeledón R (1970) Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). J Parasitol (56):663-670.
- Salazar-Schetino P M, Jiménez M J y Cárdenas L R (1978) Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el ratón blanco. Rev Lat-amer Microbiol 20:51-57.
- Barbara A, Burleigh y Andrews N W (1995) The mechanisms of *T. cruzi* invasion of mammalian cell. Ann Rev Microbiol 49:175-200.
- Deane M, Souza M, Pereira N, Goncalvez A, Momen H y Morel C (1984) *Trypanosoma cruzi*; Inoculation schedules and reisolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. J Parasitol 31:276-280.
- Carneiro M, Chiari E, Goncalvez A, Da Silva P A, Morel C y Romanha A (1990) Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. Acta Trop 47:3545-3552.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky, JA y Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res 18:6531-6535.
- Abdezarrak S B, Guerrini F, Mathieu-Daudé F, Truc P, Neubauer K, Lewicka K, Barnabé C y Tibayrenc M (1993) Isozyme electrophoresis for parasite characterization. En: Protocols in molecular Parasitology. Methods in molecular biology Editor: Hyde JE, Walker JM. Humana, Totowa, New Jersey vol 21 pp 361-382.
- De Lana M, Chiari C A, Chiari E, Morel C M, Goncalvez C M y Romanha AJ (1996) Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. Parasitol Res 82:257-260.
- Souto R P, Fernandes O, Macedo A M, Campbell D A y Zingales B (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 83:141-152.
- Lauria-Pires L y Teixeira A R (1996) Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. Am J Trop Med Hyg 55:304-310.

ANÁLISIS TERMODINÁMICO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS

Oscar Flores-Herrera, Aída Uribe, Juan Luis Rendón, Juan Pablo Pardo y Federico Martínez. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, 04510, México, D F, MÉXICO. Teléfono 5623-2168, Fax: 5616-2419.

RESUMEN

El estudio actual del plegamiento y de la estabilidad de las proteínas utiliza a la mutagénesis como un nuevo enfoque para analizar los diferentes elementos estructurales y las fuerzas involucradas en dicho fenómeno. Estos estudios incluyen la alteración de los puentes de hidrógeno y de disulfuro, de los dipolos de las α -hélices así como del efecto hidrofóbico y el entrópico. Los resultados indican que el cambio (positivo) en la entalpía para las interacciones de van der Waals y los movimientos vibracionales, así como el cambio (positivo) en la entropía para la hidratación de los grupos hidrofóbicos y los polares favorecen al estado nativo, mientras que su contraparte termodinámica induce la desnaturalización de la proteína.

PALABRAS CLAVE: Plegamiento de proteínas, estabilidad de proteínas, mutaciones.

ABSTRACT

Directed mutagenesis is a new method for analyzing the different structural elements and the forces involved in protein folding and stability. This approach involves the study of the hydrogen and disulfide bonds, the α -helix dipoles, and the hydrophobic and entropic effect on the native and unfolded states of proteins. The results show that the enthalpic change (positive) for the van der Waals interaction, vibrational movement and the entropic change (positive) for the hydration of polar and hydrophobic groups induced the stability of native state of proteins.

KEY WORDS: Protein folding, protein stability, mutations.

INTRODUCCIÓN

Se sabe que las proteínas son biomoléculas cuya estabilidad es muy limitada, ya que la diferencia

neta entre la energía libre del estado nativo (N) y el desnaturalizado (D) es de entre 5 a 20 kcal mol⁻¹. Esto demuestra que existe un delicado balance entre las interacciones que estabilizan su estructura (por ejemplo, el efecto hidrofóbico) y aquellas que tienden a desestabilizarla (la pérdida de la entropía conformacional en la proteína plegada) (1).

Gracias a muchos años de estudio, ahora se conocen mejor las diferentes interacciones que estabilizan a las proteínas en su estado nativo. El desarrollo de la mutagénesis dirigida ha hecho posible determinar, con cierto grado de precisión, la contribución específica de los diferentes residuos de aminoácidos a la estabilidad de las proteínas; asimismo, esta técnica también ha permitido estudiar su mecanismo de plegamiento. Los resultados de estos estudios han revelado el efecto de las mutaciones sobre la energía libre de los diferentes intermediarios y estados de transición que constituyen la vía del plegamiento proteico (2).

Por otra parte, se ha observado que cuando se realiza la misma mutación, por ejemplo, el reemplazo Tyr \rightarrow Ala, en diferentes sitios de la proteína, se obtienen distintos efectos en los estadios de la vía, lo que aporta evidencias que sugieren que el plegamiento se desarrolla en etapas ordenadas hasta obtener la estructura de la proteína nativa.

Aun cuando el estudio del plegamiento y de la estabilidad de las proteínas por medio de las mutaciones dirigidas ha avanzado rápidamente en los últimos años, todavía existen algunos aspectos que son poco claros. Por ejemplo, se desconoce por qué en algunos casos la sustitución de un residuo de aminoácido produce pequeños cambios en la estructura tridimensional de la proteína, mientras que en otros casos, la misma mutación pro-

duce grandes perturbaciones en la estructura nativa; además, se desconocen las consecuencias energéticas de tales procesos. En esta revisión se describe el uso de algunas mutantes en el estudio del plegamiento y la estabilidad de las proteínas.

ELEMENTOS CONCEPTUALES

Hay dos enfoques para estudiar el fenómeno del plegamiento de las proteínas. El clásico, que involucra un modelo que comienza con una cadena peptídica completamente desplegada, es decir, una estructura al azar, donde los contactos intracatenarios son mínimos. El plegamiento de esta cadena se inicia cuando el polipéptido se transfiere a una solución acuosa cuyas condiciones de temperatura, de pH y las concentraciones de sales son similares a las fisiológicas. En estas nuevas condiciones el estado N tiene una energía menor que el estado D y, como consecuencia, la cadena polipeptídica se pliega. Se presume que para llegar al estado N se pasa por una serie de intermediarios I_1 a I_n , a lo largo de toda la ruta del plegamiento. Debido a esta definición, éste es un proceso fuera del equilibrio, el cual solo puede ser estudiado cinéticamente evaluando los diferentes parámetros estructurales como una función del tiempo (3).

Un método alternativo para definir este fenómeno involucra suponer el plegamiento de las proteínas como una reacción en equilibrio que interconvierte el estado N y el estado D, donde la distribución de microestados está en función de la temperatura, el pH o cualquier otra condición de la solución (3).

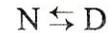
Este segundo enfoque, que se conoce como desnaturalización reversible, se diferencia del enfoque clásico del plegamiento de las proteínas en el punto inicial de la reacción. En lugar de un estado desplegado sin estructura secundaria, en este método se parte de una cadena peptídica que se pliega o renaturaliza a partir de un estado desnaturalizado, el cual se define como el estado de la cadena que se obtiene por la ruptura cooperativa de las interacciones presentes en el estado N (3).

Una manera de unificar estos dos enfoques es considerar a la desnaturalización reversible como un grupo de reacciones incluidas en el enfoque

clásico. Así, la reacción del plegamiento de las proteínas se escribe:



y la renaturalización reversible:



Debido a que los estudios de las reacciones de desnaturalización reversible son técnicamente más confiables, la caracterización inicial del efecto de las mutaciones sobre el plegamiento de las proteínas frecuentemente empieza con estos estudios.

Como se mencionó, los estudios termodinámicos se emplean para obtener parámetros fisicoquímicos importantes de la reacción de desnaturalización. Por ejemplo, a partir del cálculo de la constante de equilibrio, la K_D (el cociente de la fracción de moléculas en el estado D y la fracción de moléculas en el estado N), se puede obtener el cambio en la energía libre de la interconversión de N en D, a partir de la expresión

$$\Delta G_D = -RT \ln K_D \quad \text{ecuación 1}$$

El valor del ΔG_D es fundamental para determinar la estabilidad de cualquier proteína con respecto a la desnaturalización reversible. Es importante mencionar que todos los métodos que se describen para determinar el ΔG_D aportan sólo la diferencia en la energía libre entre el estado N y el D. Así, es imposible asignar cualquier cambio en el ΔG_D a cambios en la G de cualquiera de los dos estados. Sin embargo, es útil obtener los diferentes parámetros termodinámicos asociados con el ΔG_D (Tabla I), ya que éstos están íntimamente relacionados con la participación de las diferentes interacciones que estabilizan a la estructura de las proteínas en el estado nativo. Como se muestra en la Tabla II, la contribución de las diferentes fuerzas al ΔG se puede dividir en términos entálpicos (ΔH) y entrópicos (ΔS). El ΔH y el ΔS de las interacciones de van der Waals son positivas e independientes de la temperatura. El ΔH es grande y positivo, lo que indica que estabiliza al estado N. Aunado a esto, el término $-T\Delta S$ es grande pero negativo, lo que favorece al estado D, ya que éste presenta un mayor grado de libertad

TABLA I

PARÁMETROS TERMODINÁMICOS PARA LA REACCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN REVERSIBLE (N \leftrightarrow D)

TÉRMINO	DEFINICIÓN	INFORMACIÓN QUÍMICA
ΔG_D	$\Delta H_D - T\Delta S_D$	Cambio neto en la energía libre de Gibbs.
ΔH_D	entalpía del estado D - entalpía del estado N	Cambio neto en la energía de enlace.
ΔS_D	entropía del estado D - entropía del estado N	Cambio neto en el número de estados conformacionales.
ΔC_p	capacidad calorífica del estado D - capacidad calorífica del estado N o también: $d(\Delta H_D) / d(T)$	Área hidrofóbica de la proteína que se expone al solvente.
m_{desn}	$d(\Delta G_D) / d([\text{desnaturalizante}])$	Aún desconocido. Una teoría (5) sugiere que se trata de la diferencia entre el área de superficie accesible al solvente entre el estado D y el N.
Δv_D	$(1/RT) [d(\Delta G_D) / d(\ln[H^+])]$	La diferencia en el número de protones unidos en el estado D y el N.

conformacional. Sin embargo, el ΔG que resulta de estos parámetros es positivo, ya que las fuerzas de van der Waals promueven el plegamiento a pesar de la pérdida de la entropía conformacional.

Los movimientos vibracionales son otra fuerza que participa en la estabilidad proteica. Tienen un valor positivo de ΔH , el cual aumenta con la temperatura, pero su magnitud es menor a su término entrópico asociado ($-T\Delta S$), el cual es negativo e incrementa con la temperatura. Así, los movimientos vibracionales siempre favorecen al estado D, especialmente a temperaturas altas (Tabla II).

La hidratación de los residuos hidrofóbicos tiene un valor positivo muy grande para el término entrópico ($-T\Delta S$), lo que contribuye a estabilizar el estado N. En este caso el agua se ordena alrededor de los grupos hidrofóbicos y hay una pérdida de la entropía del solvente conforme se desnatura la proteína y se expone más área hidrofóbica. La magnitud del ΔS para la solvatación de este tipo de residuos disminuye en valor absoluto a altas temperaturas. Por otra parte, la hidratación del área no polar también tiene un componente entálpico (ΔH) cuyo valor negativo a 25°C se acentúa a bajas temperaturas debido al alto valor del C_p para la hidratación de los grupos hidrofóbicos. Así, conforme disminuye la temperatura, el ΔH se hace más desfavorable y puede compensar el factor favorable del ΔS , de modo que la hidratación de los residuos hidrofóbicos de

la proteína es un factor que promueve, a bajas temperaturas, la desestabilización del estado N.

Por último, la hidratación del área polar de la proteína tiene un valor negativo para el ΔH , lo que favorece al estado D. El término entrópico ($-T\Delta S$) favorece al estado N de la misma forma como ocurre para la hidratación del área no polar, pero su magnitud es menor que su contraparte, el ΔH . Aunado a esto, ambos términos son dependientes de la temperatura y, debido a que su aportación al ΔG es opuesta, pueden llegar a compensarse. Sin embargo, el efecto del ΔH se observa en un intervalo amplio de temperaturas (0 a 120°C). Así, cuando hay un aumento de la temperatura, el factor termodinámico de las fuerzas que favorece al estado N disminuye en magnitud, mientras que el término que favorece al estado D aumenta, provocando la desnaturalización de la proteína (4).

ENFOQUES EXPERIMENTALES

Existen diferentes métodos experimentales para determinar el ΔG_D de las proteínas. El más poderoso es la calorimetría diferencial de barrido, en el cual el calor absorbido en la reacción y la temperatura en el punto medio de la transición (T_m) se determinan directamente (3). En general, el ΔG_D a una temperatura dada puede calcularse como:

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_m - T\Delta S_m + \Delta C_p[(T - T_m) - T \ln(T/T_m)] \text{ ecuación 2}$$

TABLA II

PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS DIFERENTES FUERZAS
EN LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS

CONTRIBUCIÓN	ΔG			ΔH			$-T\Delta S$		
			SE FAVORECE			SE FAVORECE			SE FAVORECE
Interacciones de van der Waals	+	↓	N	++	-	N	--	↓	D
Movimientos vibracionales	-	↓	D	+	↑	N	--	↓	D
Hidratación de los grupos no polares	+	↓↑	N	-	↑	D	++	↓	N
Hidratación de los grupos polares	-	↑	D	--	↓↑	D	+	↓↑	N
Total	+	↓↑	Nativo	+	↑	Nativo	-	↓	Desnaturalizado

El signo determina la magnitud de la contribución de cada fuerza a un estado específico a 25°C. Las flechas indican un aumento (↑) o un descenso (↓) de cada parámetro en función del incremento de la temperatura en el intervalo de 0 a 120°C. Las dos flechas (↓↑) indican que hay un máximo en ese intervalo de temperatura. N y D designan al estado nativo y desnaturalizado, respectivamente (adaptada de la referencia 4).

donde T_m es la temperatura en el punto medio de la transición, ΔH_m es el cambio en la entalpía o el calor absorbido a la T_m ; ΔS_m es el cambio en la entropía a la T_m y ΔC_p es la diferencia en la capacidad calorífica entre el estado N y el D (3).

En principio, todos los parámetros de la ecuación pueden ser calculados por el método calorimétrico, aunque la exactitud del valor del ΔC_p es difícil de obtener, ya que este parámetro puede ser dependiente de la temperatura y está directamente relacionado con el área hidrofóbica de la proteína que se expone al solvente en el estado D (5).

En lugar de cuantificar el calor absorbido por una proteína, la pérdida de la estructura que acompaña a la desnaturalización térmica puede ser determinada espectroscópicamente por medio de la absorbencia en el espectro ultravioleta (UV), la fluorescencia o el dicroísmo circular. Así, la reacción de desnaturalización puede servir para obtener el ΔG (por medio de la ecuación 1) y el ΔH a partir de la ecuación de van't Hoff

$$\Delta H_v = -Rd(\ln K_D) / d(1/T) \quad \text{ecuación 3}$$

la cual determina el cambio de entalpía de la reacción de desnaturalización. Para calcular el ΔG_D a

cualquier temperatura y comparar la estabilidad relativa de un grupo de mutantes diferentes, el ΔC_p debe ser determinado para cada una. Éste se puede calcular determinando la dependencia del ΔH_v con respecto a la temperatura.

Alternativamente, el ΔG_D puede ser determinado por la desnaturalización reversible de la proteína con agentes desnaturalizantes (la urea o el clorhidrato de guanidina, por ejemplo) o por variaciones en el pH. Cuando se usa a la urea o al clorhidrato de guanidina para modificar la composición del solvente, el $\Delta G_D^{H_2O}$ se puede calcular a partir de la siguiente relación lineal:

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m_{desn} ([desnaturalizante]) \quad \text{ecuación 4}$$

donde el $\Delta G_D^{H_2O}$ es el cambio en la energía libre en ausencia del agente desnaturalizante, que se obtiene por extrapolación a concentraciones cero de desnaturalizante, y m_{desn} es la pendiente que corresponde a la relación $d\Delta G_D/d([desnaturalizante])$.

Por último, para la desnaturalización por cambios en el pH, el ΔG_D se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_D(pH) = \Delta G_D(pH_0) - 2.303RT/(pH-pH_0)\Delta v_D \quad \text{ecuación 5}$$

donde el Δv_D es el número de iones de hidrógeno captados por la proteína durante la desnaturalización ácida o los iones de hidrógeno perdidos en la desnaturalización alcalina, mientras que el pH_0 es un pH de referencia (3).

Una vez determinada la estabilidad conformacional de la proteína nativa y de la mutante, definida como el ΔG para la reacción reversible, se puede obtener la diferencia de la estabilidad conformacional, $\Delta(\Delta G)$:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta G_{\text{silvestre}} - \Delta G_{\text{mutante}} \quad \text{ecuación 6}$$

El valor que presenta el $\Delta(\Delta G)$ indica cual de las dos proteínas es más estable, lo que permite sugerir la magnitud de la contribución energética del residuo de aminoácido mutado a la estabilidad conformacional de la proteína silvestre. De esta forma se puede calcular la contribución energética de las diferentes fuerzas involucradas en el plegamiento y estabilidad de las proteínas.

EXPLORANDO EL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS

Al comprobar que una mutación específica ha eliminado solamente una interacción en la proteína nativa, se puede determinar el papel que desempeña dicha interacción en la estabilidad general de la proteína. En este sentido se puede conocer la contribución a la estabilidad de los puentes de hidrógeno, los puentes disulfuro, los puentes salinos, las interacciones de van der Waals y el efecto hidrofóbico. Sin embargo, la participación de cada una de estas interacciones, evaluada por mutagénesis dirigida, puede depender del microambiente, la estructura y otras interacciones que la rodean en la proteína nativa, y posiblemente esta dependencia se vea reflejada en el proceso del plegamiento.

De esta forma, el diseño de una mutación debe de considerar el contexto en el cual se lleva a cabo, para poder demostrar la participación y la magnitud de un tipo de interacción en particular, especialmente aquellas mutaciones diseñadas para eliminar una interacción en la proteína nativa. No obstante, cabe señalar que no es posible diseñar una mutación que elimine exclusivamente un tipo de interacción (por ejemplo, las interacciones

electrostáticas) sin que al mismo tiempo se afecten otros tipos de interacciones (por ejemplo, el efecto hidrofóbico) (2).

A. LA PARTICIPACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO

Cuando se realiza una mutación para introducir un puente disulfuro en una proteína, se espera que su estabilidad se incremente con respecto a la proteína silvestre, ya que la presencia del puente disulfuro disminuye la entropía conformacional del estado D (6).

Esta hipótesis ha sido confirmada por el grupo de Pace (7) usando a la RNasa T1, la cual tiene dos puentes disulfuro formados por los residuos 2-10 y 6-103. La estabilidad de esta proteína es de 5.6 kcal mol⁻¹ y disminuye en 3.4 kcal mol⁻¹ si uno de los puentes se reduce y las cisteínas se protegen por carboximetilación; y en 9.3 kcal mol⁻¹ si ambos puentes se reducen y las cuatro cisteínas son carboximetiladas. La disminución en la estabilidad de la proteína con los dos puentes disulfuro reducidos se debe a un incremento en la entropía conformacional de la cadena peptídica desnaturalizada.

Con estos trabajos, el grupo de Pace propuso una ecuación para predecir el efecto de un puente disulfuro sobre la entropía conformacional de la proteína: $\Delta S = -2.1 - (3/2)R \ln(n)$, (donde ΔS es el cambio en la entropía conformacional del estado D; R es la constante de los gases ideales y n es el número de residuos que hay entre los residuos de cisteína que forman el puente de disulfuro); esta expresión no solo explica los resultados para la RNasa T1 sino también se aplica para otras proteínas.

Por otra parte, Matsumura y cols. en 1989 (en 2), demostraron el carácter estabilizador de los puentes disulfuro empleando a la lisozima del fago T4, de cuya secuencia se sustituyeron a las cisteínas (Cys54Thr/Cys97Ala) para obtener una proteína pseudo-silvestre, que mantiene las cualidades estructurales de la enzima original, pero que carece del puente disulfuro. Con esta proteína pseudo-silvestre se construyó una mutante (Thr21Cys/Thr142Cys) que, en su forma oxidada, es la más estable de todas las mutantes probadas; a un pH de 2, tiene una T_m 11°C mayor que

la de la proteína pseudo-silvestre sin cisteínas; además, tiene una diferencia en la energía libre de desnaturalización ($\Delta(\Delta G_D)$ según la ecuación 6) entre su estado oxidado y reducido de $2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Kuroki y cols. en 1992 (en 6) mostraron que al eliminar el puente disulfuro de la lisozima humana, ya sea con la mutación Cys77Ala/Cys95 o Cys77/Cys95Ala, la proteína se desestabiliza en $4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ a un pH de 3.0 y a 57°C . Para la mutante Cys77Ala/Cys95 el $\Delta\Delta H$ fue $-5.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que para la mutante Cys77/Cys95Ala el $\Delta\Delta H = -9.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo que sugiere que la disminución en la estabilidad de la proteína no es un efecto totalmente entrópico, provocado por la eliminación del puente disulfuro, sino que la participación del término entálpico (magnitud y signo) es importante.

Sin embargo, Cooper y cols. en 1992 (en 6) al realizar un estudio similar con la lisozima de pollo, obtuvieron resultados diferentes al grupo de Kuroki (en 6). Esta proteína tiene cuatro puentes disulfuro, de los cuales el que está formado por la Cys6 y la Cys127 fue reducido y las cisteínas carboximetiladas. La resonancia magnética nuclear mostró que la enzima modificada tiene una estructura secundaria y terciaria similar a la forma silvestre. La modificación originó un descenso de 25°C en la temperatura de desnaturalización a un pH de 3.8. De los experimentos de calorimetría diferencial de barrido a diferentes valores de pH para las dos proteínas, se obtuvieron gráficas de entalpía contra temperatura, las cuales coincidieron en el intervalo de la temperatura de transición, lo que sugiere que la desestabilización observada puede ser producida por un efecto entrópico.

Un resultado interesante con respecto a los puentes disulfuro lo aportaron Clarke y Fersht (8), quienes construyeron una doble mutante (Ala43Cys/Ser80Cys y Ser85Cys/His102Cys) de la barnasa para estudiar la vía del plegamiento después de la desnaturalización. La energía libre de desnaturalización se determinó a partir de experimentos realizados en presencia de urea o de clorhidrato de guanidina, a un pH de 7.0 y a 25°C . Los valores para la estabilización ($\Delta(\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}})$) se-

gun la ecuación 6) en relación a la proteína silvestre, fueron de $+1.2 \pm 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ y de $-1.1 \pm 0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la proteína con el puente de disulfuro en la posición 43-80 y para la proteína con los residuos 43 y 80 reducidos (SH_2), respectivamente. Por otra parte, para la proteína con el puente disulfuro en la posición 85-102, el $\Delta(\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}})$ fue de $+4.1 \pm 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que en el estado reducido (SH_2) fue de $-0.4 \pm 0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$. Según los autores, estos resultados pueden ser de origen entrópico.

B. LA PARTICIPACIÓN DEL EFECTO ENTRÓPICO Y ENTÁLPICO

La entropía de una proteína en el estado desnaturalizado se puede disminuir por medio de mutaciones que reducen la entropía configuracional, y cuya naturaleza no es la de un puente disulfuro (2).

El grupo de Hu y cols. en 1992 (en 6) determinaron, por medio de estudios de calorimetría diferencial de barrido, el efecto que hay al sustituir a la Ala82 y la Ala93 por prolinas en la lisozima del fago T4. La Ala82 pertenece a la región del carboxilo terminal, la cual forma parte de una estructura de α -hélice desde los residuos 81 a 91; debido a que a la alanina se le clasifica como un buen formador de estructuras α -hélice y a la prolina como un distorsionador de la misma, se esperaba que la mutación Ala82Pro produciría la desestabilización de la proteína. Sin embargo, se obtuvo una estabilización de $+1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ a un pH de 3 y a 53.6°C , debido a un incremento de $4.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ en la entalpía de desnaturalización. La mutación Ala93Pro también produjo un aumento de $+1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ en la estabilización, cuyo origen se cree es entálpico ($\Delta\Delta H_D = +2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Por otra parte, Ladbury y cols. en 1993 (en 6) encontraron que la mutación Ile3Pro en la lisozima del fago T4 produce una desestabilización de la proteína de $-2.53 \text{ kcal mol}^{-1}$ a un pH de 3 y a 53.6°C , cuyo origen fue entrópico ($\Delta\Delta H_D = 8.8$ y $-\Delta\Delta S_D = -11.3 \text{ kcal mol}^{-1}$). Estos resultados ilustran la dificultad de determinar de una forma consistente el efecto termodinámico producido por las mutaciones, y sugieren que la región de la proteína en la cual se realiza la mutación determina con mucho el efecto global de la mutación.

C. LA PARTICIPACIÓN DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO

El papel desempeñado por los puentes de hidrógeno en la estabilidad de la estructura de las proteínas se ha considerado poco relevante, debido a que los residuos de aminoácido que pueden participar en la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios en la proteína nativa, también pueden interactuar con el agua cuando la proteína se encuentra desnaturalizada. Sin embargo, trabajos experimentales recientes han mostrado una visión nueva del problema.

En 1992 Shirley y cols. (9), a partir de los experimentos de la desnaturalización química o térmica de 12 mutantes de la RNasa T1, en las cuales se habían roto de uno a tres puentes de hidrógeno, estimaron que cada puente de hidrógeno contribuye con 1.3 ± 0.6 kcal mol⁻¹ para la estabilidad de la proteína nativa. Estas estimaciones incluyen las correcciones provocadas por la diferencia de hidrofobicidad entre el residuo de la proteína silvestre y la mutante. Asimismo, el grupo de Shirley mostró que durante el proceso de plegamiento de la RNasa T1 se forman 86 puentes de hidrógeno intracatenarios, los cuales contribuyen con casi 110 kcal mol⁻¹ a la estabilidad conformacional de la proteína; este valor es muy cercano a la contribución total de los residuos hidrofóbicos. Esto sugiere que, en términos generales, tanto el efecto hidrofóbico como los puentes de hidrógeno, contribuyen de forma importante a la energía de estabilización de las proteínas globulares. Una conclusión similar fue propuesta por Privalov y Makhatadze (10) con base en el análisis detallado de la desnaturalización térmica de la ribonucleasa A, la lisozima, el citocromo c, la mioglobina y el inhibidor de la tripsina pancreática de bovino.

D. LA PARTICIPACIÓN DEL EFECTO HIDROFÓBICO

El empaquetamiento de los grupos hidrofóbicos en las proteínas desempeña un papel muy importante en la estabilidad de su estructura nativa, ya que aumenta las interacciones de van der Waals. Del estudio del efecto hidrofóbico se pueden extraer dos grandes conclusiones: 1) las interacciones durante el empaquetamiento contribuyen a la energía libre del proceso de plegamiento. Las mutantes donde los residuos nuevos son estérica-

mente distintos, con frecuencia producen una desestabilización mayor de lo que se predice por la energía libre de transferencia y 2) las mutaciones en el núcleo hidrofóbico alteran muy poco el resto de la estructura de la proteína; de hecho, las mutantes adoptan una estructura muy similar a la de la proteína nativa y mantienen las mismas propiedades espectroscópicas, amén de conservar parcialmente la actividad biológica (6).

En 1992, Pace (11) revisó diversos trabajos publicados sobre diferentes proteínas globulares en los cuales se realizaron mutaciones dirigidas para estudiar la desestabilización producida por el reemplazo de un residuo de aminoácido no polar voluminoso por uno más pequeño sin que el efecto estérico fuera importante. Los resultados del estudio de 72 mutaciones permiten proponer que la estabilidad de las proteínas aumenta 1.3 ± 0.5 kcal mol⁻¹ a 25° C por cada grupo metilo (aproximadamente 27Å³) oculto en el interior de la proteína.

Por otra parte, Spolar y cols. (12) desarrollaron las siguientes fórmulas generales para calcular el cambio en la capacidad calorífica y en la entalpía durante el plegamiento de las proteínas, respectivamente

$$\Delta C_{\text{plegamiento}}^{\circ} = -(0.25 \pm 0.03)\Delta A_{\text{np}} \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1} \quad \text{ecuación 7}$$

$$\Delta H_{\text{plegamiento}}^{\circ}(T) = (T-295)\Delta C_{\text{plegamiento}}^{\circ} + \Delta H_{\text{otras}}^{\circ}(T) \quad \text{ecuación 8}$$

donde ΔA_{np} es el cambio en el área no polar que se expone al solvente (en Å²), y $\Delta H_{\text{otras}}^{\circ}(T)$ es el cambio en la entalpía en condiciones estándar para otras contribuciones distintas al área no polar, a una temperatura determinada. Su análisis se basó en el estudio termodinámico de 14 proteínas globulares y el coeficiente de reparto de 11 amidas entre el agua y una fase orgánica. La fórmula para determinar la capacidad calorífica involucra el cambio del área polar e hidrofóbica de la proteína expuesta al solvente durante el plegamiento, y se supone que, en principio, el ΔC_p que se obtiene es independiente de la temperatura. La entalpía específica para el plegamiento tiene un valor fijo a 84° C. El cambio en el área polar e hidrofóbica fue proporcional a la masa de la proteína, lo que da la posibilidad de estimar todas las propiedades termodinámicas a partir de la masa y de la tempera-

tura de transición para la desnaturalización, donde el $\Delta G^{\circ}_{\text{plegamiento}} = 0$.

Posteriormente, se estudió el efecto de 15 mutaciones sobre el núcleo hidrofóbico del dominio amino terminal del represor λ ; estas mutaciones incluyeron siete con cambios estéricos sin modificar el volumen, cinco con grandes cambios de volumen y tres donde los residuos de Asn o Asp se reemplazaron por Leu o Val (Lim y cols. en 6). En el primer grupo de mutantes el $\Delta(\Delta G^{\circ}_{\text{D}})^{\text{H}_2\text{O}}$ a 25°C tuvo valores de entre +1.0 kcal mol⁻¹ (estabilización) y -1.4 kcal mol⁻¹; para el segundo grupo el valor fue de entre -1.8 y -5.0 kcal mol⁻¹ (desestabilización). El tercer grupo de mutantes mostró características estructurales de "glóbulo fundido" y no se obtuvieron los datos termodinámicos correspondientes. El glóbulo fundido, es un estado conformacional con mucha estructura secundaria, sin interacción terciarias fijas, con los grupos hidrofóbicos expuestos al solvente y un incremento en las fluctuaciones de las cadenas laterales.

Posteriormente, se calcularon las entalpías de van't Hoff a diferentes temperaturas de transición (el intervalo para la T_m de las diferentes mutantes se ubicó entre 23.2 y 59.6°C, mientras que para la proteína silvestre fue de 55.7°C). Sin embargo, debido a que no se estimaron los valores del ΔC_p , no fue posible determinar el carácter entrópico y entálpico para el $\Delta(\Delta G^{\circ}_{\text{D}})^{\text{H}_2\text{O}}$. En conclusión, el plegamiento de la región del amino terminal de esta proteína es tolerante a las mutaciones en su núcleo hidrofóbico. Al parecer, todas las mutantes presentan rearrreglos conformacionales para acomodar a los nuevos residuos; estos rearrreglos no son solamente locales sino que se detectan pequeños cambios en la superficie de la proteína. Más aún, el reemplazo de residuos hidrofóbicos por polares no evita el plegamiento, aunque es importante recordar que algunas de las mutantes presentan características de glóbulo fundido.

Un resultado interesante sobre la evaluación del efecto hidrofóbico lo aportó el grupo de Matthews (13), utilizando la lisozima pseudo-silvestre del fago T4, a la cual se le eliminó el puente disulfuro por medio de la doble mutación Cys54Thr/Cys97Ala. Las características estructurales de esta proteína mutada son similares a las

de la proteína silvestre, además de que el proceso de desnaturalización térmica es igual para ambas proteínas. Con esta nueva proteína se eliminó el efecto del puente disulfuro sobre el plegamiento, lo cual permite estudiar solamente la importancia del efecto hidrofóbico. En este sentido se realizó la mutación de los residuos Leu99 y Phe153 que se localizan en el núcleo hidrofóbico de la proteína. La mutante Leu99Ala/Phe153Ala tuvo valores de ΔT_m y de $\Delta(\Delta G^{\circ}_{\text{D}})$ de -22.8°C y de -6.9 kcal mol⁻¹ (desestabilización) a un pH de 5.7, mientras que para la mutante Phe153Leu los valores fueron de +0.8°C y +0.3 kcal mol⁻¹, respectivamente. Del resto de las mutantes estudiadas, solamente la Leu99Met ($\Delta T_m = -1.5^\circ\text{C}$, $\Delta(\Delta G^{\circ}_{\text{D}}) = -0.6$ kcal mol⁻¹, $\Delta\Delta H_D = +7$ kcal mol⁻¹) mostró que la desestabilización del estado nativo estaba dirigida por un efecto entrópico. Sin embargo, esta misma mutante a un pH de 3.0 y a 51.8°C muestra una desestabilización de origen entálpico, lo que indica que hay residuos de aminoácidos que pueden protonarse y que intervienen en el proceso de plegamiento.

E. LA PARTICIPACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS HÉLICE ALFA

Las α -hélices son estructuras muy importantes en la arquitectura de las proteínas en estado nativo y los residuos que participan en su construcción son muy característicos; así, el estudio termodinámico de las proteínas con mutaciones dirigidas para modificar la estructura y estabilidad de las α -hélices pueden aportar información acerca del papel que desempeñan los diferentes aminoácidos en el proceso del plegamiento de las proteínas.

Con base en estas consideraciones, Serrano y cols. (en 6) construyeron 34 mutantes sencillas y 5 mutantes dobles de la barnasa al modificar la secuencia de residuos de aminoácidos de las dos α -hélices más importantes. Posteriormente determinaron la estabilidad de cada mutante a 25°C, siguiendo la desnaturalización por urea por medio del cambio en la fluorescencia de la proteína. El valor para el $\Delta(\Delta G^{\circ}_{\text{D}})^{\text{H}_2\text{O}}$ osciló entre 4.8 kcal mol⁻¹ para la mutante Tyr17Gly, y 9.4 kcal mol⁻¹ para la Ser28Ala, mientras que el valor para la proteína silvestre es de 8.9 kcal mol⁻¹. En un trabajo posterior (en 6), este mismo grupo sustituyó la Ala32, un residuo central en la estructura α -hélice, con los 19 aminoácidos restantes. En rela-

ción con la mutante Ala32Gly, los valores para la $\Delta(\Delta G_D^{H_2O})$ oscilaron entre $+0.81 \text{ kcal mol}^{-1}$ (estabilización) para la Ala, y de aproximadamente $+4.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la Pro.

En otro estudio, Pinker y cols. (en 6) sustituyeron con Ala, 16 sitios localizados en estructuras α -hélices de la mioglobina del cachalote, y los valores para el $\Delta(\Delta G_D)$ oscilaron entre $1.05 \text{ kcal mol}^{-1}$ (estabilización) y $-1.92 \text{ kcal mol}^{-1}$ (desestabilización) a un pH de 9.6. Cabe mencionar que 11 de las 16 mutaciones disminuyeron la estabilidad de la proteína. Este grupo de investigadores concluyó que estos resultados reflejan la diferencia entre el área oculta al solvente del residuo original y el introducido por la mutación, en otras palabras, mientras mayor sea el área del residuo que se oculte durante el plegamiento, mayor será la estabilidad de la proteína.

Posteriormente, Park y cols. (14) reemplazaron con los 19 aminoácidos restantes al residuo central (Ala9) de un péptido sintético de 18 residuos cuya secuencia era Ac-Tyr(Glu-Ala-Ala-Ala-Lys)₃Ala-NH₂. Determinaron por medio de dicroísmo circular a 0° C el contenido de la estructura α -hélice como función del pH y de la fuerza iónica. Los valores que se obtuvieron a partir de la ecuación $\Delta G^\circ = -RT \ln([\alpha\text{-hélice}]/[\text{estructura al azar}])$ oscilaron entre $-0.42 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la Ala y $+0.59 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la Gly. Estos resultados reflejan la capacidad que tienen los diferentes residuos para formar la estructura secundaria.

Por otra parte, las interacciones electrostáticas entre los dipolos asociados a las α -hélices también han sido objeto de estudio por medio de la mutagénesis dirigida. Robinson y Sligar en 1993 (en 6) mutaron el residuo Glu18 del carboxilo terminal de la hélice 1 y el residuo Gln25 del amino terminal de la hélice 2 del citocromo *b*₅₆₂, para formar las mutantes Glu18Arg, Glu18Gln, Glu18Leu, Gln25Glu y Gln25Leu; asimismo, se realizaron diferentes mutantes dobles para construir los ciclos termodinámicos correspondientes. La pérdida de la estructura se determinó por medio de la absorción en el espectro de UV. Los cambios en la estabilidad ($\Delta(\Delta G^\circ)$) para las mutantes sencillas fueron menores a $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$. La mutante doble, Glu18Arg/Gln25Lys mostró un $\Delta(\Delta G^\circ) = -1.75 \text{ kcal mol}^{-1}$; en

este caso, la desestabilización fue provocada por un efecto entrópico, mientras que para la mutante Glu18Gln/Gln25Lys se obtuvo un valor de $-1.35 \text{ kcal mol}^{-1}$, provocado por un efecto entálpico. Los autores concluyeron que las estructuras α -hélices antiparalelas aportan una estabilidad de aproximadamente $0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ debido a la interacción de sus dipolos, mientras que las α -hélice paralelas muestran una disminución en la estabilidad de $1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Para estudiar estos fenómenos en la barnasa, cuya estructura presenta dos α -hélices importantes, Sancho y cols. (15) introdujeron un residuo de histidina, tanto en el extremo carboxilo como en el amino de cada α -hélice. El pKa del residuo de histidina de cada una de las cuatro mutantes se determinó por resonancia magnética nuclear, siendo el valor promedio para las mutantes del extremo carboxilo de 0.5 unidades mayor que el pK de las histidinas de la barnasa desnaturalizada a baja fuerza iónica; por otra parte, para las mutantes del amino terminal se obtuvo un valor de 0.8 unidades menor. La estabilidad de las mutantes se determinó por experimentos de desnaturalización en presencia de urea. Las mutantes en el carboxilo terminal fueron $0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ más estables cuando el residuo de histidina estaba protonado que cuando estaba desprotonado, ya sea a baja o alta fuerza iónica. Por el contrario, las mutantes en el amino terminal fueron $1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ menos estables cuando el residuo de histidina estaba protonado a baja fuerza iónica, y $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ menos estables a alta fuerza iónica. Estas observaciones son consistentes con el efecto esperado para la interacción electrostática entre los dipolos de las hélices.

CONCLUSIONES

El uso de la mutagénesis dirigida ha permitido un progreso rápido en el conocimiento de algunos de los aspectos del plegamiento y la estabilidad de las proteínas. Sin embargo, es claro que aún estamos lejos de afirmar que conocemos todo sobre la interacción de las fuerzas no covalentes que mantienen la estructura nativa de las proteínas.

En este sentido, se ha descrito que para algunos casos, una mutación provoca únicamente cambios locales en la estructura de la proteína,

mientras que la misma mutación, en otras proteínas, causa perturbaciones estructurales muy importantes. También se pone de manifiesto la repercusión, en estos estudios, del microambiente que rodea la mutación; de igual manera, se desconocen las causas que provocan tales fenómenos y sus consecuencias energéticas.

Asimismo, es importante tener un gran conocimiento acerca de cómo las mutaciones alteran al estado D y su interacción con el solvente, ya que la estabilidad de la proteína nativa se determina con base a este estado. No obstante, se ha conseguido determinar algunas cualidades de las diferentes fuerzas que estabilizan al estado nativo de las proteínas, las cuales, dependiendo de la temperatura o la composición de la solución, pueden inducir su desnaturalización. Los movimientos vibracionales y la hidratación dominan el valor del término ΔH asociado a la desnaturalización. El papel de las interacciones de van der Waals y la pérdida de grados de libertad conformacional favorecen al estado nativo. Debe señalarse que, al determinar la participación de los puentes de hidrógeno en la estabilidad de las proteínas, se ha demostrado que es equivalente a la participación del efecto hidrofóbico. Esta observación pone de manifiesto la importancia de los puentes de hidrógeno en la estabilidad proteica. Con relación a esto, la adición de un puente disulfuro intracatenario, favorece la disminución de la libertad conformacional, promoviendo la estabilidad del estado N.

El análisis continuo de la interacción de las diferentes fuerzas que estabilizan al estado nativo, podrá aportar evidencias acerca de las vías del plegamiento y eventualmente construir unas bases teóricas sólidas que permitan realizar predicciones sobre la estructura de las proteínas y su estabilidad.

REFERENCIAS

1. Matthews, BW (1987) Genetic and structural analysis of the protein stability problem. *Biochemistry* 26:6885-6888.
2. Matthews, BW (1993) Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu Rev Biochem* 62:139-160.
3. Shortle, D (1989) Probing the determinants of protein folding and stability with amino acid substitutions. *J Biol Chem* 264:5315-5318.
4. Khechinashvili, NN, Janin, J y Rodier, F (1995) Thermodynamics of the temperature-induced unfolding of globular proteins. *Protein Science* 4:1315-1324.
5. Pace, CN y Laurens, DV (1989) A new method for determining the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry* 28:2520-2525.
6. Sturtevant, JM (1994) The thermodynamic effects of protein mutation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 4:69-78.
7. Pace, CN, Grimsley, GR, Thomson, JA y Barnett, BJ (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem* 263:11820-11825
8. Clarke, J y Fersht, AR (1993) Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* 32:4322-4329.
9. Shirley, BA, Stanssens, P, Hahn, U y Pace, CN (1992) Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry* 31:725-732.
10. Privalov, PL, Makhataдзе GI (1993) Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J Mol Biol* 232:660-679.
11. Pace, CN (1992) Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J Mol Biol* 226:29-35.
12. Spolar, RS, Livingstone, JR, Record, MT (1992) Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* 31:3947-3955.
13. Eriksson, AE, Baase, WA, Matthews, BW (1993) Similar hydrophobic replacements of Leu 99 and Phe 153 within the core of T4 lysozyme have different structural and thermodynamic consequences. *J Mol Biol* 229:747-769.
14. Park, S-H, Sholongo, W y Stellwagen, E (1993) Residue helix parameters obtained from dichroic analysis of peptides of defined sequences. *Biochemistry* 32:7048-7053.
15. Sancho, J, Serrano, L y Fersht, AR (1992) Histidine residues at the N- and C- terminus of α -helices: perturbed pK_s and protein stability. *Biochemistry* 31:2253-2258.

DEL BUEN DECIR...

¿EL GRUPO ACILO DEL ÁCIDO PALMÍTICO DEBE SER LLAMADO PALMITOIL O PALMITIL?

El nombre trivial o común del ácido hexadecanoico es ácido palmítico, mientras que el de su alcohol graso, el 1-hexadecanol, es palmitil alcohol; para nombrar a sus correspondientes grupos derivados (inicialmente llamados radicales) se utilizaba las denominaciones de palmitoil- y palmitil-, para el ácido y el alcohol, respectivamente. No obstante, desde 1967, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), a través de su Comisión de Nomenclatura en Bioquímica (CBN) (*J. Biol. Chem.* 242: 4845-4849, 1967) emitió la **recomendación 4.2** que dice: "los alcoholes grasos y sus radicales derivados deben ser designados de acuerdo a la nomenclatura sistemática (Reglas para la nomenclatura de la Química Orgánica IUPAC, **Regla A-1**) y no por los nombres triviales, derivados de sus correspondientes ácidos grasos."

Ejemplo:

1-Hexadecanol y 1-hexadecil-, pero no Palmitil alcohol y palmitil-

La recomendación 4.2, publicada en 1967, fue ratificada por la CBN de la IUPAC-IUB en 1976 para la nomenclatura de lípidos, mediante la recomendación **Lip-1.7**.

Con estos antecedentes, queda claro que el grupo acilo del ácido palmítico debe ser llamado palmitoil.

¿ES CORRECTO UTILIZAR NOMBRES TRIVIALES PARA DENOMINAR A LOS ÁCIDOS GRASOS?

La **regla C-404.1** (*Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, and H, Pergamon Press, Oxford, 1979, IUPAC*) y la **recomendación R-5.7.1**, emitida en 1993, indican la posibilidad de utilizar algunos nombres triviales, los cuales son parcialmente listados a continuación:

SISTEMÁTICO	NOMBRE DE LOS ÁCIDOS TRIVIAL	NOMBRE DEL GRUPO ACILO TRIVIAL
Metanoico	Fórmico	Formil
Etanoico	Acético	Acetil
Propanoico	Propiónico	Propionil
Butanoico	Butírico	Butiril
2-metanopropanoico	Isobutírico	Isobutiril
Pentanoico	Valérico	Valeril
3-metilbutanoico	Isovalérico	Isovaleril
2,2-dimetilpropanoico	Piválico	Pivaloil
Dodecanoico	Láurico	Lauroil
Tetradecanoico	Mirístico	Miristoil
Hexadecanoico	Palmítico	Palmitoil
Octadecanoico	Estearico	Estearoil

Los nombres caproico, caprílico y cáprico (para los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico, respectivamente) son abandonados.

Como se puede observar del listado anterior, al grupo acilo de los ácidos alifáticos saturados monocarboxílicos, con menos de seis átomos de carbono, se le cambia, en el nombre trivial, la terminación ico por il, mientras que al grupo acilo con ocho o más átomos de carbono se le cambia la terminación ico por oil.

En la referida **recomendación 5.7.1** se indica que "El nombre de un grupo acilo monovalente o divalente, formado por la eliminación del grupo -OH de cada grupo carboxilo de un ácido carboxílico denotado por el sufijo 'oico' o teniendo un nombre trivial, es derivado del nombre del ácido correspondiente, cambiando la terminación 'oico' o 'ico' a 'oil' o 'il', respectivamente."

Ejemplos:

Heptanoico	Heptanoil
Decanodioco	Decanodioil
Acético	Acetil
Malónico	Malonil

¿CÓMO PUEDO ENTERARME DE NUEVAS RECOMENDACIONES EN LA NOMENCLATURA?

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), a través de su Comisión de enlace IUPAC-IUB sobre Nomenclatura en Bioquímica (JCBN), han elaborado una serie de nuevas recomendaciones (1997)

sobre la nomenclatura de **glicolípidos** (publicadas durante 1998 y 1999 en: *Carbohydr. Res.*, 1998, 312, 167-175; *Eur. J. Biochem.*, 1998, 257, 293-298; *J. Mol. Biol.*, 1999, 286, 963-970; *Pure Appl. Chem.*, 1997, 69, 2475-2487), la cual substituye a la sección de glicolípidos (Lip-3) de la serie de recomendaciones de 1976, sobre la nomenclatura de lípidos (publicadas durante 1977 y 1978 en: *Eur. J. Biochem.*, 1977, 79, 11-21; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1977, 358, 617-631; *Lipids*, 1977, 12, 455-468; *Mol. Cell. Biochem.*, 1977, 17, 157-171; *Chem. Phys. Lipids.*, 1978, 21, 159-173; *J. Lipid Res.*, 1978, 19, 114-128; *Biochem. J.*, 1978, 171, 21-35). No obstante, las secciones restantes sobre la nomenclatura de lípidos se mantienen vigentes hasta que se elaboren nuevas recomendaciones. Cabe resaltar que las recomendaciones de 1997 pueden ser consultadas gratuitamente en la siguiente dirección electrónica:

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/misc/glylp.html>

Además, en esta sección del BEB te mantendremos informado acerca del BUEN DECIR... en Bioquímica y con gusto trataremos de dar respuesta a tus dudas y comentarios.

Marco Antonio Juárez Oropeza
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México

LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS

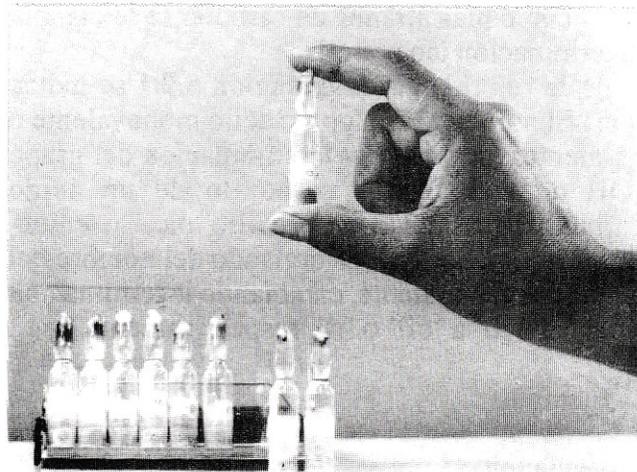
La utilización de los microorganismos por el hombre es un hecho bien conocido desde hace muchos años. En las últimas cuatro décadas esta explotación, ha tenido considerable impacto no sólo en el progreso de la microbiología, la química y sus muchas subdisciplinas, sino también en el desarrollo de la industria y la medicina.

Literalmente millones de cepas han sido estudiadas en diversos grados de profundidad dentro de programas de investigación tanto básica como aplicada. Dichos programas, practicados del mismo modo en estructuras académicas como industriales, han enriquecido tanto el conocimiento científico como abierto nuevas posibilidades de aplicación.

Lo anterior se puede visualizar claramente en el hecho de que todos los resultados o avances obtenidos en el campo de la biotecnología han repercutido en grado importante en beneficio del hombre.

Con este fin, para cualquier trabajo que implique el uso de los microorganismos, es deseable contar con una fuente pura y viable del agente de interés, ya que es frecuente el afrontar problemas de pureza y viabilidad de las cepas, así como de pérdida de microorganismos por el simple hecho de no contar con copias adicionales del mismo. Así como el beneficio de la disposición de sistemas microbianos puros en corto tiempo y a un bajo costo.

El Banco o Colección Microbiana de Interés Biomédico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, preocupado/a de los aspectos anteriores, ha conformado hasta este momento una infraestructura adecuada, con la cual se ha podido incrementar en forma importante el número de microorganismos en estos últimos años. Paralelamente a esto, la colección ha donado, intercambiado y vendido microorganismos en forma considerable. Por otro lado, es importante considerar que sumado a lo anterior la colección da otro tipo de servicios, como es la asesoría en el manejo de cepas e identificación de microorganismos a investigadores de diferentes campos de la medicina



Aspecto del sistema de almacenaje de liofilizados, utilizado por la Colección Microbiana.

y la industria. Actualmente la Colección Microbiana ha enfocado su interés mayormente al área de la salud, considerando que en este campo existe un potencial importante en el uso de microorganismos.

Con este enfoque la Colección Microbiana espera a mediano y largo plazo tener una mayor interacción con los especialistas de las Ciencias Biomédicas, respecto a sus necesidades de herramientas biológicas.

México hasta el momento cuenta con un total de 9 colecciones las cuales poseen las siguientes claves; CENACUMI-757 (Centro Nacional de Cultivos Microbianos), CFQ-100 (Cepario Facultad de Química, UNAM), CISM-95 (INIFAP-SARH), ENCB-449 (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN), FLACC-584 (Asociación Mexicana de Investigadores de la Contaminación Ambiental), INDRE-121 (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias), INIF-104 (Colección gubernamental de Microhongos), ITD-99 (Colección gubernamental de cepas Microbianas), y UNAM-48 (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Es importante observar que este número de colecciones es ligeramente mayor en comparación con las siete colecciones con las que cuenta Argentina, en cambio este número se encuentra por abajo de la mitad del número de co-

lecciones que tiene el Reino Unido, el cual es de 25.

La Colección de Cultivos Microbianos de Interés en las Ciencias Biomédicas se encuentra integrada al **World Directory of Collections of Culture of Microorganisms** desde 1981 (Sugawara H., Ma J., Miyazaki S., Shimura J., Takishima Y. (1993) *World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms*. 4 Ed. WFCC World Data Center on Microorganisms.), con la clave UNAM-48, formando parte así de las 756 colecciones reconocidas en el mundo. La colección desde su origen se encuentra ubicada, dentro del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Esta colección cuenta hasta el momento con 475 microorganismos, entre bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, todos

ellos de importancia en diferentes áreas de las Ciencias Biomédicas. Dentro de la colección se tienen cepas de *Salmonella* y *Shigella* de diferentes especies y tipos, así como una gran variedad de cepas de *Escherichia coli* de tipo toxigénico LT y ST. Se cuenta también con cepas que contienen plásmidos de resistencia a diversos fármacos muy utilizados para experimentos de clonación molecular. La colección posee además microorganismos productores de antibióticos, de vacunas, de enzimas para diagnóstico y otros.

Dentro de los planes futuros de esta Colección está el incorporar parásitos y fagos que pueden ser cultivables.

Marco Antonio Ortiz Jiménez
Departamento de Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Con la finalidad de intercambiar herramientas para la enseñanza de la bioquímica en la licenciatura y el posgrado, nos hemos propuesto incluir esta nueva sección intitulada: Problema Bioquímico. Considerando que las clases de bioquímica en las aulas, no pueden basarse exclusivamente en la exposición verbal del tema por parte del profesor, nosotros proponemos dedicar tiempo de clase a la resolución de problemas, además de asignar otros problemas semejantes como tarea. Muchos de los problemas que serán propuestos en esta sección no son nuevos, pero sí modificados de libros y artículos científicos. Invitamos a todas aquellas personas involucradas en la enseñanza de la bioquímica, a enviar propuestas de problemas

que puedan ser aplicados en las aulas universitarias.

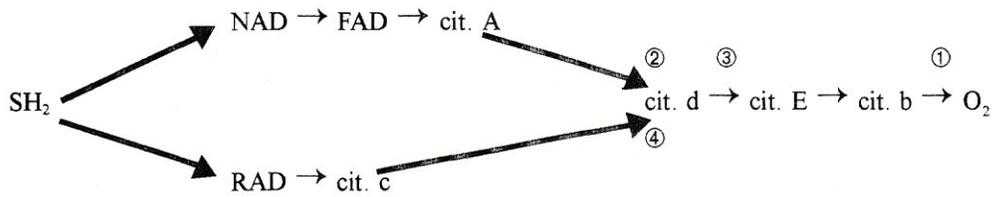
Rafael Moreno Sánchez

TEMA: Bioenergética

Analiza los niveles redox de los componentes de la siguiente cadena respiratoria bacteriana y determina la secuencia de reacciones entre ellos y los sitios de acción de los inhibidores (Inh). La cadena respiratoria de este microorganismo parece estar ramificada. El signo positivo indica el grado de oxidación del componente y el signo negativo significa que el componente está reducido.

	COENZIMAS			CITOCROMOS				
	NAD	FAD	RAD	A	b	c	d	E
Control	+	+	+	++	+++	++	++	++
+ Inh. 1	-	-	-	-	-	-	-	-
+ Inh. 2	-	-	+	-	+++	++	++	++
+ Inh. 3	-	-	-	-	+++	-	-	+++
+ Inh. 4	+	+	-	++	+++	-	++	++

SOLUCIÓN



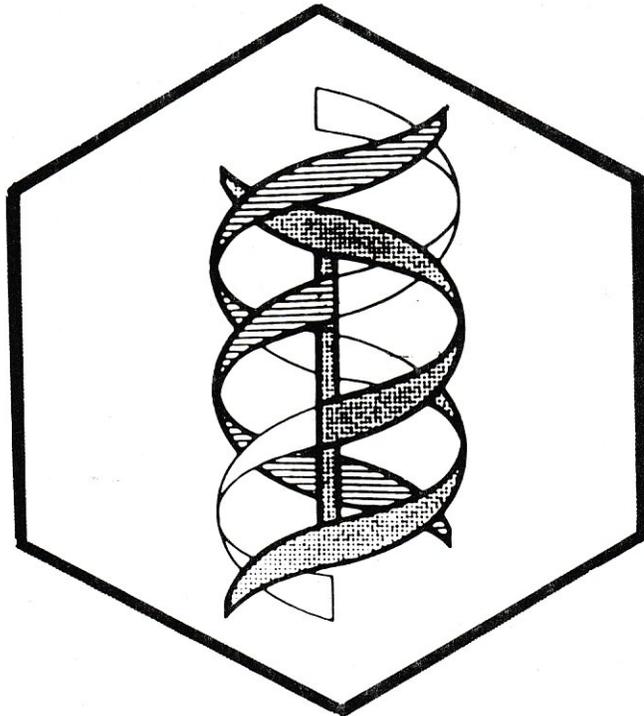
Comentarios:

–Para proponer una secuencia típica de reacciones de una cadena respiratoria, la respuesta completa al problema debe incluir al donador inicial de electrones (cualquier sustrato oxidable, SH_2) y al aceptor final de electrones que comúnmente es el oxígeno.

–La solución del problema contempla el manejo de los siguientes conceptos: potencial redox, pues las coenzimas tienen un potencial más negativo que los citocromos, por lo cual las primeras deben estar al inicio de las cadenas de transporte de electrones; por lo mismo, NAD, que tiene un potencial redox ligeramente más negativo, debe estar colocado primero que el FAD. Estado redox,

ya que los componentes más próximos al O_2 presentarán un estado más oxidado, que los componentes más alejados tendrán un estado menos oxidado. Efecto de inhibidores respiratorios, pues los componentes redox que se encuentran antes del sitio de inhibición estarán reducidos, mientras que los componentes que se localizan después del sitio de inhibición estarán oxidados. NAD, FAD y RAD son coenzimas.

Bibliografía: WB Wood, JH Wilson, RM Benbow, LE Hood. Biochemistry. A problems approach. W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park, California. 1974. pp 265-266.



Esta nota fue enviada por un estudiante de la Escuela Secundaria que leyó el BEB y se tomó la molestia de hacer un comentario al respecto de un tema que tiene importancia para su formación y del cual él tiene una información que quiso compartir con nosotros.

En el Comité Editorial nos entusiasma la idea de tener lectores que a tan temprana edad tienen interés por el tipo de trabajos que publicamos en el BEB y que participan con nosotros en la conformación de la revista y nos ayudan a cumplir nuestros objetivos.

HAY QUE DARLE MAYOR CRÉDITO AL ORIGEN EXTRATERRESTRE DE LA VIDA

El origen extraterrestre de la vida no tiene mucho crédito y dado que la teoría de la panspermia no se estudia mucho o nada en la educación básica, como en el segundo grado de secundaria, al que yo asisto, me gustaría que se comentara del tema.

Yo sé que una evidencia de esta teoría son los meteoritos carbonosos que llegan a la Tierra, los cuales contienen aminoácidos y compuestos orgánicos en su centro y superficie, pero hay controversia de que sea por contaminación a su llegada a la Tierra.

Uno de los casos, según mi apreciación, más convincente es el meteorito que cayó en Australia en 1969, dos laboratorios que trabajaron independientemente hallaron aminoácidos que no se encuentran en la Tierra, lo que hace improbable que su presencia se deba a contaminación terrestre. Por otra parte, los aminoácidos de este meteorito son ópticamente activos, por lo que también es improbable que sea por contaminación, dado que los de la Tierra son ópticamente inactivos. Entre los componentes de este meteorito, también se encontraron ácidos mono y dicarboxílicos, como los ácidos malónico, succínico y fumárico; compues-

tos que también se encontraron en el meteorito de Orgeuil, que cayó en Francia hace aproximadamente un siglo (Lehninger LA, 1990, Biochemistry).

En los últimos años se ha encontrado que en las nubes de polvo interestelar existe agua y amoníaco, que son precursores importantes para los organismos vivos más complejos.

Durante muchos años se ha pensado acerca de la vida en otros planetas, de hecho se ha acuñado el vocablo "exobiología", para referirse a la biología extraterrestre. Un importante objetivo de la NASA en los Estados Unidos, es estudiar la posible existencia de vida en otros planetas y satélites. Con respecto a la Luna, aun cuando su superficie es árida, se han encontrado aminoácidos. Según una teoría dice que la Luna se separó de la Tierra, y se piensa que estas moléculas son provenientes de la Tierra. Se han enviado sondas a Marte, para buscar agua y moléculas orgánicas o huellas de su existencia pasada, pero ese análisis aún está en sus inicios.

José Gabriel del Campo González
Estudiante de segundo año de Secundaria

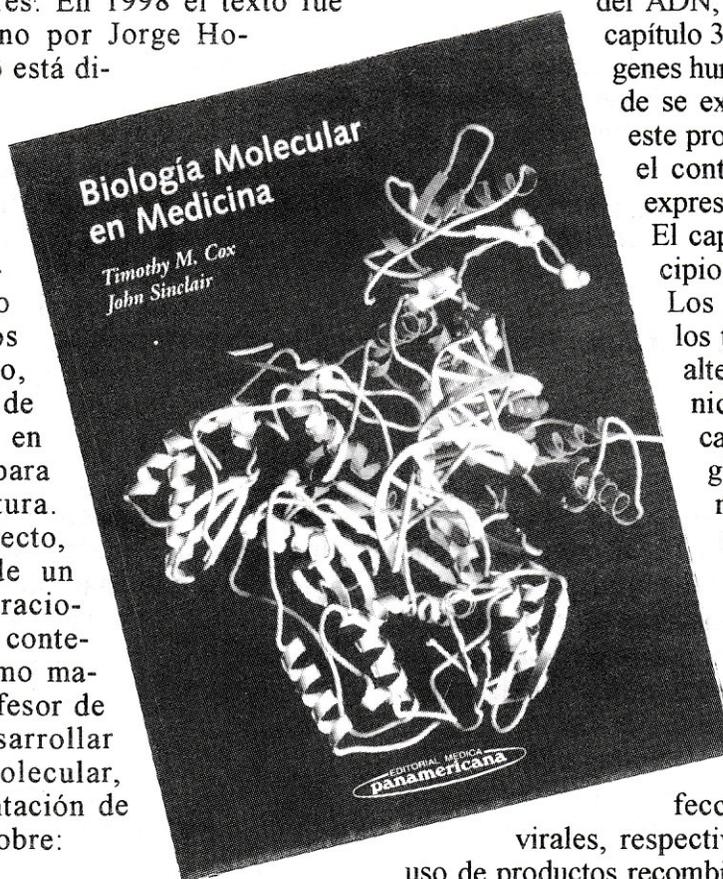
BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA

Timothy M. Cox y John Sinclair (1997). Traducido por Jorge Horacio Negrete (1998). ISBN 84-7903-412-2. 950-06-0398-5. Editorial Médica Panamericana, SA de CV. \$470.00 MN.

En 1997 Timothy M. Cox y John Sinclair con un grupo de colaboradores ingleses publicaron un libro de texto intitulado: *Molecular Biology in Medicine*, editado por Blackwell Science Ltd. Oxford en Londres. En 1998 el texto fue traducido al castellano por Jorge Horacio Negrete. El libro está dirigido a estudiantes de ciencias biomédicas, médicos residentes o ya en ejercicio.

El texto fue diseñado para servir como una introducción a los conceptos, el léxico, los logros y alcances de la biología molecular en las ciencias médicas para alumnos de licenciatura. El texto es claro y directo, y va acompañado de un gran número de ilustraciones. Por todo esto su contenido puede servir como material auxiliar del profesor de bioquímica para desarrollar temas de biología molecular, permitiendo la presentación de ejemplos concretos sobre:

- la aplicación de la biología molecular en medicina
- la transcripción y la traducción
- los principios de genética médica
- los aspectos moleculares de enfermedades monogénicas, poligénicas y cáncer
- las bases moleculares de la inmunología y las infecciones virales
- los productos recombinantes empleados en la medicina
- la terapia génica
- el diagnóstico molecular



Más que un compendio exhaustivo, el texto revisa temas selectos, presentado problemas médicos y estableciendo las bases moleculares de las patologías descritas y la manera en que la biología molecular puede ser empleada en el diagnóstico, análisis y el tratamiento de las enfermedades. Un claro ejemplo de este desarrollo aparece en el capítulo 1: Hemofilia: la biología molecular en el centro de la enfermedad humana. El capítulo 2 revisa los conceptos generales de la estructura y función

del ADN, ARN y las proteínas. El capítulo 3 presenta el análisis de los genes humanos, su estructura, dónde se expresan y cómo se regula este proceso. El capítulo 4 revisa el control transcripcional de la expresión génica en el humano. El capítulo 5 describe los principios de la genética médica. Los capítulos 6 y 7 discuten los trastornos que resultan de alteraciones mono y poligénicas, respectivamente. El capítulo 8 analiza la biología molecular del cáncer, mientras que el capítulo 9 analiza los cánceres hereditarios. El capítulo 10 está dedicado a las bases moleculares de la inmunología, y el 11 a la autoinmunidad en humanos. Los capítulos 12 y 13 revisan las in-

fecciones microbianas y virales, respectivamente. El 14 revisa el uso de productos recombinantes en la medicina. El capítulo 15 revisa el descubrimiento de nuevos fármacos. El capítulo 16 analiza los avances en terapia génica, mientras que el 17 se enfoca al diagnóstico prenatal. Finalmente, el capítulo 18 discute el futuro de la aplicación de la biología molecular en la medicina. El libro cuenta con un glosario de términos de biología molecular y genética.

Comentarista: Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Biología Celular,
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

del 9 al 13 de agosto de 1999

TERCER AVISO SOBRE EL XXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

A todos los profesores de Bioquímica del país:

Se les informa que el próximo **XXVI Taller de Actualización Bioquímica** se realizará del 9 al 12 de agosto del año en curso. Durante este Taller se cubrirán los temas que se muestran en el calendario anexo. La sede es la Ciudad de México.

Atentamente
El Comité Organizador

Marco A. Juárez Oropeza (majo@servidor.unam.mx), Tel: 623-21-69
Juan Pablo Pardo Vázquez (pardov@servidor.unam.mx), Tel: 623-25-10
Sara Morales López (saramolo@servidor.unam.mx), Tel: 623-21-68
Federico Martínez Montes (fedem@servidor.unam.mx), Tel: 623-24-08
Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Fax: 616-24-19

XXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
VII Congreso de la Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A. C.
del 9 al 13 de agosto de 1999

HORA	LUNES 9	MARTES 10	MIÉRCOLES 11	JUEVES 12	VIERNES 13
8:00	Inscripción				
9:00 a 9:15	Inauguración	Los complejos respiratorios mitocondriales. Juan Pablo Pardo Vázquez	Aspectos metabólicos y genéticos del cáncer. Alejandro García Carranca	Cinética de compartimientos. Héctor Riveros Rosas	Congreso de la AMPB
9:15 a 10:30	Ciclos hormonales en animales. Gabriela Morali				
RECESO					
10:45 a 12:15	Acción diversa de las hormonas esteroideas. Josué Garza Flores	La cadena respiratoria bacteriana. Edgardo Escamilla	Adhesión celular. Vadillo	Los fármacos como producto de la investigación bioquímica. Francisco Javier Flores Murrieta	
RECESO					
12:30 a 14:00	Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida. Enrique Soto	Las bacterias fijadoras de nitrógeno. David Romero Camarena	Los receptores adrenérgicos vasculares en la hipertensión. Rafael Villalobos Molina	Degradación y metabolismo de algunos fármacos. Zuñsadaí Hernández	
RECESO PARA COMER					
16:00 a 19:00	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Ceremonia de Clausura.

ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

VII CONGRESO

13 de agosto de 1999

Palacio de la Escuela de Medicina, U.N.A.M.
Venezuela y Brasil, Centro Histórico de la Ciudad de México

INFORMES:

Elisa Salles Mora
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-281
04510 México, D. F.
Teléfono: (5)623-2170
Fax: (5)616-2419
Correo Electrónico: beb@laguna.fmedic.unam.mx

ORGANIZADORES:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Bioenergética
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Teléfono: (5)622-5609
Fax: (5)622-5611
Correo Electrónico: azentell@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-159
04510 México, D. F.
Teléfono: (5)623-2169
Fax: (5)616-2419
Correo Electrónico: majo@servidor.unam.mx
majo@laguna.fmedic.unam.mx

Mtro. Jorge Joel Reyes Méndez
Departamento de Atención a la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
Apartado Postal 86-371
14391 México, D. F.
Teléfono: (5)724-5207
Fax: (5)724-5218
Correo Electrónico: joelr@cueyatl.uam.mx

OBJETIVOS:

El Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., tiene como objetivo principal que los profesores de Bioquímica y áreas afines de las licenciaturas y posgrados del país, tengan un foro donde puedan compartir sus experiencias docentes en un ambiente crítico y académico.

PARTICIPANTES:

A este foro están invitados a participar: profesores e instructores de laboratorio de bioquímica y áreas afines, de diferentes carreras de licenciatura y posgrado del país, así como investigadores de distintas áreas interesados en la enseñanza, lo cual permita la interacción de diversos profesionales que participan en el proceso de enseñanza-aprendizaje, y propicie un ambiente adecuado para lograr la actualización, la interacción multidisciplinaria y la generación de ideas e inquietudes, indispensables para el avance de la práctica docente. Se aceptará un máximo de dos trabajos por ponente.

TEMAS:

Las presentaciones deberán ser incluidas dentro de los siguientes temas:

- Análisis sobre la efectividad y/o aplicación de planes de estudios ya en marcha.
- Aplicación de sistemas de enseñanza mediada por computadora.
- Efectividad de diferentes sistemas de evaluación.
- Estudios poblacionales sobre índices de aprobación y/o deserción.
- Desarrollo de modelos bioquímicos y/o fisiológicos para la docencia.
- Aplicación y/o innovación de prácticas de laboratorio.
- Otros: experiencia docente, que presenten o comenten planes de estudio, exámenes y otros instrumentos de evaluación, el uso de técnicas motivacionales y/o material didáctico y juegos empleados en clase.

Los resúmenes no deberán exceder de una hoja con 2.5 cm (una pulgada) libres en los cuatro márgenes y un tipo de letra Arial o Helvética de 10 puntos. Se deberá especificar: título (a mayúsculas), autores y adscripción, introducción, objetivo, métodos y/o técnicas empleadas, resultados y conclusiones. El resumen podrá tener un esquema, figura o tabla. Le pedimos cuidar su presenta-

ción y ortografía, pues en caso de ser aceptado, tal y como lo envíe será publicado en las memorias que se elaborarán en ocasión del VII Congreso. El original de su trabajo no deberá tener borrones ni tachaduras y se enviará, sin doblar, junto con tres copias. No se aceptan envíos por Fax. Se sugiere que la presentación del resumen se apegue al siguiente ejemplo:

INFLUENCIA DE LA EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR SOBRE EL ÍNDICE DE APROBACIÓN DEL CURSO DE BIOQUÍMICA.

(renglón libre)

José Luis Vázquez Esquivel, María Angélica López Fernández, Antonio Martínez Colín. Universidad Independiente de Santa Cruz, Departamento de Evaluación Educativa. México, D.F., 04510, México.

(renglón libre)

RESUMEN...

Favor de enviar hoja de registro, originales del resumen y tres copias de cada uno de ellos a Elisa Salles Mora, Apartado Postal 70-281, Código postal 04510, México, D.F. Inscripción: depositar \$100.00 pesos (MN) para socios numerarios y \$200.00 para no socios, a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica,

A.C., en la cuenta Bancomer No. 1153813-9 y enviar por fax copia de la ficha de depósito, escribiendo su nombre en la parte superior izquierda.

Informes: llamar al teléfono: (5)623-2170, o enviar Fax en atención a Elisa Salles Mora al (5)616-2419. Enviar Correo Electrónico: beb@laguna.fmedic.unam.mx.

Fecha límite para la entrega de resúmenes: **Viernes 2 de julio de 1999.**

A continuación proporcionamos información de los precios de algunos hoteles ubicados en el Centro Histórico de la Ciudad de México, cerca del Palacio de la Escuela de Medicina:

HOTELES (4 ★)

AMBASSADOR
Humbolt No. 38
(atrás del Metro Juárez y a dos cuerdas del Metro Hidalgo)
Tel.: 5518-0110
Sencilla: \$330.00
Doble: \$380.00
Triple \$ \$76.00 por persona extra.

CATEDRAL
Donceles 95, entre Argentina y Brasil.
(Cerca del Metro Allende y Metro Zócalo)
Tels.: 5512-4344 / 5518-5232 / 5512-4284
Sencilla: \$245.00
Doble: \$350.00
Triple: \$385.00

CIBELES
Calz. de Tlalpan 1507
(a una cuadra del Metro Ermita)
Sencilla: \$240.00
Doble: \$340.00
Triple: \$390.00 3 personas
Triple: \$440.00 4 personas

HOTELES (3 ★)

SAN MARTIN
Eje Central Lázaro Cárdenas 4
(Cerca del Metro Garibaldi)
Tels.: 5529-7414 / 5529-7415 / 5529-7416 / 5526-2619
Sencilla: \$130.00
Doble: \$220.00
Triple \$ \$50.00 por persona extra.

VIRREYES
Izazaga 8
(Cerca del Metro Salto del Agua)
Tel.: 5510-3263
Sencilla: \$234.00
Doble: \$258.00
Triple: \$295.00

Les suplicamos que antes de hacer su reservación, verifiquen la vigencia de los precios, ya que éstos pueden cambiar sin previo aviso. Los trámites de hospedaje se tienen que hacer directamente con el hotel; el Comité Organizador no tiene ninguna relación con los hoteles.

**VII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES
DE BIOQUÍMICA, A.C.**

FORMA DE REGISTRO

DATOS PERSONALES

NOMBRE(S) _____ APELLIDOS _____

MIEMBRO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA:

SI

NO

NOMBRAMIENTO _____

TIEMPO COMPLETO _____

MEDIO TIEMPO _____

POR HORAS _____

**CARRERA EN LA QUE IMPARTE
BIOQUÍMICA O MATERIAS AFINES** _____

ADSCRIPCIÓN

UNIVERSIDAD _____

FACULTAD O ESCUELA _____ DEPARTAMENTO _____

DIRECCIÓN

CALLE Y NÚMERO _____

COLONIA _____ CIUDAD _____

ENTIDAD FEDERATIVA _____ CÓDIGO POSTAL (Apartado Postal) _____

TELÉFONO: _____ FAX: _____

CORREO ELECTRÓNICO: _____

TRABAJOS ENVIADOS AL CONGRESO

NÚMERO DE RESÚMENES ENVIADOS: _____

_____ Análisis sobre la efectividad y/o aplicación de planes de estudios ya en marcha

_____ Aplicación de sistemas de enseñanza mediada por computadora

_____ Efectividad de diferentes sistemas de evaluación

_____ Estudios poblacionales sobre índices de aprobación y/o deserción

_____ Desarrollo de modelos bioquímicos y/o fisiológicos para la docencia

_____ Aplicación y/o innovación de prácticas de laboratorio

_____ Otros: _____

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

CONVOCATORIA

La Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo invita a la comunidad académica a participar en su IV Congreso que se llevará a cabo del 28 de junio al 1° de julio de 1999, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en la Ciudad de México.

Las actividades del Congreso incluyen, mesas redondas y presentación de trabajos libres sobre temas relacionados con la Biología del Desarrollo.

Conferencias Magistrales:

Dr. Michael S. Levine.
University of California, Berkeley
Dr. Michael D. Purugganan.
North Carolina, State University
Dr. Nicholas C. Spitzer.
University of California, San Diego

Las personas interesadas en presentar algún trabajo libre deberán enviar sus resúmenes antes del 30 de abril de 1999.

El costo de la inscripción al Congreso será de:

Socios: \$200.00 antes del 30 de abril y \$300.00 después del 30 de abril.

No socios: \$450.00 antes del 30 de abril y \$550.00 después del 30 de abril.

Estudiantes no socios: \$50.00 antes del 30 de abril y \$100.00 después del 30 de abril.

Estudiantes socios: no pagan.

Informes:

Dra. Rocío Salceda o Dr. Julio Morán
Tels.: 5622-5669/5616 Fax: 5622 5607

rsalceda@ifisiol.unam.mx

jmoran@ifisiol.unam.mx

Dra. Raquel Trejo

Tel.: 5627-6900 Ext. 4323; Fax: 5761-0952

Dra. Martha Elisa Vázquez Memije,

Tel.: 5627-6941; Fax: 5761-0952

A LOS LECTORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

DONATIVO ANUAL 1999

El BEB entra en su décimo octavo año de publicación y debido a las condiciones económicas imperantes en México, nos permitimos solicitarles de la manera más atenta, el envío de un donativo extracuotas de \$ 200.00 (docientos pesos) o bien \$20.00 US dólares, que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 18 de nuestro Boletín.

El donativo puede hacerse mediante un depósito bancario a la cuenta número **1153813-9 de Bancomer**, o de un giro bancario a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C.

En espera de su comprensión y colaboración aprovechamos para enviarles un cordial saludo.

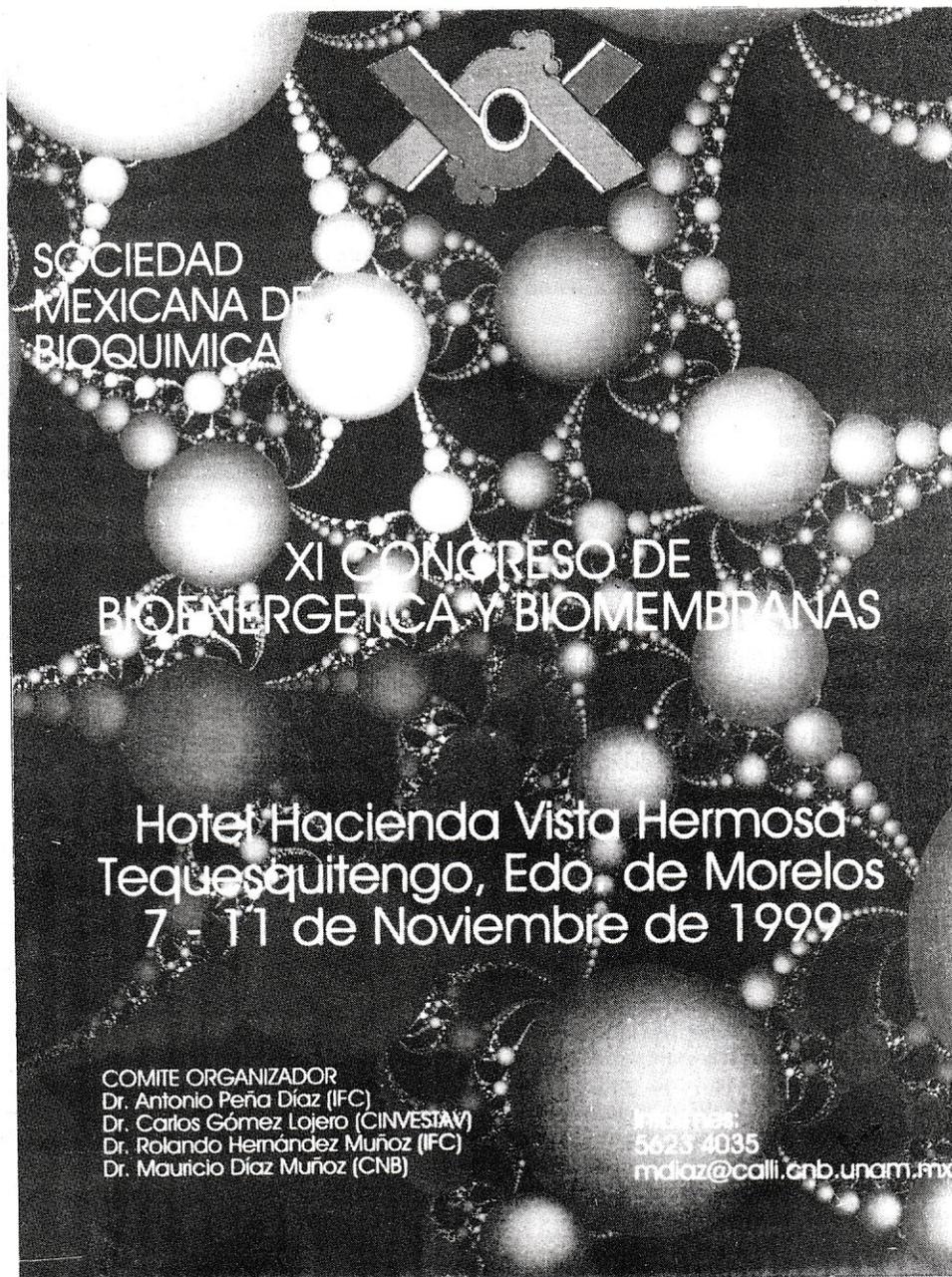
Atentamente
El Comité Editorial

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL DEL BEB EN TU LOCALIDAD?

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A C o suscriptor del BEB y radicas fuera de la Ciudad de México o de su zona conurbada, TÚ PODRÍAS SER UN CORRESPONSAL DEL BEB. Nos gustaría contar con uno o varios corresponsales adscritos a las instituciones de Educación Superior de cada estado de la República Mexicana que nos permitan saber quiénes conforman la comunidad académica de la región y conocer las noticias y las actividades más relevantes que ocurran o vayan a ocurrir en su localidad o región (congresos, cursos, seminarios, necesidades de recursos humanos y materiales y otras noticias o acontecimientos de tipo académico). Queremos hacer extensiva esta invitación a nuestros colegas de Centro y Sudamérica, así como de otros países de habla hispana.

¿Te ha interesado esta invitación? Entonces envíanos tu propuesta directamente al Coordinador de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México 04510, D F, MÉXICO. O bien al Fax (525) 616 2419 o al correo electrónico sersan@servidor.unam.mx.

Atentamente
Sergio Sánchez Esquivel, Coord. de Corresponsales
del Comité Editorial del BEB



SOCIEDAD
MEXICANA DE
BIOQUIMICA

XI CONGRESO DE
BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS

Hotel Hacienda Vista Hermosa
Tequesquitengo, Edo. de Morelos
7 - 11 de Noviembre de 1999

COMITE ORGANIZADOR
Dr. Antonio Peña Díaz (IFC)
Dr. Carlos Gómez Lojero (CINVESTAV)
Dr. Rolando Hernández Muñoz (IFC)
Dr. Mauricio Díaz Muñoz (CNB)

Informes:
5623 4035
mdiaz@calli.cnbi.unam.mx

Simposium de Estrés Oxidativo

24 al 26 de noviembre de 1999

en el Centro de Investigaciones Biomédicas del
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".
La Habana, Cuba

Informes:

Ela Céspedes

email: elace@vgiron.giron.sld.cu

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Word-perfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo y marcado como pie de nota, la afiliación del o los autores (por ejemplo: departamento e institución), domicilio, código postal, ciudad, estado, país, teléfono, fax y correo electrónico en caso de tenerlos. Si el título del trabajo es largo, debe incluirse cuatro renglones más abajo, un título breve con un máximo de 60 caracteres, incluyendo los espacios, para insertarlo como cabeza de página.
- 3) Se deberá incluir un resumen en idioma español y uno en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 4) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen en cursivas y antecedido por dos puntos el número de la primera y últimas páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías. *Bol Educ Bioq* 14:12-17.

Weindruch R (1996) Caloric restriction and aging. *Sci Amer* 274:32-38.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The molecular biology of immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Willey and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 5) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresiones láser o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 1998.
- 6) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- 7) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- 1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita:
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5.

Los manuscritos serán leídos por tres revisores. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal del BEB en su localidad.

CONTENIDO

EDITORIAL

SE INICIAN Y SE REINICIAN
SECCIONES EN EL BEB
José Víctor Calderón Salinas y
Alejandro Zentella Dehesa 51

ARTÍCULOS

FUNCIÓN Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS
DE LAS PROTEÍNAS G
Angeles Rangel Serrano 53

LA CLONALIDAD DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI Y SU RELACIÓN CON LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS
Marco Antonio Becerril Flores 60

ANÁLISIS TERMODINÁMICO DEL
EFECTO DE LAS MUTACIONES EN
EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS
Oscar Flores-Herrera, Aida Uribe, Juan Luis
Rendón, Juan Pablo Pardo y Federico
Martínez 66

OTRAS COMUNICACIONES

DEL BUEN DECIR
Marco Antonio Juárez Oropeza 76

LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE
INTERÉS EN LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS
Marco Antonio Ortiz Jiménez 78

PROBLEMA BIOQUÍMICO. BIOENERGÉTICA.
Rafael Moreno Sánchez 79

HAY QUE DARLE MAYOR CRÉDITO AL
ORIGEN EXTRATERRESTRE DE LA VIDA
José Gabriel del Campo González 81

BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA
Comentado por Alejandro Zentella Dehesa 82

CONVOCATORIAS

RUMBO AL XXVI TALLER
DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Tercer Aviso 83

ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES
DE BIOQUÍMICA, A C. VII CONGRESO 85

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGÍA
DEL DESARROLLO. IV CONGRESO 88

A LOS LECTORES DEL BEB
Donativo Anual 1999 88

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL
DEL BEB EN TU LOCALIDAD? 88

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA.
XI CONGRESO DE BIOENERGÉTICA Y
BIOMEMBRANAS 89

SIMPOSIUM DE ESTRÉS OXIDATIVO
La Habana, Cuba 89

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DEL BOLETÍN
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 90